สำนักหอสมุด

สัญญาเลขที่ R2560B120

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการ

การศึกษาความหลากหลายและการใช้ประโยชน์ของน้อยหน่าเครือ (ภายใต้โครงการ อนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี)

Biodiversity and Usefulness of Noinakreua (*Scarlet kadsura*) (Plant genetic conservation project under the royal initiative of her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn)

คณะผู้วิจัย สังกัด

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาท[1]
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญส่ง แสงอ่อน[2]
นายพุทธพงษ์ สร้อยเพชรเกษม[1]

[1] ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

[2] ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

11 JUN 2564
1038617
อ TP
159
.A5
พ74ร
2560

สนับสนุนโดย
งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร
ประจำปีงบประมาณ 2560

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณเป็นอย่างสูงสำหรับมหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยในหัวข้อ การศึกษาความหลากหลายและการใช้ประโยชน์ของน้อยหน่าเครือ (ภายใต้โครงการ อนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี) ด้วยเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2560 (เลขที่สัญญา R2560B150)

(ผศ.ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาท)

หัวหน้าโครงการวิจัย

พฤศจิกายน 2561

บทสรุปผู้บริหาร

1. รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย / แผนงานวิจัย

ชื่อแผนงานวิจัย

1.1 ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การศึกษาความหลากหลายและการใช้ประโยชน์ของน้อยหน่าเครือ (ภายใต้โครงการ อนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี)

(ภาษาอังกฤษ) Biodiversity and Usefulness of Noinakreua (*Scarlet kadsura*) (Plant genetic conservation project under the royal initiative of her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn)

ชื่อโครงการวิจัยภายใต้แผนงานวิจัย

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 (ภาษาไทย) การศึกษาความหลากหลาย การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวน้อยหน่าเครือ

(ภาษาอังกฤษ) Biodiversity, Micro Propagation, Production and Postharvest technology of Noinakreua (*Scarlet kadsura*)

โครงการวิจัยย่อยที่ 2 (ภาษาไทย) การศึกษาคุณภาพฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลน้อยหน่าเครือ และคุณภาพระหว่างการเก็บรักษาน้ำน้อยหน่าเครือสดพร้อมดื่ม

(ภาษาอังกฤษ) Study on quality antimicrobial activity and antioxidant activity of fruit and shelf life quality of ready to drink freshed juice of Noinakreua (*Scarlet kadsura*)

1.2 ชื่อคณะผู้วิจัย

1) ชื่อ-สกุล ผศ.ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาท
คุณวุฒิ Ph.D. (Agricultural Science)
ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์
ที่ทำงาน คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
โทรศัพท์ 055-963014 โทรสาร 055-963015

2) ชื่อ-สกุล ผศ.ดร.บุญส่ง แสงอ่อน
คุณวุฒิ Ph.D. (Food Science and Technology)
ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์
ที่ทำงาน คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
โทรศัพท์ 055-962745, 055-963014 โทรสาร 055-963015

3) ชื่อ-สกุล นายพุทธพงษ์ สร้อยเพชรเกษม
คุณวุฒิ วท.บ. (เกษตรศาสตร์)
ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตร
ที่ทำงาน คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
โทรศัพท์ 055-963014 โทรสาร 055-963015

1.3 งบประมาณและระยะเวลาทำวิจัย

งบประมาณสนับสนุนโดย งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2560

งบประมาณที่ได้รับ 1,526,000 บาท (หนึ่งล้านห้าแสนสองหมื่นหกพันบาทถ้วน)

ระยะเวลาทำวิจัย 12 เดือน 1 ตุลาคม พ.ศ.2560 ถึง เดือน 30 กันยายน พ.ศ.2561

2. สรุปโครงการวิจัย

จากข้อมูลงานวิจัยในต่างประเทศจะเห็นได้ว่า น้อยหน่าเครือเป็นพืชอนุรักษ์ของไทยที่น่าสนใจอย่างมากในการนำมาใช้ประโยชน์ เป็นไม้เถาเลื้อยในตระกูล Schisandraceae พบบนพื้นที่สูงเป็นพืชหายาก รูปร่างผลและกลิ่นคล้ายน้อยหน่า ผลสุกรับประทานเป็นผลไม้ มีงานวิจัยพบมีคุณค่าทางสารอาหารและยังมีสารยับยั้งอนุมูลอิสระสูง จีนใช้เป็นยาสมุนไพรโดยใช้ส่วนเถาและราก

แก้โรคทางเดินอาหารและไขข้ออักเสบ ปัจจุบันพบเป็นยาที่ทรงคุณค่าในการป้องกันเนื้องอก ต้านเชื้อ HIV ไวรัสตับอักเสบ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาคุณภาพทางกายภาพ ทางเคมี และสารต้านจุลินทรีย์จากน้อยหน่าเครือ โดยการสำรวจความหลากหลายของน้อยหน่าเครือทั้งชนิดและปริมาณ เพื่อเป็นฐานในการวิจัยและพัฒนาความหลากหลาย การอนุรักษ์ และการใช้ประโยชน์ของน้อยหน่าเครือให้ครบทุกด้านในระยะต่อไป อันจะเป็นประโยชน์ต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยในวงกว้างต่อไป และเพื่อสนองโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริของสมเด็จพรเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) โดยทำการศึกษาจากน้อยหน่าเครือ 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว และสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง

การการสำรวจตำแหน่ง จำนวน และชนิดน้อยหน่าเครือ พบว่า พื้นที่ที่พบสายพันธุ์น้อยหน่าเครือผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว มีอยู่ 3 ที่ คือ 1) บ้านขุนลาว ต.เจดีย์ใหม่ อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย พิกัด ; ละติจูด 19; 6; 59.4100 , ลองติจูด 99; 21; 43.4199 2) ต.ป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ พิกัด : ละติจูด 19; 8; 1.9100 , ลองติจูด 98; 39; 17.8599 3) บ้านป่าเหมี้ยง ต.แจ้ซ้อน อ.ปาน จ. ลำปาง ส่วนสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง จะพบที่ ต.ป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ พิกัด : ละติจูด 18; 54; 36.6100 ,ลองติจูด 99; 14; 44.9799 ซึ่งทั้ง 2 สายพันธุ์พบว่ามีการเจริญอยู่บนหุบเขาที่มีแหล่งน้ำไหลผ่าน ที่ระดับความสูง 1000 เมตรขึ้นไป

การตรวจสอบองค์ประกอบทางกายภาพและทางเคมี พบว่า ขนาดและน้ำหนักของผลน้อยหน่าเครือทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว มีความกว้างเฉลี่ย 14.70 เซนติเมตร ความยาวเฉลี่ย 12.50 เซนติเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ย 1.22 กิโลกรัม สายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง มีความกว้างเฉลี่ย 8.80 เซนติเมตร ความยาวเฉลี่ย 9.70 เซนติเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.28 กิโลกรัม

ลักษณะของสีเปลือก สีเนื้อ และความแน่นเนื้อของผลน้อยหน่า พบว่า สายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาวบริเวณเปลือกนอกวัดค่าการเทียบสีเฉลี่ยได้ ค่า a* เท่ากับ 15.9 ค่า b* เท่ากับ 26.2 ค่า L* เท่ากับ 34.3 และค่า H° เท่ากับ 60.8 ส่วนบริเวณเปลือกในวัดค่าการเทียบสีเฉลี่ยได้ ค่า a* เท่ากับ 20.2 ค่า b* เท่ากับ 24.4 ค่า L* เท่ากับ 40.4 และค่า H° เท่ากับ 48.1 และบริเวณเนื้อวัดค่าการเทียบสีเฉลี่ยได้ ค่า a* เท่ากับ 10.1 ค่า b* เท่ากับ 40.2 ค่า L* เท่ากับ 46.6 และค่า H° เท่ากับ 72.8 สายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง วัดค่าการเทียบสีบริเวณเปลือกเฉลี่ยได้ ค่า a* เท่ากับ 20.9 ค่า b* เท่ากับ 32.0 ค่า L* เท่ากับ 21.8 และค่า H° เท่ากับ 56.9 โดยน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว และพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง มีค่าความแน่นเนื้อเฉลี่ยเท่ากับ 3.99 และ 2.82 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

ลักษณะทางเคมีของน้ำน้อยหน่าเครือสดในสายพันธ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว มีค่า pH เท่ากับ 2.88 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ เท่ากับ 6.43% ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ เท่ากับ 1.64% และมีปริมาณวิตามินซี เท่ากับ 7.22 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมตัวอย่าง ส่วนสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง มีค่า pH เท่ากับ 3.07 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ เท่ากับ 6.30%

ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ เท่ากับ 1.41% และมีปริมาณวิตามินซี เท่ากับ 0.70 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมตัวอย่าง

เมื่อใช้เอทานอล เมทานอล และน้ำเป็นตัวทำละลายเพื่อสกัดสารจากเปลือก เนื้อ และเมล็ดของผลน้อยหน่าเครือสายพันธุ์เปลือกสีเหลือง จากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ DPPH, FRAP, ABTS และ ORAC ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำมีแนวโน้มในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าเอทานอล และเมทานอล โดยพบว่าสารสกัดหยาบของเปลือกดังกล่าวมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์โดยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS เท่ากับ 172.64 µg GEA/ml, 45.34%, 18.09 mg TEAC/mg และ 4.36 mM TEAC/mg ตามลำดับ สารสกัดหยาบของเนื้อมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์โดยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS เท่ากับ 178.51 µg GEA/ml, 47.51%, 22.12 mg TEAC/mg และ 4.11 mM TEAC/mg ตามลำดับ และสารกสัดหยาบของเมล็ดมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์โดยวิธี DPPH, FRAP และ ABTS มีค่า 174.15 µg GEA/ml, 42.96%, 20.41 mg TEAC/mg และ 3.87 mM TEAC/mg ตามลำดับ และเมื่อศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ORAC ของสารสกัดหยาบจากเมล็ดน้อยหน่าเครือด้วยเมทานอลพบว่ากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ 7,169 mM TE/100 g รองลงมาคือ เปลือก และเนื้อน้อยหน่าเครือ

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือก เนื้อ และเมล็ดของน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง กับเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด 11 ชนิด ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 8 ชนิดคือ *Staphylococcus aureus* TISTR 517, *Streptococcus faecalis* TISTR 459, *Lactobacillus plantarum* TISTR879, *Bacillus cereus* TISTR 697, *Escherichia coli* TISTR 780, *Proteus milabilis* TISTR 100, *Psudomonas aeruginosa* TISTR 781, *Salmonalla typhimurium* TISTR 1469 แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Candida albicans* TISTR 5779, *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5049 และ *Aspergillus niger* TISTR 3012 สารสกัดหยาบจากเปลือก เนื้อ และเมล็ดน้อยหน่าเครือสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทำให้เกิดโซนใสบนอาหารแข็งที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 7.67-15.00 มิลลิเมตร, 6.50-10.93 มิลลิเมตร และ 8.67-15.23 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยพบว่าเชื้อ *B. cereus* มีความไวต่อสารสกัดหยาบจากเมล็ดน้อยหน่าเครือที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายได้ดีที่สุด และพบว่าเชื้อที่ถูกยับยั้งได้น้อยที่สุดคือ *S. typhimurium* สารสกัดหยาบจากเนื้อน้อยหน่าเครือที่ใช้เอทานอลและน้ำเป็นตัวทำละลาย เมื่อทำการทดสอบเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ (MIC) พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบอยู่ระหว่าง 12.5-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ได้ (MBC) มีค่าอยู่ระหว่าง 25 ถึง มากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ทดสอบ ชนิดของตัวทำละลาย และชนิดของสารสกัดหยาบจากผลน้อยหน่าเครือ

การศึกษาคุณภาพน้ำน้อยหน่าเครือพร้อมดื่มบรรจุขวดที่เก็บรักษาไว้ ณ อุณหภูมิ 4, 15, และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าการเก็บรักษาน้ำน้อยหน่าเครือพร้อมดื่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการรักษาคุณภาพและชะลอการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลชีววิทยา รองลงมาคือ 15 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การเก็บผลิตภัณฑ์น้ำน้อยหน่าเครือบรรจุขวดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ 0 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ, ปริมาณกรด และปริมาณวิตามินซีเท่ากับ 7.10 °Brix, 1.25% และ 15.02 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรตัวอย่าง ตามลำดับ และเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ, ปริมาณกรด, ปริมาณวิตามินซีเท่ากับ 6.33 °Brix, 1.55% และ 8.45 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรตัวอย่าง ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ระหว่างการเก็บรักษาน้ำน้อยหน่าเครือดังกล่าวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ 0 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และยีสต์และรามีค่า 0.52 Log CFU/ml และ 1 Log CFU/ml ตามลำดับ และเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าวนาน 72 ชั่วโมง มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และยีสต์และรามีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 4.22 Log CFU/ml และ 5.43 CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวนยีสต์และราดังกล่าวมีค่าเกินมาตรฐานน้ำผลไม้เข้มข้นของ มผช. แม้การเก็บรักษาน้ำน้อยหน่าเครือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะช่วยรักษาคุณภาพและชะลอการเน่าเสีย แต่การเก็บรักษาไว้นานเกิน 72 ชั่วโมง ทำให้คุณภาพลดต่ำลง

3. บทคัดย่อภาษาไทยและบทคัดย่อภาษาอังกฤษ (Abstract)

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลาย และการใช้ประโยชน์ของน้อยหน่าเครือ (*Kadsura* spp.) เพื่อสนองโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพพระรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการสำรวจตำแหน่งของน้อยหน่าเครือ โดยวิธีการศึกษาจากการสำรวจและเก็บตัวอย่าง และศึกษาคุณภาพทางกายภาพ ทางเคมี และสารต้านจุลินทรีย์จากน้อยหน่าเครือ วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ และทางเคมี พบว่า น้อยหน่าเครือทั้ง 2 สายพันธุ์ อยู่ในเขตจังหวัดเชียงราย พิกัด ; ละติจูด 19; 6; 59.4100 , ลองติจูด 99; 21; 43.4199 และจังหวัดเชียงใหม่ ละติจูด 19; 8; 1.9100 , ลองติจูด 98; 39; 17.8599 ช่วงเวลาการออกดอกของน้อยหน่าเครือทั้ง 2 สายพันธุ์ อยู่ในช่วงเดือนมีนาคม และเริ่มพัฒนาเป็นผลอ่อนประมาณเดือนเมษายน เป็นต้นไป โดยผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว จะสามารถเก็บเกี่ยวผลได้ประมาณเดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิกายน (ในจังหวัดเชียงราย) ส่วนพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดงจะสามารถเก็บเกี่ยวผลได้ประมาณเดือนมกราคม (ในจังหวัดเชียงราย) แต่ถ้าพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดงออกทวายจะสามารถเก็บเกี่ยวผลได้ประมาณช่วงเดือนมีนาคม ซึ่งทั้ง 2 สายพันธุ์พบว่ามีการเจริญอยู่บนหุบเขาที่มีแหล่งน้ำไหลผ่าน ที่ระดับความสูง 1000 เมตรขึ้นไป ขนาดและน้ำหนักของ

ผลน้อยหน่าเครือทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว มีความกว้างเฉลี่ย 14.70 เซนติเมตร ความยาวเฉลี่ย 12.50 เซนติเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ย 1.22 กิโลกรัม สายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง มีความกว้างเฉลี่ย 8.80 เซนติเมตร ความยาวเฉลี่ย 9.70 เซนติเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.28 กิโลกรัม ส่วนการเทียบสี สายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว บริเวณเปลือกนอกวัดค่าการเทียบสีเฉลี่ยได้ ค่า a* เท่ากับ 15.9 ค่า b* เท่ากับ 26.2 ค่า L* เท่ากับ 34.3 และค่า Ho เท่ากับ 60.8 ส่วนบริเวณเปลือกในวัดค่าการเทียบสีเฉลี่ยได้ ค่า a* เท่ากับ 20.2 ค่า b* เท่ากับ 24.4 ค่า L* เท่ากับ 40.4 และค่า Ho เท่ากับ 48.1 และบริเวณเนื้อวัดค่าการเทียบสีเฉลี่ยได้ ค่า a* เท่ากับ 10.1 ค่า b* เท่ากับ 40.2 ค่า L* เท่ากับ 46.6 และค่า Ho เท่ากับ 72.8 สายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง วัดค่าการเทียบสีบริเวณเปลือกเฉลี่ยได้ ค่า a* เท่ากับ 20.9 ค่า b* เท่ากับ 32.0 ค่า L* เท่ากับ 21.8 และค่า Ho เท่ากับ 56.9 โดยน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว และพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง มีค่าความแน่นเนื้อเฉลี่ยเท่ากับ 3.99 และ 2.82 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ส่วนลักษณะทางเคมีของน้ำน้อยหน่าเครือสดในสายพันธ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว มีค่า pH เท่ากับ 2.88 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ เท่ากับ 6.43% ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ เท่ากับ 1.64% และมีปริมาณวิตามินซี เท่ากับ 7.22 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมตัวอย่าง ส่วนสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง มีค่า pH เท่ากับ 3.07 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ เท่ากับ 6.30% ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ เท่ากับ 1.41% และมีปริมาณวิตามินซี เท่ากับ 0.70 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมตัวอย่าง สารสกัดจากเปลือกและเนื้อของน้อยหน่าเครือพันธุ์เปลือกสุกสีเหลือง ผลย่อยสีขาวมีความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ 8 ชนิด คือ Bacillus cereus, Lactobacillus plantarum, Staphylococcus aureus และ Streptococcus faecalis แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ Escherichia coli , Pseudomonas aeruginosa , Proteus mirabilis และ Salmonella typhimurium แต่สารสกัดจากเปลือกและเนื้อของน้อยหน่าเครือพันธุ์เปลือกสุกสีเหลือง ผลย่อยสีขาวที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ได้แก่ Candida albicans และ Saccharomyces cerevisiae และเชื้อรา Aspergillus niger แต่สารสกัดจากเปลือกน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดงมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดจากส่วนอื่นๆ และสารสกัดที่ได้จากน้อยหน่าเครือทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ และเชื้อราทดสอบได้ การศึกษาคุณภาพน้ำน้อยหน่าเครือพร้อมดื่มบรรจุขวดที่เก็บรักษาไว้ ณ อุณหภูมิ 4, 15, และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าการเก็บรักษาน้ำน้อยหน่าเครือพร้อมดื่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการรักษาคุณภาพและชะลอการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลชีววิทยา รองลงมาคือ 15 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การเก็บผลิตภัณฑ์น้ำน้อยหน่าเครือบรรจุขวดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ 0 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ, ปริมาณกรด และปริมาณวิตามินซี เท่ากับ 7.10 °Brix, 1.25% และ 15.02 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรตัวอย่าง ตามลำดับ และเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ, ปริมาณกรด, ปริมาณวิตามินซีเท่ากับ 6.33

°Brix, 1.55% และ 8.45 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรตัวอย่าง ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ระหว่างการเก็บรักษาน้ำน้อยหน่าเครือดังกล่าวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ 0 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และยีสต์และรามีค่า 0.52 Log CFU/ml และ 1 Log CFU/ml ตามลำดับ และเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าวนาน 72 ชั่วโมง มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และยีสต์และรามีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 4.22 Log CFU/ml และ 5.43 CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวนยีสต์และราดังกล่าวมีค่าเกินมาตรฐานน้ำผลไม้เข้มข้นของ มผช. แม้การเก็บรักษาน้ำน้อยหน่าเครือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะช่วยรักษาคุณภาพและชะลอการเน่าเสีย แต่การเก็บรักษาไว้นานเกิน 72 ชั่วโมง ทำให้คุณภาพลดต่ำลง

คำสำคัญ : น้อยหน่าเครือ, ความหลากหลายทางชีวภาพ, ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

Abstract

Study on Biodiversity and usefulness of Noina Kreu (*Kadsura* spp.) is the project to support the Plant Genetic Conservation Project under the Royal Initiation of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn (RSPG). The objectives of the research were to explore type, location and habitat of Kadsura fruit, to study physical, chemical and antimicrobial activity of crude extract from Kadsura fruit. Two types of Kadsura yellow peel-white fresh type (YT) and red peel-red fresh type (RT) were found in Chiangrai at latitude 19; 6; 59.4100, longitude 99; 21; 43.4199 and Chiangmai at latitude 19; 8; 1.9100, longitude 98; 39; 17.8599.

The flower were blossom in March – April and the mature fruit of the YT was around October to November while the red RT was matured for harvesting around January. The YT is larger size than that in RT. The dimension and weight of YT were 14.7 × 12.5 cm. and 1.22 kilogram/fruit while the dimension and weight of the RT were 8.8 × 9.7 cm. and 0.28 kilogram, respectively. The L, a, b of color value of YT were L, a, b and oH angle of the outer peel 34.3, 15.9, 26.9 and 60.80 while the L, a, b and oH angle of the inner peel color were 40.4, 20.2, 24.4 and 48.1, respectively. L, a, b and oH angle of RT were 21.8, 20.9. 32.0 and 56.9, respectively. Firmness of YT and RT were 3.99 and 2.82 Kg/cm2. The pH of YT and RT were 2.88 and 3.07. Total soluble solid, tritable acidity and ascorbic acid of YT were 6.43% and 1.64% and 7.22

mg/100m while these values of RT were 6.30%, 1.41% and ascorbic acid 0.70 mg/100mL.

Crude extracts from peel and fresh of Kadsura fruit of YT with ethanol methanol and water were more effectively inhibited eight bacteria (*Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Streptococcus faecaliis, Lactobacillus plantarum, Escherichia coli, Proteus milabilis, Pseudomonas aeruginosa,* and *Sallmonella typhimurium*) than that in RT but these extracts did not inhibit *S. cerevisiae C. albicans* and *A. niger.* Crude extracts from peel and fresh of RT were less effected on bacteria than that in YT extracts. These results reveal essential basic information for conservation and application on food medicinal and other aspects of Kasura fruit in Thailand.

The qualities of the ready-to-drink-fresh Noina Kreu juice stored at 4, 15 and 30 °C for 72 hours were studied. The result showed that the temperature at 4 °C was the best condition of storage to maintain and retard the change of chemical and microbiological quality of juice. The average value of the total soluble solid, titratable acidity and ascorbic acid of the juice stored at 4 °C for 0 hour were 7.10 °Brix, 1.25% and 15.02 mg/100 ml sample, respectively. The average value of the total soluble solid, titratable acidity and ascorbic acid of the juice stored at 4 °C for 72 hour were 6.33 °Brix, 1.55% and 8.45 mg/100 ml sample, respectively. The total viable plate count and yeast and mold count during storage of juice at 4 °C for 0 hour were 0.52 Log CFU/ml and 1 Log CFU/ml, respectively. The total viable plate count and yeast and mold count during storage of juice at 4 °C for 0 hour were increase 4.22 Log CFU/ml and 5.43 Log CFU/ml, respectively. The numbers of microorganism in the juice were higher than that in the Thai Community Product Standard. There for the juice stored at 4 °C for 72 hour may risk to deplete the quality of the juice.

Keywords: Noina Kreu (*Kadsura* spp.), Biodiversity, Antimicrobial activity

การศึกษาความหลากหลายและการใช้ประโยชน์ของน้อยหน่าเครือ (ภายใต้โครงการ อนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี)

พีระศักดิ์ ฉายประสาท[1] บุญส่ง แสงอ่อน[1] พุทธพงษ์ สร้อยเพชรเกษม[1]

[1]คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลาย และการใช้ประโยชน์ของน้อยหน่าเครือ (*Kadsura* spp.) เพื่อสนองโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพพระรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการสำรวจตำแหน่งของน้อยหน่าเครือโดยวิธีการศึกษาจากการสำรวจและเก็บตัวอย่าง และศึกษาคุณภาพทางกายภาพ ทางเคมี และสารต้านจุลินทรีย์จากน้อยหน่าเครือ วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ และทางเคมี พบว่า น้อยหน่าเครือทั้ง 2 สายพันธุ์ อยู่ในเขตจังหวัดเชียงราย พิกัด ; ละติจูด 19; 6; 59.4100 , ลองติจูด 99; 21; 43.4199 และจังหวัดเชียงใหม่ ละติจูด 19; 8; 1.9100 , ลองติจูด 98; 39; 17.8599 ช่วงเวลาการออกดอกของน้อยหน่าเครือทั้ง 2 สายพันธุ์ อยู่ในช่วงเดือนมีนาคม และเริ่มพัฒนาเป็นผลอ่อนประมาณเดือนเมษายน เป็นต้นไป โดยผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว จะสามารถเก็บเกี่ยวผลได้ประมาณเดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิกายน (ในจังหวัดเชียงราย) ส่วนพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดงจะสามารถเก็บเกี่ยวผลได้ประมาณเดือนมกราคม (ในจังหวัดเชียงราย) แต่ถ้าพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดงออกทวายจะสามารถเก็บเกี่ยวผลได้ประมาณช่วงเดือนมีนาคม ซึ่งทั้ง 2 สายพันธุ์พบว่ามีการเจริญอยู่บนหุบเขาที่มีแหล่งน้ำไหลผ่าน ที่ระดับความสูง 1000 เมตรขึ้นไป ขนาดและน้ำหนักของผลน้อยหน่าเครือทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว มีความกว้างเฉลี่ย 14.70 เซนติเมตร ความยาวเฉลี่ย 12.50 เซนติเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ย 1.22 กิโลกรัม สายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง มีความกว้างเฉลี่ย 8.80 เซนติเมตร ความยาวเฉลี่ย 9.70 เซนติเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.28 กิโลกรัม ส่วนการเทียบสี สายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาวบริเวณเปลือกนอกวัดค่าการเทียบสีเฉลี่ยได้ ค่า a* เท่ากับ 15.9 ค่า b* เท่ากับ 26.2 ค่า L* เท่ากับ 34.3 และค่า H° เท่ากับ 60.8 ส่วนบริเวณเปลือกในวัดค่าการเทียบสีเฉลี่ยได้ ค่า a* เท่ากับ 20.2 ค่า b* เท่ากับ 24.4 ค่า L* เท่ากับ 40.4 และค่า H° เท่ากับ 48.1 และบริเวณเนื้อวัดค่าการเทียบสีเฉลี่ยได้ ค่า a* เท่ากับ 10.1 ค่า b* เท่ากับ 40.2 ค่า L* เท่ากับ 46.6 และค่า H° เท่ากับ 72.8 สายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง วัดค่าการเทียบสีบริเวณเปลือกเฉลี่ยได้ ค่า a* เท่ากับ 20.9 ค่า b* เท่ากับ 32.0 ค่า L* เท่ากับ 21.8 และค่า H° เท่ากับ 56.9 โดยน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว

และพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง มีค่าความแน่นเนื้อเฉลี่ยเท่ากับ 3.99 และ 2.82 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ส่วนลักษณะทางเคมีของน้ำน้อยหน่าเครือสดในสายพันธ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว มีค่า pH เท่ากับ 2.88 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ เท่ากับ 6.43% ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ เท่ากับ 1.64% และมีปริมาณวิตามินซี เท่ากับ 7.22 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมตัวอย่าง ส่วนสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง มีค่า pH เท่ากับ 3.07 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ เท่ากับ 6.30% ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ เท่ากับ 1.41% และมีปริมาณวิตามินซี เท่ากับ 0.70 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมตัวอย่าง สารสกัดจากเปลือกและเนื้อของน้อยหน่าเครือพันธุ์เปลือกสุกสีเหลือง ผลย่อยสีขาวมีความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ 8 ชนิด คือ *Bacillus cereus, Lactobacillus plantarum, Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus faecalis* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli , Pseudomonas aeruginosa , Proteus mirabilis* และ *Salmonella typhimurium* แต่สารสกัดจากเปลือกและเนื้อของน้อยหน่าเครือพันธุ์เปลือกสุกสีเหลือง ผลย่อยสีขาวที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ได้แก่ *Candida albicans* และ *Saccharomyces cerevisiae* และเชื้อรา *Aspergillus niger* แต่สารสกัดจากเปลือกน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดงมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดจากส่วนอื่นๆ และสารสกัดที่ได้จากน้อยหน่าเครือทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ และเชื้อราทดสอบได้ การศึกษาคุณภาพน้ำน้อยหน่าเครือพร้อมดื่มบรรจุขวดที่เก็บรักษาไว้ ณ อุณหภูมิ 4, 15, และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าการเก็บรักษาน้ำน้อยหน่าเครือพร้อมดื่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการรักษาคุณภาพและชะลอการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลชีววิทยา รองลงมาคือ 15 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การเก็บผลิตภัณฑ์น้ำน้อยหน่าเครือบรรจุขวดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ 0 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ, ปริมาณกรด และปริมาณวิตามินซีเท่ากับ 7.10 °Brix, 1.25% และ 15.02 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรตัวอย่าง ตามลำดับ และเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ, ปริมาณกรด, ปริมาณวิตามินซีเท่ากับ 6.33 °Brix, 1.55% และ 8.45 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรตัวอย่าง ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ระหว่างการเก็บรักษาน้ำน้อยหน่าเครือดังกล่าวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ 0 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และยีสต์และรามีค่า 0.52 Log CFU/ml และ 1 Log CFU/ml ตามลำดับ และเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าวนาน 72 ชั่วโมง มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและยีสต์และรามีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 4.22 Log CFU/ml และ 5.43 CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวนยีสต์และราดังกล่าวมีค่าเกินมาตรฐานน้ำผลไม้เข้มข้นของ มผช. แม้การเก็บรักษาน้ำน้อยหน่าเครือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะช่วยรักษาคุณภาพและชะลอการเน่าเสีย แต่การเก็บรักษาไว้นานเกิน 72 ชั่วโมง ทำให้คุณภาพลดต่ำลง

คำสำคัญ : น้อยหน่าเครือ, ความหลากหลายทางชีวภาพ, ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

Biodiversity and Usefulness of Noinakreua (*Scarlet kadsura*) (Plant genetic conservation project under the royal initiative of her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn)

Peerasak Chaiprasart [1], Boonsong Saeng-on [1], Puttapong Sroypatkasam [1]

[1]Faculty of Agriculture Natural Resources and Enviroment, Naresuan University

Abstract

Study on Biodiversity and usefulness of Noina Kreu (*Kadsura* spp.) is the project to support the Plant Genetic Conservation Project under the Royal Initiation of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn (RSPG). The objectives of the research were to explore type, location and habitat of Kadsura fruit, to study physical, chemical and antimicrobial activity of crude extract from Kadsura fruit. Two types of Kadsura yellow peel-white fresh type (YT) and red peel-red fresh type (RT) were found in Chiangrai at latitude 19; 6; 59.4100, longitude 99; 21; 43.4199 and Chiangmai at latitude 19; 8; 1.9100, longitude 98; 39; 17.8599.

The flower were blossom in March – April and the mature fruit of the YT was around October to November while the red RT was matured for harvesting around January. The YT is larger size than that in RT. The dimension and weight of YT were 14.7 x 12.5 cm. and 1.22 kilogram/fruit while the dimension and weight of the RT were 8.8 x 9.7 cm. and 0.28 kilogram, respectively. The L, a, b of color value of YT were L, a, b and ^{o}H angle of the outer peel 34.3, 15.9, 26.9 and 60.80 while the L, a, b and ^{o}H angle of the inner peel color were 40.4, 20.2, 24.4 and 48.1, respectively. L, a, b and ^{o}H angle of RT were 21.8, 20.9. 32.0 and 56.9, respectively. Firmness of YT and RT were 3.99 and 2.82 Kg/cm^{2}. The pH of YT and RT were 2.88 and 3.07. Total soluble solid, tritable acidity and

ascorbic acid of YT were 6.43% and 1.64% and 7.22 mg/100m while these values of RT were 6.30%, 1.41% and ascorbic acid 0.70 mg/100mL.

Crude extracts from peel and fresh of Kadsura fruit of YT with ethanol methanol and water were more effectively inhibited eight bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus faecaliis*, *Lactobacillus plantarum*, *Escherichia coli*, *Proteus milabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Sallmonella typhimurium*) than that in RT but these extracts did not inhibit *S. cerevisiae C. albicans* and *A. niger*. Crude extracts from peel and fresh of RT were less effected on bacteria than that in YT extracts. These results reveal essential basic information for conservation and application on food medicinal and other aspects of Kasura fruit in Thailand.

The qualities of the ready-to-drink-fresh Noina Kreu juice stored at 4, 15 and 30 °C for 72 hours were studied. The result showed that the temperature at 4 °C was the best condition of storage to maintain and retard the change of chemical and microbiological quality of juice. The average value of the total soluble solid, titratable acidity and ascorbic acid of the juice stored at 4 °C for 0 hour were 7.10 °Brix, 1.25% and 15.02 mg/100 ml sample, respectively. The average value of the total soluble solid, titratable acidity and ascorbic acid of the juice stored at 4 °C for 72 hour were 6.33 °Brix, 1.55% and 8.45 mg/100 ml sample, respectively. The total viable plate count and yeast and mold count during storage of juice at 4 °C for 0 hour were 0.52 Log CFU/ml and 1 Log CFU/ml, respectively. The total viable plate count and yeast and mold count during storage of juice at 4 °C for 0 hour were increase 4.22 Log CFU/ml and 5.43 Log CFU/ml, respectively. The numbers of microorganism in the juice were higher than that in the Thai Community Product Standard. There for the juice stored at 4 °C for 72 hour may risk to deplete the quality of the juice.

Keywords: Noina Kreu (*Kadsura* spp.), Biodiversity, Antimicrobial activity

คำนำ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมานแผ่นดิน ให้ศึกษาความหลากหลาย การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวน้อยหน่าเครือ ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.) เป็นโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริของสมเด็จพรเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารีที่ทรงมีพระราชดำริให้มีการดำเนินการอนุรักษ์พืชพรรณของประเทศ โดยได้มีการจัดสร้างธนาคารพืชพรรณสำหรับการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ การเก็บรักษาโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมทั้งการศึกษาด้านชีวโมเลกุล นอกจากนี้ ยังมีการดำเนินกิจกรรมในการปกปักพันธุกรรมพืช สำรวจเก็บรวบรวม ปลูกรักษา อนุรักษ์และใช้ประโยชน์ ศูนย์ข้อมูลพันธุกรรมพืช วางแผนพัฒนาพันธุ์พืช สร้างจิตสำนึกในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช และกิจกรรมพิเศษสนับสนุนการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาความหลากหลาย การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวน้อยหน่าเครือ โดยการสำรวจความหลากหลายของน้อยหน่าเครือทั้งชนิดและปริมาณ เพื่อเป็นฐานในการวิจัยและพัฒนาความหลากหลาย การอนุรักษ์ และการใช้ประโยชน์ของน้อยหน่าเครือให้ครบทุกด้านในระยะต่อไป อันจะเป็นประโยชน์ต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยในวงกว้างต่อไป และเพื่อสนองโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริของสมเด็จพรเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.)

(ผศ.ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาท)

หัวหน้าโครงการวิจัย

พฤศจิกายน 2561

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
คำนำ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฏ
โครงการวิจัยย่อย 1	
บทที่ 1 บทนำ	
- ที่มาและความสำคัญ	1
- วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
- ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
- ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
- น้อยหน่าเครือ	5
- การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Tissue Culture)	6
- เอเอฟแอลพี (AFLP: Amplified fragment length polymorphism)	7
- การปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวที่ดีและเหมาะสม (Good Handling Practice, GHP)	8
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	
- การสำรวจตำแหน่ง จำนวนและชนิดของน้อยหน่าเครือ	10
- การจำแนกชนิดของน้อยหน่าเครือ จังหวัดเชียงราย	10
- การศึกษาการจำแนกลักษณะทางนิเวศวิทยาของน้อยหน่าเครือ จังหวัดเชียงราย	10
- ศึกษาลักษณะระยะพัฒนาการของต้นอ่อนน้อยหน่าเครือในสภาพปลอดเชื้อ	11

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

- ศึกษาผลของฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BA ที่มีต่อการเจริญเติบโตของน้อยหน่าเครือในสภาพปลอดเชื้อ 11
- ศึกษาผลของธาตุอาหารต่อการเจริญเติบโตของของน้อยหน่าเครือ 12
- การสกัด DNA ใช้วิธีการดัดแปลงของ Doyle และ Doyle (1990) 12
- การตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอ 12
- การทำปฏิกิริยา AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ใช้วิธีการของ VOS และคณะ (1995) 13
- การตรวจผลปฏิริยา AFLP 13

บทที่ 4 ผลการทดลอง

- การสำรวจตำแหน่ง จำนวนและชนิดน้อยหน่าเครือ 17
- การจำแนกชนิดของน้อยหน่าเครือ จังหวัดเชียงราย 18
- การศึกษาการจำแนกลักษณะทางนิเวศวิทยาของน้อยหน่าเครือ จังหวัดเชียงราย 18
- ศึกษาลักษณะระยะพัฒนาการของต้นอ่อนน้อยหน่าเครือในสภาพปลอดเชื้อ 22
- ศึกษาผลของฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BA ที่มีต่อการเจริญเติบโตของน้อยหน่าเครือในสภาพปลอดเชื้อ 23
- การสกัด DNA ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอแบบ Kit และการตรวจสอบผล 25
- การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลองและการตรวจสอบผล 25

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

- สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 30

บรรณานุกรม 32

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

โครงการวิจัยย่อย 2

บทที่ 1 บทนำ

- ที่มาและความสำคัญ 1
- วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 2
- ขอบเขตของโครงการวิจัย 2
- ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 3
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

- น้อยหน่าเครือ 4
- สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) 5
- สารต้านจุลินทรีย์และกลไกการยับยั้งเชื้อ 10
- จุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร 13
- วิธีจุลินทรีย์วิเคราะห์ (Microbial assay) 20
- วิธีการเตรียมน้ำผลไม้ 21

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

- การสำรวจและการเก็บตัวอย่างน้อยหน่าเครือ 23
- ศึกษาลักษณะทางเคมีและกายภาพของผลน้อยหน่าเครือ 23
- วิธีการสกัดสารจากผลน้อยหน่าเครือ 28
- การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 28
- การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 33
- วิธีการสกัดน้ำน้อยหน่าเครือสดพร้อมดื่ม 33

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลอง

- การสำรวจตำแหน่ง จำนวนและชนิดน้อยหน่าเครือ 36
- ศึกษาลักษณะทางเคมีและกายภาพของผลน้อยหน่าเครือ 38
- การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 43
- การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 46
- วิธีการสกัดน้ำน้อยหน่าเครือสดพร้อมดื่ม 55

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

- สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 56
- ข้อเสนอแนะ 61

บรรณานุกรม 62

สารบัญตาราง

หน้า

โครงการวิจัยย่อยที่ 1

ตาราง 1 ชนิดของน้อยหน่าเครือ พื้นที่ที่พบ และแหล่งเจริญเติบโตของน้อยหน่าเครือ 17

ตาราง 2 ลักษณะของดอก กลีบดอก และเกสรของน้อยหน่าเครือ 2 สายพันธุ์ 20

ตาราง 3 ลักษณะผลของน้อยหน่าเครือ 2 สายพันธุ์ 20

ตาราง 4 ไพรเมอร์จำนวน 5 ชนิด ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส 26

โครงการวิจัยย่อยที่ 2

ตาราง 1 ชนิดของน้อยหน่าเครือ พื้นที่ที่พบ และแหล่งเจริญเติบโตของน้อยหน่าเครือ 36

ตาราง 2 ระยะเวลาการออกดอก ติดผล และการเก็บเกี่ยวผลผลิตของน้อยหน่าเครือ 37

ตาราง 3 ขนาดและน้ำหนักของผลน้อยหน่าเครือ 38

ตาราง 4 ลักษณะของดอก กลีบดอก และเกสรของน้อยหน่าเครือ 2 สายพันธุ์ 39

ตาราง 5 ลักษณะผลของน้อยหน่าเครือ 2 สายพันธุ์ 40

ตาราง 6 ลักษณะสีของเปลือกและเนื้อน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว 42

ตาราง 7 ลักษณะสีของเปลือกน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง 42

ตาราง 8 ลักษณะความแน่นเนื้อของเปลือกน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว และพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง 42

ตาราง 9 ลักษณะทางเคมีของน้อยหน่าเครือ 43

ตาราง 10 องค์ประกอบทางโภชนาการของเนื้อน้อยหน่าเครือ 43

ตาราง 11 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดจากน้อยหน่าเครือ (สายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง) จำแนกตามตัวอย่างตัวทำละลาย 45

ตาราง 12 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง Clear zone(mm) ของจุลินทรีย์ที่เกิดจากการยับยั้งของสารสกัดหยาบจากเปลือกน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาวที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ 47

ตาราง 13 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง Clear zone (mm) ของจุลินทรีย์ที่เกิดจากการยับยั้งของสารสกัดหยาบ จากเนื้อน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาวที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ 48

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตาราง 14 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง Clear zone (mm) ของจุลินทรีย์ที่เกิดจากการยับยั้งของสารสกัดหยาบ จากเมล็ดน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาวที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ 48

ตาราง 15 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง Clear zone (mm) ของจุลินทรีย์ที่เกิดจากการยับยั้งของสารสกัดหยาบจากเปลือกน้อยหน่าเครือพันธุ์เปลือกสีแดง ที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ 49

ตาราง 16 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง Clear zone (mm) ของจุลินทรีย์ที่เกิดจากการยับยั้งของสารสกัดหยาบจากเนื้อน้อยหน่าเครือพันธุ์เปลือกสีแดงที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ 50

ตาราง 17 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากเปลือก เนื้อ และเมล็ดน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาวที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ 51

ตาราง 18 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกและเนื้อน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดงที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ 52

ตาราง 19 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือก เนื้อ และเมล็ดของน้อยหน่าเครือ (สายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง) ที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ 54

สารบัญภาพ

หน้า

โครงการวิจัยย่อยที่ 1

ภาพ 1 ลักษณะเส้นทางการเดินรถ 18

ภาพ 2 ลักษณะเส้นทางการเดินเท้า 18

ภาพ 3 ลักษณะต้นของน้อยหน่าเครือ 19

ภาพ 4 ลักษณะใบของน้อยหน่าเครือ 19

ภาพ 5 ลักษณะการออกดอกของน้อยหน่าเครือ 19

ภาพ 6 ลักษณะการออกผลของน้อยหน่าเครือ 19

ภาพ 7 ต้นพันธุ์น้อยหน่าเครือสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 22

ภาพ 8 การฟอกฆ่าเชื้อยอดน้อยหน่าเครือเพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 23

ภาพ 9 ยอดน้อยหน่าเครือที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ 24

ภาพ 10 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของซาเมี่ยงจำนวน 15 ตัวอย่าง 25

ภาพ 11 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ
ผลผลิตพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ Scot 1 26

ภาพ 12 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ
ผลผลิตพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ Scot 2 27

ภาพ 13 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ
ผลผลิตพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ Scot 3 27

ภาพ 14 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ
ผลผลิตพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ RAPD-K1 28

ภาพ 15 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ
ผลผลิตพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ RAPD-OPA02 28

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

โครงการวิจัยย่อยที่ 2

ภาพ 1 ลักษณะเส้นทางการเดินรถ 37

ภาพ 2 ลักษณะเส้นทางการเดินเท้า 37

ภาพ 3 ลักษณะต้นของน้อยหน่าเครือ 38

ภาพ 4 ลักษณะใบของน้อยหน่าเครือ 38

ภาพ 5 ลักษณะการออกดอกของน้อยหน่าเครือ 38

ภาพ 6 ลักษณะการออกผลของน้อยหน่าเครือ 38

ภาพ 7 clear zone ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดหยาบของน้อยหน่าเครือ 49

ภาพ 8 clear zone ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดหยาบของน้อยหน่าเครือ 51

มหาวิทยาลัยนเรศวร

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการ

การศึกษาความหลากหลาย การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวน้อยหน่าเครือ

Biodiversity, Micro Propagation and Post harvest technology of Noinakreua (*Kadsura* spp.)

คณะผู้วิจัย สังกัด

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาท[1]

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญส่ง แสงอ่อน[2]

นายพุทธพงษ์ สร้อยเพชรเกษม[1]

[1] ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร

คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

[2] ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

สนับสนุนโดย

งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

ประจำปีงบประมาณ 2560

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.) ได้เริ่มดำเนินการในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2535 เป็นโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริของสมเด็จพรเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารีที่ทรงมีพระราชดำริให้มีการดำเนินการอนุรักษ์พืชพรรณของประเทศ โดยได้มีการจัดสร้างธนาคารพืชพรรณสำหรับการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ การเก็บรักษาโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมทั้งการศึกษาด้านชีวโมเลกุล นอกจากนี้ ยังมีการดำเนินกิจกรรมในการปกปักพันธุกรรมพืช สำรวจเก็บรวบรวม ปลูกรักษา อนุรักษ์และใช้ประโยชน์ ศูนย์ข้อมูลพันธุกรรมพืช วางแผนพัฒนาพันธุ์พืช สร้างจิตสำนึกในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช และกิจกรรมพิเศษสนับสนุนการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช

น้อยหน่าเครือ ชื่อวิทยาศาสตร์ *Kadsura* sp. ชื่อสามัญ Scarlet kadsura น้อยหน่าเครือชนิด *Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith จัดอยู่ใน Family Schisandraceae เป็นไม้เลื้อยซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองทางภาคใต้ของจีน ส่วนเถาและ รากของพืชชนิดนี้ถูกนำมาใช้เป็นยาจีนโบราณ ใช้ในการรักษาโรคกระเพาะและลำไส้และโรคไขข้ออักเสบ (Liu and Li, 1995a) *Kadsura coccinea* หรือรู้จักในชื่อว่าเสือดำ "black tiger" ประชาชนในบางจังหวัดของประเทศจีน เช่น จังหวัดกวางสี กุ้ยโจว ยูนนาน และมณฑลกวางตุ้ง นำมาบริโภคเป็นผลไม้สด บางครั้งนำมาแปรรูปเป็นน้ำผลไม้และไวน์ จึงเป็นผลไม้ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ นอกจากนี้มีการศึกษาวิจัยการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์พบว่าสารของ lignans และ triterpenoids ในลำต้นหรือสารสกัดจากเมล็ด มีฤทธิ์ต่อ ต้านเนื้องอก โรคเอดส์ มีคุณสมบัติต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเมื่อทดสอบด้วยวิธี antilipid peroxidation และเป็นสารต้านไวรัสตับอักเสบ (Liu and Li, 1995b; Gao et al., 2008) ผล *Kadsura coccinea* มีสาร phenolic acids สาร flavonoids และสาร tannins ซึ่งสารเหล่านี้จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เข้มข้น (Heim et al., 2002; Sroka and Cisowski, 2003) ในประเทศไทย Lecto, K and Saunders, R.M.K. รายงานการค้นพบ *Kadsura ananosma* Kerr ในวันที่ 10 เมษายน พ.ศ. 2478 ในพื้นที่เทือกเขาถนนธงชัย เป็นแนวเขาทางด้านตะวันตกเฉียงใต้ของดอยอินทนนท์ ซึ่งมีการบันทึกการค้นพบใน Kew Bulletin ประเทศอังกฤษ Kerr, A.F.G. รายงานการค้นพบ *Kadsura verrucosa* ในพื้นที่เขาค้อ ประเทศไทย เมื่อวันที่ 1 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2462 สำหรับการเกิดโรคกับ Scarlet kadsura ในฐานข้อมูลโรคพืชประเทศญี่ปุ่นมีรายงานว่าพบการเกิดโรคกับ Scarlet kadsura ดังนั้นในปี ค.ศ. 1917 พบเชื้อ *Mycosphaerella shinojimesis* Hara ในปี ค.ศ. 1941 พบเชื้อ *Meliola kadsurae* W. Yamamoto ในปี ค.ศ. 1950 พบโรคใบจุดสาหร่าย (*Cephaleuros virescens* Kunze)

และในปี ค.ศ. 1988 มีการเข้าทำลายของเชื้อ *Pestalotiopsis versicolor* (Spegazzini) Steyaert สำหรับน้อยหน่าเครือในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการศึกษาด้านโรคพืชวิทยา

ปัญหาจากแมลงศัตรูพืชก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิต โดยเฉพาะความสูญเสียทางเศรษฐกิจซึ่งเป็นข้อจำกัดในการส่งออกต่อประเทศที่มีกฎหมายกักกันพืช เช่น ญี่ปุ่น สหภาพยุโรป เป็นต้น จึงต้องมีวิธีการจัดการแมลงศัตรูพืชที่ดีก่อนส่งออกไปประเทศเหล่านี้ ซึ่งการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดนั้นก่อให้เกิดปัญหามลพิษตกค้างและทำลายสภาพแวดล้อม การใช้สารสกัดจากพืชเช่น เมล็ดน้อยหน่าเครือในควบคุมแมลงศัตรูดังกล่าวจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาปฏิบัติแบบชีวภาพเพื่อไม่ให้เป็นอันตรายต่อทั้งคน สัตว์และสิ่งแวดล้อม เพื่อให้เกิดความยั่งยืนในการผลิตเพื่อการส่งออกต่อไป

ปัจจุบันพบว่าสารสกัดจากพืชหลายชนิด มีแนวโน้มที่จะนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงได้ จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุน ไพร 9 ชนิด คือ เมล็ดน้อยหน่า ใบน้อยหน่า (*Annona squamosa* Linn.) และรากหนอนตายหยาก (*Stemona tuberose* Lour) ที่มีต่อลูกน้ำยุงลายและยุงรำคาญ และพบว่า สารสกัดจากเมล็ดน้อยหน่า (*Annona squamosa* Linn.) มีประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุงลาย และยุงรำคาญดีที่สุดให้ค่า LC_{50} เท่ากับ 16.61 และ 4 มิลลิกรัม/ลิตร (เพ็ญนภา และคณะ, 2549) ชุลีพร และคณะ (2551) ได้ศึกษาการใช้น้ำสกัดชีวภาพหนอนตายหยากควบคุมลูกน้ำยุงลายได้ดี นอกจากนี้น้ำมันระเหยจากทำมัง (*Litsea elliptica* Blume) เชียดใบใหญ่ (*Cinnamomum mollissimum* Blume) และตะไคร้หอม (*Cymbopogon nardus* Rendle) มีประสิทธิภาพไล่ยุงลายได้ดี สามารถป้องกันยุงกัดได้ 96.6 เปอร์เซนต์ (Jantan and Zaki, 1998) ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากขมิ้น (*Curcuma Longa* Linn) มะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) และแมงลัก (*Ocimum basilicum* L.f. var. citratum Back.) มีประสิทธิภาพเป็นสารไล่แมลง โดยสามารถไล่ยุงได้ในระยะเวลา 3-8 ชั่วโมง (Tawatsin, et al., 2001)

โรคฟันผุมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในช่องปากหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *Streptococcus mutants* ที่มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม เป็นปัญหาทางการแพทย์และทางสาธารณสุขที่สำคัญในชุมชนของประเทศไทย การควบคุมโรคต้องอาศัยการดูแลสุขภาพช่องปากโดยการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสารเคมีและยาปฏิชีวนะจากการนำเข้าจากต่างประเทศ การค้นหาสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรที่มีผลข้างเคียงน้อยกว่าจึงเป็นทางเลือกใหม่และเป็นทางเลือกเสริมที่จะนำมาประโยชน์ได้ในระดับชุมชน น้อยหน่าเครือเป็นพืชในกลุ่มอนุรักษ์ที่ยังขาดข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการนำมาใช้ประโยชน์ทางเภสัชวิทยาอยู่มาก จึงมีความจำเป็นที่ต้องทำการศึกษาให้ครบทุกด้าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อการใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์ต่อปัญหาโรคติดเชื้อที่ยังมีผลกระทบต่อสุขภาพของประชากรในชุมชนในวงกว้าง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1) เพื่อสนองโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.)

2) เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา และพิกัดภูมิศาสตร์ของเนื้อหน่าเครือ

3) เพื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอเอฟแอลพี (AFLP) ในการตรวจสอบสายพันธุ์น้อยหน่าเครือ เพื่อใช้ในการเก็บรักษาพันธุกรรมต่อไปและใช้เป็นหลักฐานในการจดทะเบียนคุ้มครอง

4) เพื่อศึกษาการขยายพันธุ์น้อยหน่าเครือโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

5) เพื่อให้บริการสืบค้นข้อมูลสารสนเทศทางอินเตอร์เน็ต http://www.agi.nu.ac.th/ postharvest/ เกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรม การผลิตและการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวน้อยหน่าเครือ

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา และพิกัดภูมิศาสตร์ เพื่อใช้ในการอนุรักษ์ และการขยายพันธุ์น้อยหน่าเครือด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตลอดจนเทคโนโลยีการผลิตและหลังการเก็บเกี่ยวเชิงพาณิชย์

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพืช โดยการสำรวจ การจัดจำแนกชนิดของน้อยหน่าเครือที่ไม่สามารถจะจำแนกได้อย่างชัดเจน จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์ต่อการผสมพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์น้อยหน่าเครือในอนาคต

การผลิตและการประเมินการสูญเสียหลังการเก็บเกี่ยวตั้งแต่เก็บเกี่ยวจนกระทั่งการวางจำหน่าย ตลอดจนการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งจะเป็นแนวทางในการปรับปรุงคุณภาพน้อยหน่าเครือให้มีคุณภาพ และสรรพคุณทางยาดีสม่ำเสมอ เป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศมากขึ้น อันจะเป็นการเพิ่มรายได้แก่เกษตรกรผู้ปลูกน้อยหน่าเครือและผู้สนใจ ตลอดจนการเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันของประเทศในการส่งออกอีกแนวทางหนึ่งด้วย

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ผลสำเร็จของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ

1) สามารถจำแนกชนิดของน้อยหน่าเครือ

2) เพื่อทราบข้อมูลการขยายพันธุ์น้อยหน่าเครือ โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3) อนุรักษ์พันธุ์น้อยหน่าเครือ ในเขตพื้นที่ จังหวัดเชียงราย เพื่อเป็นแหล่งทางพันธุกรรมของท้องถิ่น

4) ทราบข้อมูลเกี่ยวกับจำนวน และพันธุ์น้อยหน่าเครือ ที่พบในเขตพื้นที่ จังหวัดเชียงราย

5) นำเสนอผลงานในการประชุมในระดับชาติ ที่มีการตีพิมพ์บน proceedings

1.5.2 หน่วยงานที่นำผลวิจัยไปใช้ประโยชน์

1) โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี

2) เกษตรกร ผู้สนใจทั่วไปในเขตภาคเหนือตอนล่าง

3) นักวิจัยในสถาบันต่างๆ

4) นิสิต นักศึกษาในสถาบันต่าง ๆ

5) นักวิชาการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.) ได้เริ่มดำเนินการในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2535 เป็นโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริของสมเด็จพรเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารีที่ทรงมีพระราชดำริให้มีการดำเนินการอนุรักษ์พืชพรรณของประเทศ โดยได้มีการจัดสร้างธนาคารพืชพรรณสำหรับการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ การเก็บรักษาโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมทั้งการศึกษาด้านชีวโมเลกุล นอกจากนี้ ยังมีการดำเนินกิจกรรมในการปกปักพันธุกรรมพืช สำรวจเก็บรวบรวม ปลูกรักษา อนุรักษ์และใช้ประโยชน์ ศูนย์ข้อมูลพันธุกรรมพืช วางแผนพัฒนาพันธุ์พืช สร้างจิตสำนึกในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช และกิจกรรมพิเศษสนับสนุนการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช น้อยหน่าเครือ เป็นหนึ่งในพืชที่อยู่ภายใต้โครงการสำรวจความหลากหลายของพันธุ์พืชอนุรักษ์ (อพ.สธ.) เป็นไม้เถาเลื้อยในตระกูล Schisandraceae พบบนพื้นที่สูงเป็นพืชหายาก รูปร่างผลและกลิ่นคล้ายน้อยหน่า ผลสุกรับประทานเป็นผลไม้ มีงานวิจัยพบมีคุณค่าทางสารอาหารและยังมีสารยับยั้งอนุมูลอิสระสูง จีนใช้เป็นยาสมุนไพรโดยใช้ส่วนเถาและรากแก้โรคทางเดินอาหารและไขข้ออักเสบ ปัจจุบันพบเป็นยาที่ทรงคุณค่าในการป้องกันเนื้องอก ต้านเชื้อ HIV ไวรัสตับอักเสบ

น้อยหน่าเครือ ชื่อวิทยาศาสตร์ *Kadsura* sp. ชื่อสามัญ *Scarlet kadsura*

น้อยหน่าเครือชนิด *Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith จัดอยู่ใน Family Schisandraceae เป็นไม้เลื้อยซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองทางภาคใต้ของจีน ส่วนเถาและ รากของพืชชนิดนี้ถูกนำมาใช้เป็นยาจีนโบราณ ใช้ในการรักษาโรคกระเพาะและลำไส้และโรคไขข้ออักเสบ (Liu and Li, 1995a) *Kadsura* coccinea หรือรู้จักในชื่อว่า เสือดำ “black tiger” ประชาชนในบางจังหวัดของประเทศจีน เช่น จังหวัดกวางสี กุ้ยโจว ยูนนาน และมณฑลกวางตุ้ง นำมาบริโภคเป็นผลไม้สด บางครั้งนำมาแปรรูปเป็นน้ำผลไม้และไวน์ จึงเป็นผลไม้ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ นอกจากนี้มีการศึกษาวิจัยการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์พบว่าสารของ lignans และ triterpenoids ในลำต้นหรือสารสกัดจากเมล็ด มีฤทธิ์ต่อ ต้านเนื้องอก โรคเอดส์ มีคุณสมบัติต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเมื่อทดสอบด้วยวิธี antilipid peroxidation และเป็นสารต้านไวรัสตับอักเสบ (Liu and Li, 1995b; Gao et al., 2008) ผล *Kadsura coccinea* มีสาร phenolic acids สารflavonoids และสาร tannins ซึ่งสารเหล่านี้จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เข้มข้น

(Heim et al., 2002; Sroka and Cisowski, 2003) ในประเทศไทย Lecto, K and Saunders, R.M.K. รายงานการค้นพบ *Kadsura ananosma* Kerr ในวันที่ 10 เมษายน พ.ศ. 2478 ในพื้นที่เทือกเขาถนนธงชัย เป็นแนวเขาทางด้านตะวันตกเฉียงใต้ของดอยอินทนนท์ ซึ่งมีการบันทึกการค้นพบใน Kew Bulletin ประเทศอังกฤษ Kerr, A.F.G. รายงานการค้นพบ *Kadsura verrucosa* ในพื้นที่เขาค้อ ประเทศไทย เมื่อวันที่ 1 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2462 สำหรับการเกิดโรคกับ Scarlet kadsura ในฐานข้อมูลโรคพืชประเทศญี่ปุ่น มีรายงานว่าพบการเกิดโรคกับ *Scarlet kadsura* ดังนั้นในปี ค.ศ. 1917 พบเชื้อ *Mycosphaerella shinojimesis* Hara ในปี ค.ศ. 1941 พบเชื้อ *Meliola kadsurae* W. Yamamoto ในปี ค.ศ. 1950 พบโรคใบจุดสาหร่าย (*Cephaleuros virescens* Kunze) และในปี ค.ศ. 1988 มีการเข้าทำลายของเชื้อ *Pestalotiopsis versicolor* (Spegazzini) Steyaert สำหรับน้อยหน่าเครือในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการศึกษาด้านโรคพืชวิทยา

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Tissue Culture)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Tissue Culture) เปนอีกวิธีหนึ่งของเทคโนโลยีด้านการเกษตรชนิดอื่นที่นอกเหนือจากพืชสวน พืชไร่ไม้ดอก เชนการเพาะเลี้ยงเยื่อสมุนไพรเพราะวิธีการนี้สามารถขยายพันธุ์ได้เร็วและจำนวนมาก แตมีข้อเสียอยู่คือต้นทุนในการจัดตั้งห้องปฏิบัติการคอนข้างสูง และขั้นตอนในการปฏิบัติการขยายพันธุคอนข้างยากถ้าเทียบกับการขยายพันธุ์ไม้ดอก กล้วยไม้หรือไม้ประดับ เพราะวาสมุนไพรในแตละชนิดจะมียาง ซึ่งในยางนั้นจะมีตัวยาแตกต่างกันไป และตัวยาในยางของสมุนไพรนี่เองที่มักจะทำปฏิกริยากับธาตุอาหารสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงต้นพืชสมุนไพร บางครั้งอาจทำให้นั้นไม่เจริญเติบโตไม่แตกกอไม่ดูดสารอาหาร และจะทำให้พืชนั้นตายในที่สุดแต่ถ้าหากทดลองสูตรอาหารได้สูตรที่เหมาะสมกับพืชนั้นๆ ก็จะเจริญเติบโตได้ดีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือการนำส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชไม่วาจะเป็นส่วนเนื้อเยื่ออวัยวะต่างๆของพืชหรือเซลล์มาเลี้ยงในสภาพที่ปลอดเชื่อจุลินทรียโดยมการควบคุมสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิแสงความชื้นส่วนต่างๆ ของพืชเหล่านี้จะสามารถเจริญเติบโตพัฒนาเป็นต้นใหม่โดยที่พืชทุกต้นจะมีลักษณะเหมือนกันด้วยเหตุนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงมีประโยชน์อย่างกว้างขวางในหลายสาขา เช่น ทางด้านการเกษตรทำให้สามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว หรือสามารถผลิตต้นพันธุ์ที่ปลอดเชื้อได้จำนวนมากและยังสามารถสร้างพันธุ์ใหม่ ๆ ได้โดยการเพาะเลี้ยงคัพภะ (Embryo) อับละอองเกสร (Another Culture)นอกจากนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชยังมีความสำคัญ สำหรับการเก็บรักษาพันธุ์พืชในสภาพปลอดเชื้อได้

เอเอฟแอลพี

เอเอฟแอลพี (AFLP: Amplified fragment length polymorphism) เป็นการประยุกต์อีกแบบโดยนำเอนไซม์ตัดจำเพาะมาตัด DNA ที่ต้องการตรวจสอบก่อนเพื่อให้ได้ชิ้น DNA ขนาดต่าง ๆ กัน คล้ายกับการทำเทคนิค RFLP แล้วจึงเพิ่มปริมาณ DNA เพียงบางชิ้นเนื่องจากถ้าเพิ่มปริมาณ DNA ที่ตัดได้ทั้งหมดจะมีปริมาณมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้ในการทำด้วยเทคนิค RFLP ใช้วิธีไฮบริไดเซชั่นเพื่อให้โพรบจับกับ DNA ที่จำเพาะเพียง 1-2 หรือจำนวนน้อยชิ้นในการทำ AFLP ใช้วิธีต่อ adapter เข้าไปที่ปลายของชิ้น DNA ที่ตัดไว้ทั้งหมดแล้วเลือกเพิ่มปริมาณเพียงบางชิ้นด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเหมือนกับส่วน adapter ที่ต่อเข้าไปต่อด้วยลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งตัดของเอนไซม์และเพิ่มเบสอื่น ๆ อีก 1-4 เบสทางปลาย 3' ส่วนของเบสที่เพิ่มเข้าไปนี้เรียกว่าเบสคัดเลือก (selective base) ซึ่งจะทำให้ไพรเมอร์จับกับDNA ต้นแบบหรือชิ้น DNA ที่ตัดไว้ได้เพียงบางส่วนเฉพาะชิ้นที่มีลำดับเบสส่วนที่อยู่ติดกับตำแหน่งตัดจำเพาะสอดคล้องกับเบสคัดเลือกที่เพิ่มเข้าไปเท่านั้น ดังนั้นถ้าเพิ่มเบสคัดเลือก 1 เบสไพรเมอร์นั้นจะมีโอกาสจับได้สมบูรณ์กับชิ้น DNA ประมาณ 1 ใน 4 ของชิ้น DNA ทั้งหมดด้วยวิธีการนี้เมื่อเพิ่มเบสคัดเลือกมากขึ้นจำนวนชิ้น DNA ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้จะลดลงเรื่อย ๆ ประมาณ 4 เท่าทุก ๆ 1 เบสที่เพิ่มเข้าไป (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)

การตัด DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะใช้เอนไซม์ 2 ชนิด adapter ที่ใช้จึงมี 2 ชนิดไพรเมอร์ก็จะมี 2 ชนิดตามชนิดของ adapter และตำแหน่งตัดจำเพาะหลังจากการปรับจำนวนเบสคัดเลือกที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ให้เหมาะสมกับ genome ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาจำนวนชิ้น DNA ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้จะพอเหมาะสำหรับการแยกและตรวจสอบโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสนอกจากจำนวนแล้วยังสามารถปรับเปลี่ยนชนิดของเบสคัดเลือกได้ทำให้สามารถใช้ไพรเมอร์หลายแบบนำมาเพิ่มปริมาณ DNA ได้ลายพิมพ์ต่าง ๆ กันเทคนิค AFLP จึงตรวจสอบ DNA ได้ครั้งละหลายตำแหน่งมีลักษณะแบบสุ่มทั้ง genome ทำได้โดยไม่ต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตมาก่อนเช่นเดียวกับเทคนิค RAPD (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2545). จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวที่ดีและเหมาะสม (Good Handling Practice, GHP) จะช่วยลดการสูญเสียหลังการเก็บเกี่ยวและยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้ได้แก่

1. การใช้อุณหภูมิต่ำในการเก็บรักษา

การเก็บรักษาเป็นการปรับปัจจัยต่าง ๆ รอบผลิตผลเพื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด และในขณะเดียวกันสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่จะเข้าทำลายผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยวนั้น เนื่องจากการลดอุณหภูมิเป็นการลดอัตราการหายใจและเมตาบอลิซึมต่าง ๆ ทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาผักและผลไม้สดได้ หากอุณหภูมิต่ำเกินไปอาจเป็นอันตรายต่อพืช เรียกว่าอาการ Chilling Injury (CI) ลักษณะที่ปรากฏได้แก่ การเน่าเสีย สีผิดปกติ รอยช้ำ รอยบุ๋ม เนื้อฉ่ำน้ำผิดปกติ การสุกไม่สม่ำเสมอ เป็นต้น (Will, et. al, 1981)

2. **การเคลือบผิว** เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลิตผลได้ ซึ่งจัดเป็นการเก็บรักษาผลิตผลแบบดัดแปลงสภาพบรรยากาศ เพราะการเคลือบผิวจะเป็นการจำกัดการแลกเปลี่ยนก๊าซภายในผลิตผลทำให้ปริมาณก๊าซ CO_2 ซึ่งเกิดจากการหายใจมีมาก และมีผลไปยับยั้งการทำงานของเอทิลีน การใช้สารเคลือบผิวควรเลือกชนิดและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมกับผลไม้แต่ละชนิด (จริงแท้, 2538)

ไคโตแซน (chitosan) เป็นอนุพันธุ์ของไคติน (chitin) ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ชีวภาพในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่มีมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส (cellulose) ไคตินมีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของพืช แต่ไคตินเป็นโพลีเมอร์ในสัตว์ ไคตินและไคโตแซนเป็นองค์ประกอบของเซลล์ในลักษณะเส้นใย (fiber) ที่ทำหน้าที่ยึดสารต่าง ๆ ให้เป็นแผ่นและเป็นเส้นที่แข็งแรงสามารถห่อหุ้มอวัยวะของสิ่งมีชีวิตได้ ทำให้มีคุณสมบัติป้องกันการเข้าทำลายของโรคหลังการเก็บเกี่ยวในไม้ผลหลายชนิด ได้แก่ สตรอเบอรี่ ลำไย และลิ้นจี่เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถถูกย่อยสลายได้ง่ายตามธรรมชาติ ดังนั้นจึงเป็นสารที่มีความปลอดภัยในการใช้กับมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อม (Austin, et. al, 1981)

3. การยืดอายุการเก็บรักษาด้วยสารเคมี

การใช้ 1-Methylcyclopropene (1-MCP) ความเข้มข้นที่ต่ำสามารถยับยั้งการทำงานของเอทิลีนและยืดอายุการเก็บรักษาผักและผลไม้ได้ คุณสมบัติของ 1-MCP ได้แก่ สถานะเป็นก๊าซมีมวล

โมเลกุลเท่ากับ 54 สูตรโครงสร้างคือ C_4H_6 และมีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอทิลีนโดยจับกับ ethylene receptor การใช้ 1-MCP ในทางการค้ากับผลไม้หลายชนิดในสหรัฐอเมริกาโดยมีชื่อการค้าว่า Smartfresh® ซึ่งจัดจำหน่ายโดยบริษัท AgroFresh และผลิตโดยบริษัท Rohm and Hass (SpringHouse, PA) การใช้สาร1-MCP ในต่างประเทศพบว่า ผลไม้หลายชนิดได้แก่ แอปเปิล น้อยหน่า มะเขือเทศ มะม่วง กล้วย อะโวกราโด ท้อ เนคทาลีน บ๊วย และสาลี่ เป็นต้น สามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้ดังกล่าวได้ขึ้นอยู่กับ ระยะเวลาและวิธีการใช้ที่เหมาะสม พันธุกรรม และความบริบูรณ์ของผลิตผล (Blankenship et.al, 2003) นอกจากนี้จากการตรวจสอบความปลอดภัยและความเป็นพิษต่อผู้บริโภค ตลอดจนผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในสหรัฐอเมริกาพบว่า การใช้ 1-MCP ในอัตราที่ต่ำไม่พบความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตโดยทดสอบให้หนูสูดดมสาร 1-MCP จากการรมในภาชนะปิด พบว่า LC_{50} เท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรหรือ 1.126 ppm ของสารออกฤทธิ์ และไม่พบการเป็นพิษเฉียบพลัน (Environmental Protection Agency, 2002)

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย ได้แก่ ขั้นตอนการสำรวจตำแหน่ง จำนวน และจำแนกชนิดของน้อยหน่าเครือ ศึกษาการขยายพันธุ์น้อยหน่าเครือโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตรวจสอบสายพันธุ์น้อยหน่าเครือโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอเอฟแอลพี (AFLP) และการศึกษาคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของน้อยหน่าเครือ

<u>การทดลองที่ 1</u> การสำรวจตำแหน่ง จำนวนและชนิดของน้อยหน่าเครือ

การศึกษาจำนวนน้อยหน่าเครือ จังหวัดเชียงราย โดยใช้เครื่องมือชี้พิกัดจากดาวเทียมหรือ GPS (Global Positional System) โดยใช้วิธี

1.1 วิธีสำรวจแบบ point-centered quarter method โดยทำการกำหนดเส้นฐานเพื่อใช้เป็นฐานในการวางแนวสำรวจ การวางแนวสำรวจจะทำตั้งฉากออกไปจากเส้นฐาน กำหนดระยะทางระหว่างแนวสำรวจแต่ละแนวเท่ากับ 50 เมตร และกำหนดระยะทางระหว่างจุดสุ่ม แต่ละจุดเท่ากับ 50 เมตร เมื่อได้จุดสุ่มแล้วสร้างเส้นแนวตัดกันเป็นมุมฉาก เพื่อแบ่งพื้นที่รอบจุดออกเป็น 4 quadrants อาจยึดแนวเข็มทิศเป็นหลัก แล้วทำการวัดระยะจากจุดสุ่มไปยังน้อยหน่าเครือที่อยู่ใกล้ที่สุดแต่ละ quadrants เพื่อทำการคำนวณหาตำแหน่งและความหนาแน่นของน้อยหน่าเครือ

1.2 วิธีสำรวจแบบ random survey การเดินทางสำรวจพื้นที่ทั่วไปตามวิธีการเดินป่า โดยไม่กำหนดเขตพื้นที่

<u>การทดลองที่ 2</u> การจำแนกชนิดของน้อยหน่าเครือ จังหวัดเชียงราย

ทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของน้อยหน่าเครือ ที่พบในจังหวัดเชียงราย จากนั้นนำตัวอย่างแห้ง รูปภาพดิจิตอลและข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่สำรวจพบ มาทำการจัดจำแนกชนิดและตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์ เปรียบเทียบกับตัวอย่างแห้งของสำนักงานหอพรรณไม้

<u>การทดลองที่ 3</u> การศึกษาการจำแนกลักษณะทางนิเวศวิทยาของน้อยหน่าเครือ จังหวัดเชียงราย

3.1 ความแตกต่างของสิ่งยึดอาศัยตามธรรมชาติ

3.2 การศึกษาความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของน้อยหน่าเครือ

นำตัวอย่างน้อยหน่าเครือ ที่สำรวจพบในจังหวัดเชียงราย มาศึกษาข้อมูลทางด้านความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาในเชิงปริมาณ โดยดูลักษณะลำต้น ก้าน ใบ ความกว้างและความยาวของใบ ก้านดอก กลีบดอก และเหง้า

3.3 ลักษณะสภาพแวดล้อมของน้อยหน่าเครือ

การศึกษาลักษณะสภาพแวดล้อมที่น้อยหน่าเครือ อาศัยอยู่ทำได้โดยพิจารณาจากความแตกต่างของสังคมพืช และความแตกต่างของความเข้มของแสงบริเวณที่พบ โดยการวัดความเข้มแสงใช้เครื่องมือวัดแสง (Lux-meter)

<u>การทดลองที่ 4</u> ศึกษาลักษณะระยะพัฒนาการของต้นอ่อนน้อยหน่าเครือในสภาพปลอดเชื้อ

1) นำยอดอ่อนหน่าเครือมาล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย Sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยวางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD โดยมีปัจจัย 2 ปัจจัย

ปัจจัยที่1 คือ ความเข้มข้นของ Sodium hypochlorite 0, 5. 10 เปอร์เซ็นต์

ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาในการแช่ฟอกฆ่าเชื้อ 0, 5, 10, 15 นาที

2) บันทึกผลการทดลอง ได้แก่ อัตราการรอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ

3) บันทึกการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ ทุกเดือนเป็นเวลา 3 เดือน ได้แก่ ความสูง เส้นผ่านศูนย์กลาง ทรงพุ่ม จำนวนใบ

<u>การทดลองที่ 5</u> ศึกษาผลของฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BA ที่มีต่อการเจริญเติบโตของน้อยหน่าเครือในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้ออายุ 3 เดือน มาเลี้ยงบนสูตรอาหาร สูตร MS (Murashige and Skoog) ที่เติม BA 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 ppm ร่วมกับ NAA 0, 1, 2, 3 และ 4 ppm วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD ทำทั้งหมด 10 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด และเมื่อครบ 4 เดือนแล้ว นำต้นอ่อน (seedling) มาล้างวุ้นออกให้หมด จากนั้นชั่งน้ำหนักสดของต้นกล้า วัดความสูงของลำต้นที่ยาวที่สุด นับจำนวนใบ วัดความยาวของรากที่ยาวที่สุด จากนั้นนำข้อมูลที่บันทึกได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ 99 เปอร์เซ็นต์

<u>การทดลองที่ 6</u> ศึกษาผลของธาตุอาหารต่อการเจริญเติบโตของของน้อยหน่าเครือ

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำทั้งหมด 10 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น นำต้นอ่อนขนาดความสูง 2-3 เซนติเมตร มาล้างวุ้นออกให้หมด ก่อนนำไปปลูกในกระถางที่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินแตกต่างกัน บันทึกอัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตทุก 1 เดือน เป็นเวลา 3 เดือน ได้แก่ ความสูงของลำต้น จำนวนใบ ความยาวของราก จากนั้นนำข้อมูลที่บันทึกได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

<u>การทดลองที่ 7</u> การสกัด DNA ใช้วิธีการดัดแปลงของ Doyle และ Doyle (1990)

1) นำใบพืชประมาณ 0.5 กรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด (คล้ายผงแป้ง) นำมาใส่หลอดขนาด 1.5 ml ประมาณครึ่งหลอด

2) เติม Extraction buffer (3X CTAB buffer) 650 µl นำไป incubate ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง (ใน water bath)

3) นำมาสกัดด้วย Chloroform : isoamyl (24 : 1) 500 µl ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ /นาที เป็นเวลา 15 นาที ย้ายสารละลายตอนบนใส่หลอดใหม่

4) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol (หรือ absolute ethanol) ปริมาตร 750 µl แช่เย็นไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ /นาที เป็นเวลา 10 นาที

5) ล้างตะกอนดีเอ็นเอ โดยใช้ 70% ethanol ปริมาตร 500 µl ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ /นาที เป็นเวลา 5 นาที ประมาณ 2-3 ครั้ง นำตะกอนดีเอ็นเอมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

6) ละลายดีเอ็นเอใน สารละลาย TE buffer (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0)) ปริมาตร 300 µl และเติม RNaseA 10 µl

7) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 30 µl, 3M Sodium acetate และ 600 µl 95% ethanol ที่แช่เย็น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ /นาที เป็นเวลา 1 นาที ล้างก้อนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 µl 2 ถึง 3 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง

8) ละลายดีเอ็นเอในสารละลาย TE 50 ul และเติม RNaseA 5 µl เก็บที่ $4^{\circ}c$

<u>การทดลองที่ 8</u> การตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอ

หาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เตรียมไว้โดยนำไปเปรียบเทียบกับ DNA ที่มีความเข้มข้นมาตรฐาน (Lambda DNA standard) โดยนำมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8% เมื่อได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างแล้ว เจือจางดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้น 100 ng/µl

<u>การทดลองที่ 9</u> การทำปฏิกิริยา AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ใช้วิธีการของ VOS และคณะ (1995)

1.1 Digestion

นำดีเอ็นเอของพืชซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ 0.5 µg มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Eco*RI (5 unit) และ *Tru* 9I (5 unit), (*Tru* 9I เป็นเอนไซม์ที่ตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกับ *Mse* I) ในบัฟเฟอร์ ชนิด A (Borhringer Mannheim) (33 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM KCl และ 0.5 mM DTT) ในปริมาตร 40 µl ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.2 Ligation

นำดีเอ็นเอที่ถูกย่อยแล้วมาต่อด้วย adapter ที่มีลำดับเบสตรงกับที่จดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด (*Eco*RI – adapter และ *Mse* I – adapter) โดยการเติมบัฟเฟอร์ 10 µl ที่ประกอบด้วย 5 pmol *Eco*RI-adapter, 50 pmol *Mse* I –adapter, 30 mM Tris-HCl pH 7.8 , 10 mM DTT , 1 mM ATP (10Xligase buffer) (Promega) และ 1 unit T4 DNA ligase ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 10 เท่า เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

1.3 Pre-amplification (PCR I)

นำดีเอ็นเอที่ทำการย่อยและต่อกับ adapter แล้ว และเจือจางลง 10 เท่า ปริมาตร 5 µl นำมาทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Primer ที่มี selective nucleotide เบส 1 เบส โดยใช้ primer ด้าน *Eco*RI และ *Mse*I ปริมาณ 70 นาโนกรัม ในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย, 50 mM $MgCl_2$, 10x PCR buffer, 2.5mM dNTPs และ Taq DNA polymerase 1 unit ในปริมาตรรวม 50 µl ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (เครื่อง PCR) มีรายละเอียดของอุณหภูมิดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 56 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 20 รอบ เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 10 เท่า และเก็บที่ –20 องศาเซลเซียส

1.4 Amplification (PCR II)

นำDNA ที่ได้จากขั้นตอน PCR I 3 µl ทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยการคัดเลือกชิ้นที่จะเพิ่มปริมาณด้วย primer ที่เป็นเบสคู่สมกับ adapter แต่มีปลายยื่นจาก adapter ด้วย 3’ จำนวน 3 เบส (+ 3 selective nucleotide) ปฏิกิริยาประกอบด้วย *Eco*RI และ *Mse*I primer ปริมาณ 30 นาโนกรัม, 50 mM $MgCl_2$, 10x PCR buffer, 2.5mM dNTPs และ Taq DNA polymerase 0.4 unit ปริมาตรที่ใช้ 20 µl ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที โดย

การลดอุณหภูมิทุก 1 องศาเซลเซียส จนกระทั่งอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส (เฉพาะขั้นตอน annealing) 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 34 รอบ ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ เมื่อเสร็จปฏิกิริยาเติม 10 µl loading dye (95% formamide, 10 mM NaOH, 0.05% Bromophenol Blue และ 0.05% xylene cyanol)

<u>การทดลองที่ 10</u> การตรวจผลปฏิริยา AFLP

นำดีเอ็นเอ 10 µl จาก PCR II ที่เติม loading dye แล้วมาตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณด้วย 1% agarose ใน 0.5x TBE โดยสังเกตจากแถบดีเอ็นเอประมาณแถบสีของ Bromphenol Blue จากนั้นนำมาวิเคราะห์แยกแถบดีเอ็นเอโดยการผ่าน 4.5% denatured polyacrylamide gel electrophoresis โดยใช้ดีเอ็นเอที่ทำให้เป็นเส้นเดี่ยวที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที และลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วโดยแช่บนน้ำแข็งโดยใช้ปริมาตร 5 µl ใช้ 1x TBE เป็นบัฟเฟอร์ กระแสไฟฟ้า 40 วัตต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลาประมาณ 45 นาที (หรือจนกว่าสี xylene cyanol คือสีที่อยู่ด้านบน จะเคลื่อนลงมาประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของเจล) จากนั้นแยกกระจกทั้งสองออกจากกันแล้วนำไปย้อมสีด้วยวิธี Silver staining โดยการแช่ย่าเบาๆ ใน 10%acetic 20 นาที(เมื่อใช้เสร็จแล้วเก็บ10%acetic ไว้ก่อน) จากนั้น ล้างด้วยน้ำเปล่า 3 ครั้งๆละ 2 นาที และแช่ย่าเบาๆ ในสารละลาย Silver staining (1g Silver nitrate และ 1.5 ml 37% formaldehyde ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร) เป็นเวลา 30 นาที นำมาให้เกิดแถบสีด้วย developer solution (30g Na_2Co_3 , 1.5 ml 37% formaldehyde, 2 mg $Na_2S_2O_3$. $5H_2O$ ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร) ที่แช่เย็น แช่ย่าจนปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจน แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 10 % acetic acid ในปริมาตรที่เท่ากัน ล้างด้วยน้ำเปล่า 2 นาที ทิ้งไว้ในอากาศจนแห้ง

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. เลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic bands) โดยให้1 แทนแถบที่ปรากฏในตำแหน่ง (loci) นั้นๆ และ 0 แทนตำแหน่งที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

2. นำมาหาค่า Similarity coefficient โดยใช้ค่าสหสัมพันธ์ของ Dice (1945) = 2Nx,y/ Nx+Ny โดยที่ Nxy คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันระหว่างพันธุ์ที่ x และพันธุ์ที่ y, Nx และ Ny เป็นจำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีทั้งหมดในพันธุ์ที่ x และพันธุ์ที่ y

3. จัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA และใช้โปรแกรม NTSYS-pc Ver.2.11 (Rohlf, 2000) ในการวิเคราะห์

<u>การทดลองที่ 11</u> การศึกษาผลของการใช้อุณหภูมิต่ำเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาน้อยหน่าเครือ

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) มี 6 ซ้ำๆ ละ 0.5 กิโลกรัม ที่มีขนาดใกล้เคียงกันและอยู่ในระยะเดียวกัน แบ่งเป็นกรรมวิธีดังต่อไปนี้

ทรีตเมนต์ 1 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
ทรีตเมนต์ 2 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส
ทรีตเมนต์ 3 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส
ทรีตเมนต์ 4 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

นำมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ และบันทึกผลการทดลอง ดังการทดลองที่ 1

<u>การทดลองที่ 12</u> ผลของการใช้จิบเบอเรลลิน (GA $_3$) ร่วมกับพลาสติก LDPE ที่มีต่อคุณภาพของน้อยหน่าเครือ

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) มี 6 ซ้ำๆ ละ 1 กิโลกรัม ที่มีขนาดใกล้เคียงกันและอยู่ในระยะเดียวกัน ทำการให้สาร จิบเบอเรลลิน (Gibberellin, GA $_3$) และบรรจุในถุงพลาสติกชนิด LDPE ขนาด 12x24 นิ้ว แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2 แบ่งเป็นกรรมวิธีดังนี้

ทรีตเมนต์ 1 Control
ทรีตเมนต์ 2 จุ่มสารGA $_3$ 10 ppm + พลาสติก LDPE
ทรีตเมนต์ 3 จุ่มสารGA $_3$ 100 ppm + พลาสติก LDPE
ทรีตเมนต์ 4 จุ่มสารGA $_3$ 1000 ppm + พลาสติก LDPE

นำมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ และบันทึกผลการทดลอง ดังการทดลองที่ 1

<u>การทดลองที่ 13</u> ผลของการใช้สาร 1-Methylcyclopropene ที่มีต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของน้อยหน่าเครือ

คัดเลือกผลน้อยหน่าเครือที่ไม่มีตำหนิ และทำการให้สาร 1-Methylcyclopropene (1-MCP) โดยการรม (fumigation) ในภาชนะที่ปิดสนิทและไม่มีอากาศรั่วไหล ที่อุณหภูมิห้องและความชื้นสัมพัทธ์ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามระยะเวลาที่กำหนด จากนั้นเก็บรักษาผลน้อยหน่าเครือที่อุณหภูมิต่างๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ factorial experiment in Complete Block Design (CBD) มี 6 ซ้ำๆ ละ 0.5 กิโลกรัม ประกอบด้วย 3 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 ความเข้มข้นของสาร 1-Methylcyclopropene (1-MCP) มี 4 ระดับ คือ 0 0.01 0.1 และ 1.0 ไมโครลิตร/ลิตร

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาของการรมสาร 1-Methylcyclopropene (1-MCP) มี 4 ระดับคือ 0 1 2 3 และ 4 ชั่วโมง

ปัจจัยที่ 3 อุณหภูมิการเก็บรักษาที่ความชื้นสัมพัทธ์ 98 เปอร์เซ็นต์ มี 2 ระดับ คือ 10 และ 15 องศาเซลเซียส

นำมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ และบันทึกผลการทดลอง ดังการทดลองที่ 1

<u>การทดลองที่ 14</u> ผลของการใช้สารไคโตแซนที่มีต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของน้อยหน่าเครือ

คัดเลือกผลน้อยหน่าเครือที่ไม่มีตำหนิ และมีขนาดใกล้เคียงกันและอยู่ในระยะเดียวกัน วางแผนการทดลองแบบ Complete Block Design (CBD) มี 6 ซ้ำๆ ละ 0.5 กิโลกรัม แบ่งเป็นกรรมวิธีดังต่อไปนี้

ทรีตเมนต์ 1 Control
ทรีตเมนต์ 2 เคลือบสารไคโตแซนความเข้มข้น 0.5%
ทรีตเมนต์ 3 เคลือบสารไคโตแซนความเข้มข้น 1.0%
ทรีตเมนต์ 4 เคลือบสารไคโตแซนความเข้มข้น 2.0%
นำมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ และบันทึกผลการทดลอง ดังการทดลองที่ 1

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การทดลองที่ 1 การสำรวจตำแหน่ง จำนวนและชนิดน้อยหน่าเครือ

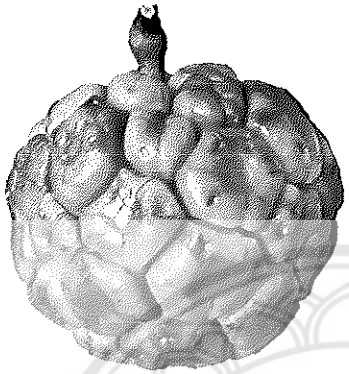
1) การสำรวจตำแหน่งของพื้นที่ ลักษณะการเจริญและชนิดของน้อยหน่าเครือ (ดังตาราง 1) พบว่า พื้นที่ที่พบสายพันธุ์น้อยหน่าเครือผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว มีอยู่ 3 ที่ คือ 1) บ้านขุนลาว ต.เจดีย์ใหม่ อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย พิกัด ; ละติจูด 19; 6; 59.4100 , ลองติจูด 99; 21; 43.4199 2) ต.ป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ พิกัด : ละติจูด 19; 8; 1.9100 , ลองติจูด 98; 39; 17.8599 3) บ้านป่าเหมี้ยง ต.แจ้ซ้อน อ.ปาน จ. ลำปาง ส่วนสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง จะพบที่ ต.ป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ พิกัด : ละติจูด 18; 54; 36.6100 ,ลองติจูด 99; 14; 44.9799 ซึ่งทั้ง 2 สายพันธุ์พบว่ามีการเจริญอยู่บนหุบเขาที่มีแหล่งน้ำไหลผ่าน ที่ระดับความสูง 1000 เมตรขึ้นไป (ตาราง 1)

ตาราง 1 ชนิดของน้อยหน่าเครือ พื้นที่ที่พบ และแหล่งเจริญเติบโตของน้อยหน่าเครือ

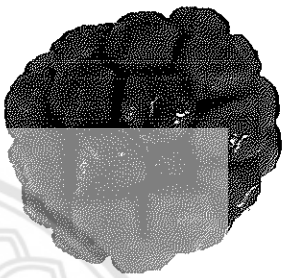
พันธุ์น้อยหน่าเครือ	พื้นที่ที่พบน้อยหน่าเครือ	พิกัดทางภูมิศาสตร์		แหล่งเจริญเติบโตของน้อยหน่าเครือ
		Latitude	Longitude	
ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว	1) บ้านขุนลาว ต.เจดีย์ใหม่ อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย	19; 6; 59.4100	99; 21; 43.4199	เจริญเติบโตอยู่บนหุบเขาที่มีแหล่งน้ำไหลผ่าน ที่ความสูงระดับ 1000 เมตรขึ้นไป
	2) ต.ป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่	19; 8; 1.9100	98; 39; 17.8599	
	3) บ้านป่าเหมี้ยง ต.แจ้ซ้อน อ.ปาน จ.ลำปาง	-	-	
ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง	1) ต.ป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่	18; 54; 36.6100	99; 14; 44.9799	เจริญเติบโตอยู่บนหุบเขาที่มีแหล่งน้ำไหลผ่าน ที่ความสูงระดับ 1000 เมตรขึ้นไป

4.2 การทดลองที่ 2 การจำแนกชนิดของน้อยหน่าเครือ จังหวัดเชียงราย

การจำแนกชนิดของน้อยหน่าเครือ จังหวัดเชียงราย พบน้อยหน่าเครือ 2 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว มีความกว้าง 14.70 เซนติเมตร ยาว 12.50 เซนติเมตร และมีน้ำหนัก 1.22 กิโลกรัม ส่วนสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง มีความกว้าง 8.80 เซนติเมตร ยาว 9.70 เซนติเมตร และมีน้ำหนัก 0.28 กิโลกรัม



ลักษณะผลสุกเปลือกสีเหลือง

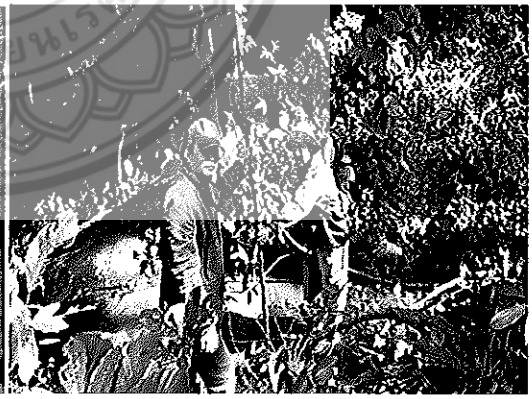


ลักษณะผลสุกเปลือกสีแดง

4.3 การทดลองที่ 3 การศึกษาการจำแนกลักษณะทางนิเวศวิทยาของน้อยหน่าเครือ **จังหวัดเชียงราย**

2) ภาพการสำรวจน้อยหน่าเครือ

ภาพ 1 ลักษณะเส้นทางการเดินรถ



ภาพ 2 ลักษณะเส้นทางการเดินเท้า

ภาพ 3 ลักษณะต้นของน้อยหน่าเครือ

ภาพ 4 ลักษณะใบของน้อยหน่าเครือ

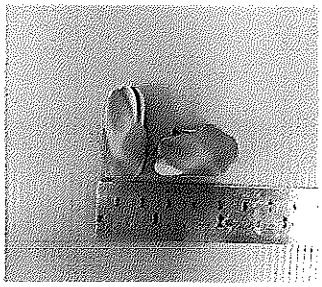
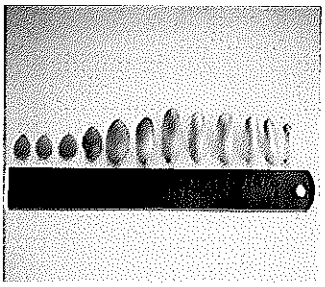
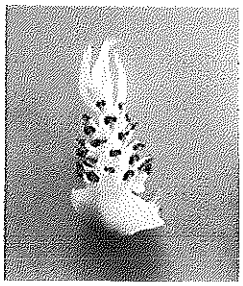
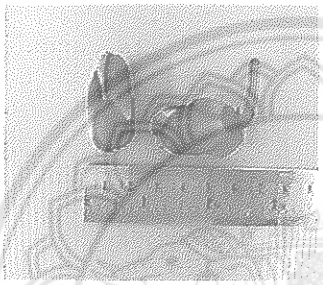
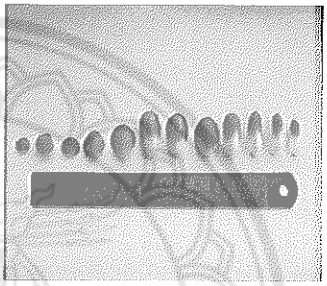
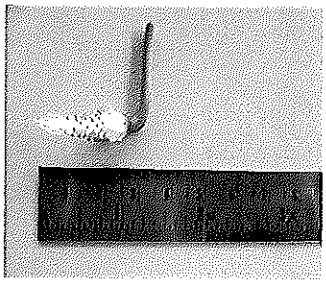
ภาพ 5 ลักษณะการออกดอกของน้อยหน่าเครือ

ภาพ 6 ลักษณะการออกผลของน้อยหน่าเครือ

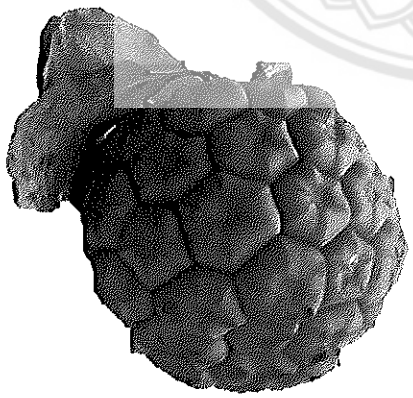
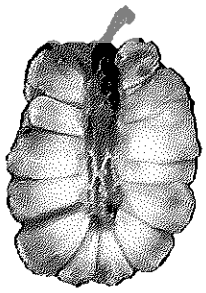
ลักษณะดอกและผลน้อยหน่าเครือ

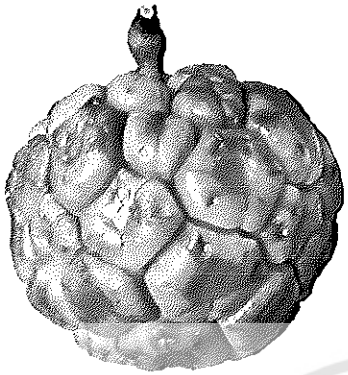
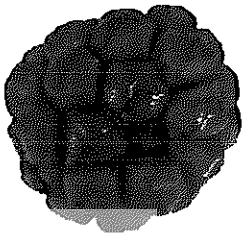
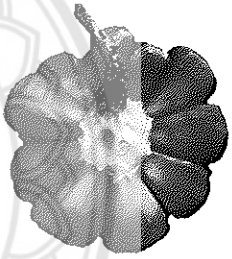
พบว่า ลักษณะดอกน้อยหน่าเครือของทั้ง 2 สายพันธุ์ มีเอกลักษณ์เฉพาะ คือ พันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว จะมีกลีบดอกส่วนนอกเป็นสีเขียว กลีบดอกส่วนในเป็นสีขาว ปลายกลีบดอกเป็นสีแดง ส่วนพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดงจะมีกลีบดอกด้านนอกเป็นสีแดงทั้งหมด ส่วนกลีบดอกด้านในส่วนบนมีสีแดง ส่วนกลีบดอกด้านล่างเป็นสีขาว โดยทั้ง 2 สายพันธุ์จะมีกลีบดอกทั้งหมดประมาณ 12 กลีบ ในส่วนของเกสรจะมีทั้งเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียในดอกเดียวกัน ซึ่งเกสรตัวเมียจะอยู่ส่วนปลายของดอก (ตาราง 2) ลักษณะผลของน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาวและพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง โดยทั้ง 2 สายพันธุ์ มีลักษณะเปลือกหนา และมีแกนกลาง ในส่วนของสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว ผลดิบเปลือกด้านนอกจะมีสีเขียว เมื่อผลสุกเปลือกด้านนอกจะมีสีเหลืองอ่อน และเปลือกด้านในมีสีชมพู ลักษณะผลย่อยเนื้อในสีขาว เมล็ดมีลักษณะคล้ายรูปหัวใจสีน้ำตาลเข้ม ส่วนสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง ผลดิบเปลือกด้านนอกจะมีสีเขียว เมื่อผลสุกเปลือกด้านนอกและด้านในจะมีสีแดง ลักษณะผลย่อยเนื้อในสีแดง เมล็ดมีลักษณะคล้ายรูปหัวใจสีน้ำตาลเข้ม (ตาราง 3)

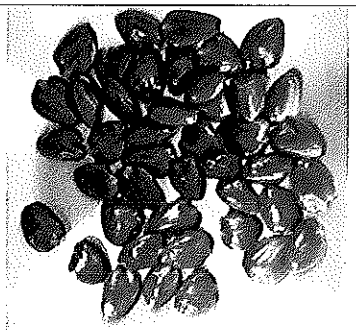
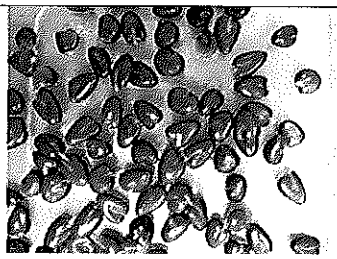
ตาราง 2 ลักษณะของดอก กลีบดอก และเกสรของน้อยหน่าเครือ 2 สายพันธุ์

พันธุ์น้อยหน่าเครือ	ลักษณะ		
	ดอก	กลีบดอก	เกสร
ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว			
ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง			

ตาราง 3 ลักษณะผลของน้อยหน่าเครือ 2 สายพันธุ์

สายพันธุ์น้อยหน่าเครือ	
ผลดิบเปลือกสีเขียว ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว	ผลดิบเปลือกสีเขียว ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง
 ลักษณะผลดิบเปลือกสีเขียว	 ลักษณะผลดิบเปลือกสีเขียว

<table>
<tr><th colspan="2">สายพันธุ์น้อยหน่าเครือ</th></tr>
<tr><th>ผลดิบเปลือกสีเขียว ผลสุกเปลือกสีเหลือง
ผลย่อยสีขาว</th><th>ผลดิบเปลือกสีเขียว ผลสุกเปลือกสีแดง
ผลย่อยสีแดง</th></tr>
<tr><td> 
ลักษณะผลสุกเปลือกสีเหลือง</td><td> 
ลักษณะผลสุกเปลือกสีแดง</td></tr>
<tr><td>
ลักษณะเนื้อในผลสุก</td><td> 
ลักษณะเนื้อในผลสุก</td></tr>
<tr><td>
ลักษณะผลย่อยเนื้อในสีขาว</td><td>
ลักษณะผลย่อยเนื้อในสีแดง</td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
</table>

สายพันธุ์น้อยหน่าเครือ	
ผลดิบเปลือกสีเขียว ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว	ผลดิบเปลือกสีเขียว ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง
 ลักษณะเมล็ด	 ลักษณะเมล็ด

4.4 การทดลองที่ 4 ศึกษาลักษณะระยะพัฒนาการของต้นอ่อนน้อยหน่าเครือใน**สภาพปลอดเชื้อ**

นำยอดอ่อนน้อยหน่าเครือมาล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย Sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยวางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD โดยมีปัจจัย 2 ปัจจัย

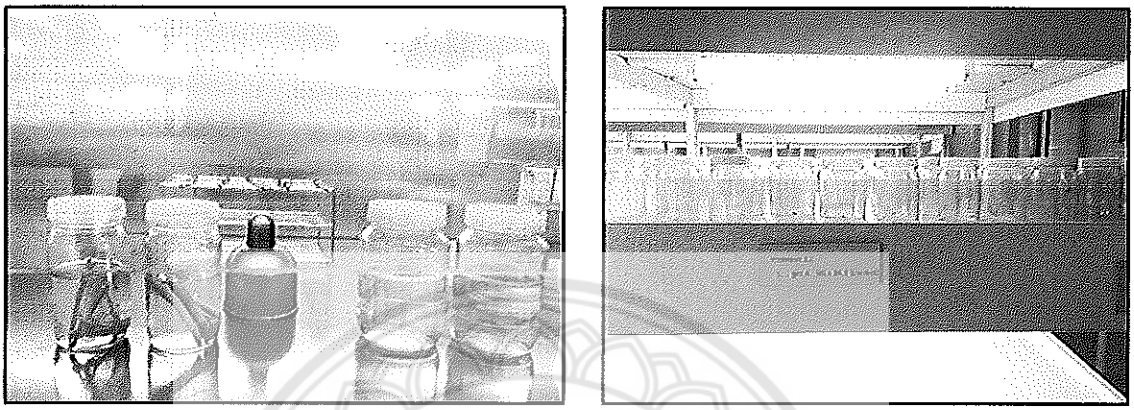
ปัจจัยที่1 คือ ความเข้มข้นของ Sodium hypochlorite 0, 5. 10 เปอร์เซ็นต์

ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาในการแช่ฟอกฆ่าเชื้อ 0, 5, 10, 15 นาที

ภาพ 7 ต้นพันธุ์น้อยหน่าเครือสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ทำการคัดเลือกต้นน้อยหน่าเครือสำหรับเป็นต้นพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควรคัดเลือกจากลักษณะที่มีความต้านทานโรคโดยนำส่วนของยอดอ่อนมาล้างทำความสะอาดฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วน เริ่มจากการล้างด้วยน้ำไหล ตัดแต่งเศษวัสดุและเนื้อเยื่อยอดอ่อน ทำการตัดยอดอ่อนให้มีขนาดประมาณ 2

เซนติเมตรควรล้างด้วยความระมัดระวังด้วยน้ำสบู่แล้วล้างด้วยน้ำไหลจนสะอาดฟอกฆ่าเชื้อด้วย 2 % sodium hypochlorite เป็นเวลา 20 นาที ภายใต้สภาวะสุญญากาศ (vacuum conditions) แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง นำตัวอย่างชิ้นส่วนที่มีขนาด 0.2–0.5 เซนติเมตร จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ



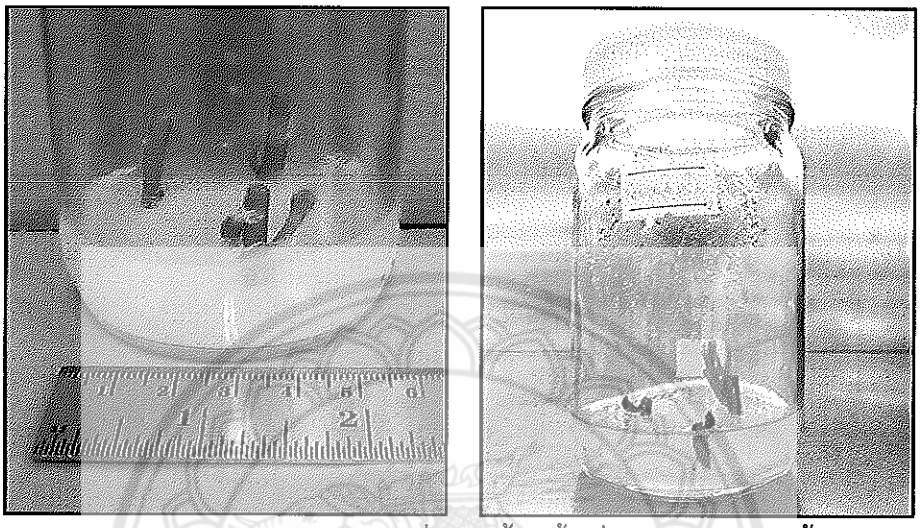
ภาพ 8 การฟอกฆ่าเชื้อยอดน้อยหน่าเครือเพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

4.5 การทดลองที่ 5 ศึกษาผลของฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BA ที่มีต่อการเจริญเติบโตของน้อยหน่าเครือในสภาพปลอดเชื้อ

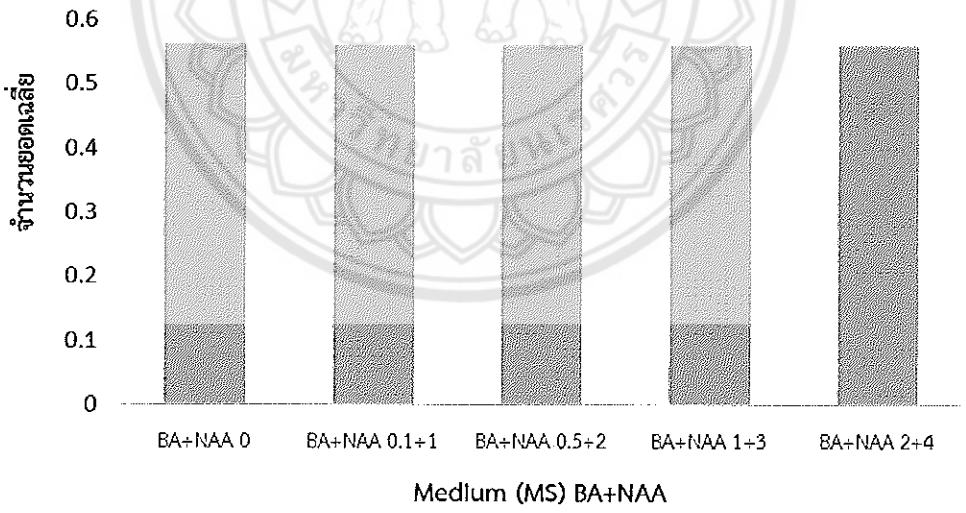
นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้ออายุ 3 เดือน มาเลี้ยงบนสูตรอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) ที่เติม BA 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 ppm ร่วมกับ NAA 0, 1, 2, 3 และ 4 ppm วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD ทำทั้งหมด 10 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด และเมื่อครบ 4 เดือนแล้ว นำต้นอ่อน (seedling) มาล้างวุ้นออกให้หมด จากนั้นชั่งน้ำหนักสดของต้นกล้า วัดความสูงของลำต้นที่ยาวที่สุด นับจำนวนใบ วัดความยาวของรากที่ยาวที่สุด จากนั้นนำข้อมูลที่บันทึกได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ 99 เปอร์เซ็นต์

Medium (MS)	Plant growth regulator (mg/l) BA + NAA
A (Control)	0
B	0.1 + 1
C	0.5 + 2
D	1.0 + 3
E	2.0 + 4

ต้นน้อยหน่าเครือนั้นอยู่ในระหว่างเพาะเลี้ยงอยู่ในห้องปลอดเชื้อเพื่อรอการเจริญเติบโตเพียงพอที่จะนำมาเพิ่มจำนวน และชักนำให้เกิดยอด และพัฒนารากต่อไปโดยเมื่อเจริญเติบโต และปลอดเชื้อเรียบร้อยแล้วจะย้ายลงอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ส่งผลให้เกิดราก จำนวนต้น เพื่อให้ได้ต้นพันธุ์ชาเมี่ยงที่เจริญเติบโตพร้อมย้ายออกปลูกในธรรมชาติได้



ภาพ 9 ยอดน้อยหน่าเครือที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ

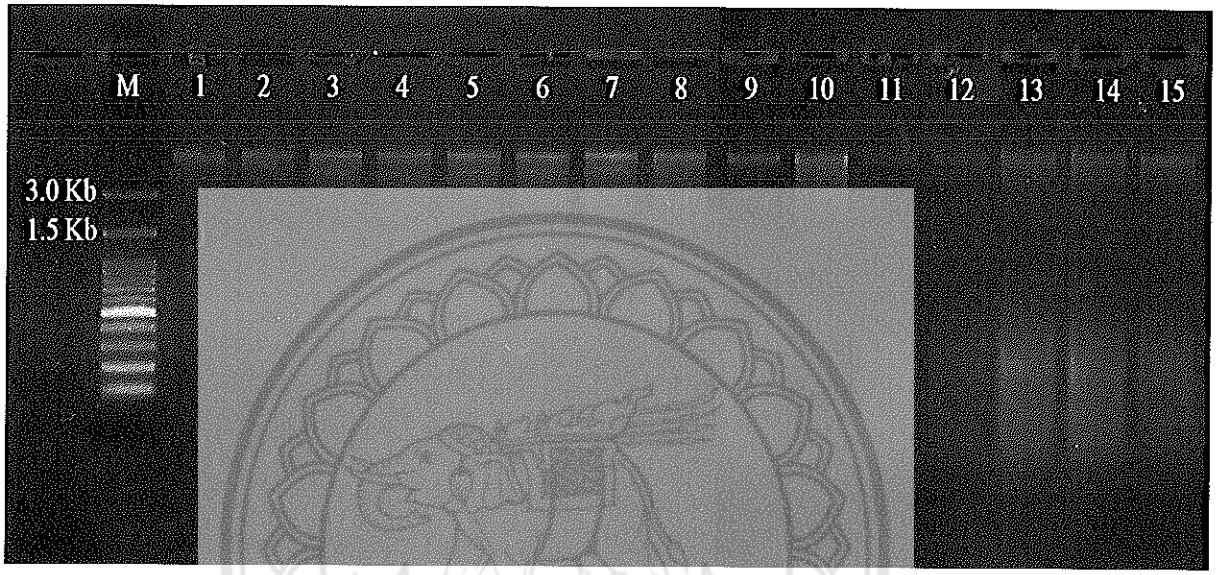


จากผลการทดลอง พบว่า ผลของฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BA ที่มีต่อการเจริญเติบโตของน้อยหน่าเครือในสภาพปลอดเชื้อให้ผลไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (control)

จ TP
159
.A5
พ๓๑๙
2560
1038617

4.6 การทดลองที่ 7 การสกัด DNA ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอแบบ Kit และการตรวจสอบผล

ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของน้อยหน่าเครือที่นำมาศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพจำนวน 15 ตัวอย่าง จีโนมิกดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่กว่า 3.0 Kb (ภาพ 10) คุณภาพและปริมาณจีโนมิกดีเอ็นของน้อยหน่าเครือ มีความเหมาะสมสามารถนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) ได้



ภาพ 10 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของชาเมี่ยงจำนวน 15 ตัวอย่าง

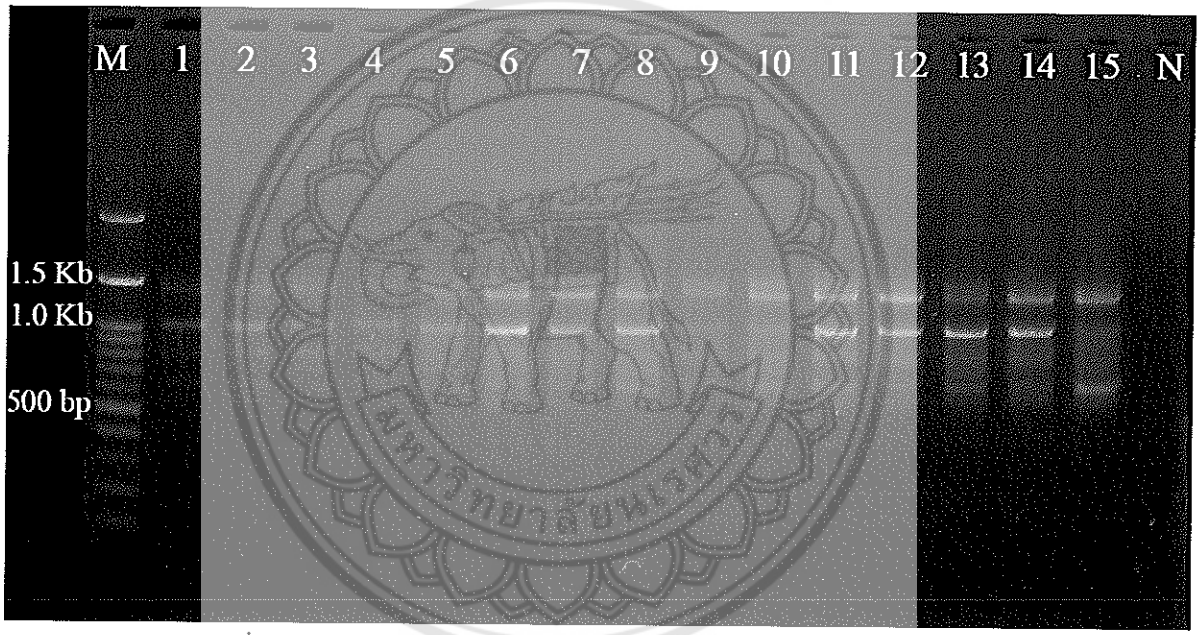
การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบอ่อนของชาเมี่ยงสามารถใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอแบบ Kit ได้ ซึ่งทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอค่อนข้างมาก และสะดวกรวดเร็วกว่าวิธีมาตรฐานที่ใช้เวลานาน และมีขั้นตอนซับซ้อน

4.7 การทดลองที่ 8 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลองและการตรวจสอบผล

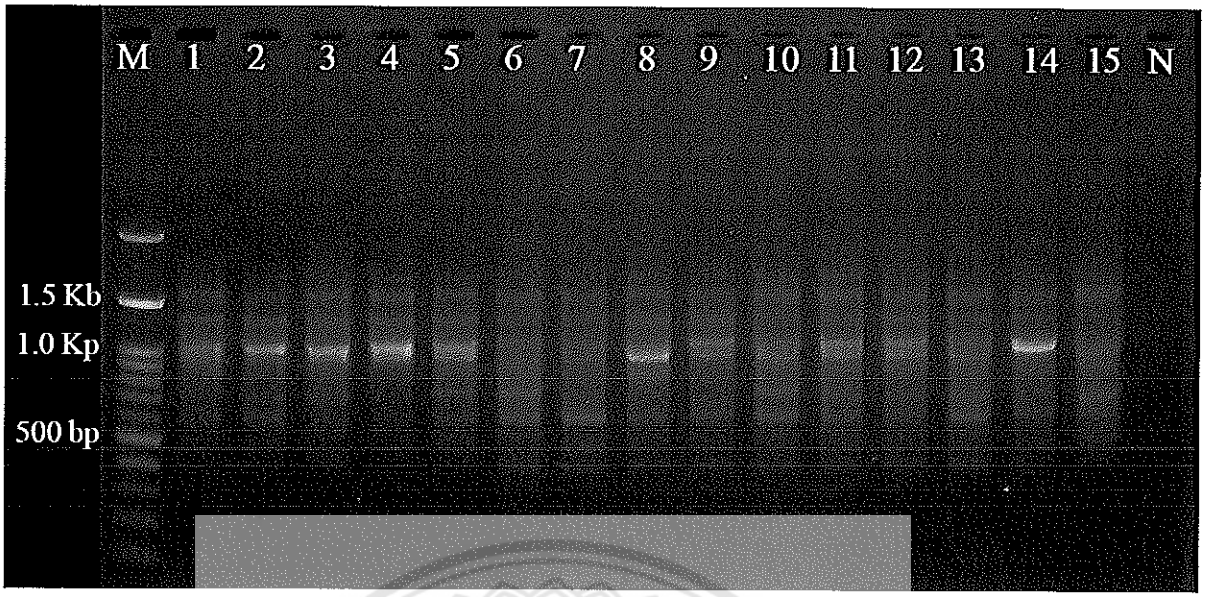
จีโนมิกดีเอ็นเอของน้อยหน่าเครือจำนวน 15 ตัวอย่าง (ต้น) ถูกนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) หรือ พีซีอาร์ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างน้อยหน่าเครือที่นำมาศึกษา ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) จากไพรเมอร์จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Scot1, Scot2, Scot3, RAPD-K1 และ RAPD-OPA02 (ตาราง 4) พบว่าน้อยหน่าเครือแต่ละต้นมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (ภาพ 11, 12, 13, 14, 15)

ตาราง 4 ไพรเมอร์จำนวน 5 ชนิด ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส

No.	Name	Sequences (5'-3')
1	SCoT-1	CAACAATGGCTACCACCA
2	SCoT-2	CAACAATGGCTACCACCC
3	SCoT-3	CAACAATGGCTACCACCG
4	RAPD-K1	TGGCGACCTG
5	OPA-02	TGCCGAGCTG

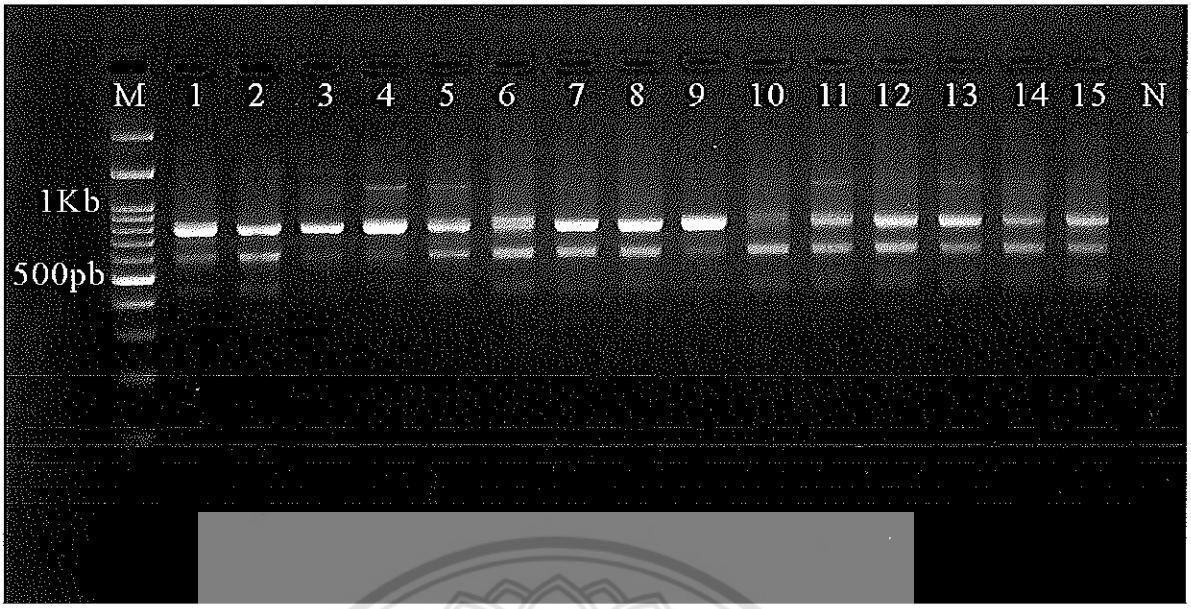


ภาพ 11 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ ผลผลิตพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ Scot 1



ภาพ 12 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ ผลผลิตพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ Scot 2

ภาพ 13 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ ผลผลิตพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ Scot 3



ภาพ 14 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ ผลผลิตพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ RAPD-K1

ภาพ 15 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ ผลผลิตพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ RAPD-OPA02

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของน้อยหน่าเครือด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ เป็นการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยไม่ได้รับอิทธิผลจากสภาพแวดล้อม ซึ่งอาจก่อให้เกิดความแปรปรวนของลักษณะฟีโนไทป์ของสิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งลักษณะดีเอ็นเอภายในนี้จะไม่เปลี่ยนไปตามสิ่งแวดล้อมใน

ระยะเวลาอันสั้น ทำให้การตรวจวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอมีความแม่นยำสูงกว่าการตรวจวอเคราะห์จากลักษณะปรากฏภายนอก

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทั้งหมด 5 ไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันหลายลักษณะ ล้วนแต่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัวทำให้ทราบได้ว่าน้อยหน่าเครือที่พบนั่น มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง เนื่องจากมีการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ด การผสมพันธุ์เกิดขึ้นตามธรรมชาติไม่มีการควบคุม หรือกำหนดคู่ผสมเพื่อคงลักษณะทางพันธุกรรม จึงทำให้มีโอกาสเกิดการผสมข้ามหรือผสมตัวเอง สร้างลักษณะแปลกใหม่ขึ้นมาได้เรื่อย ๆ จนทำให้พบลักษณะของแถบดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์ที่แตกต่างกันหลายแบบ

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจตำแหน่งของพื้นที่ ลักษณะการเจริญและชนิดของน้อยหน่าเครือ พบว่าพื้นที่ที่พบสายพันธุ์น้อยหน่าเครือผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว มีอยู่ 3 ที่ คือ 1) บ้านขุนลาว ต.เจดีย์ใหม่ อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย 2) ต.ป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่) บ้านป่าเหมี้ยง ต.แจ้ซ้อน อ.ปาน จ. ลำปาง ส่วนสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง จะพบที่ ต.ป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ ซึ่งทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่ามีการเจริญอยู่บนหุบเขาที่มีแหล่งน้ำไหลผ่าน ที่ระดับความสูง 1,000 เมตรขึ้น โดยช่วงเวลาการออกดอกของน้อยหน่าเครือทั้ง 2 สายพันธุ์ อยู่ในช่วงเดือนมีนาคม โดยผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว จะสามารถเก็บเกี่ยวผลได้ช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิกายน (ในจังหวัดเชียงราย) ส่วนพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดงจะสามารถเก็บเกี่ยวผลได้ในช่วงเดือนมกราคม (ในจังหวัดเชียงราย) แต่ถ้าพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดงออกทวายจะสามารถเก็บเกี่ยวผลได้ช่วงเดือนมีนาคม (ในจังหวัดเชียงใหม่) โดยมีน้ำหนักผลตั้งแต่ 0.28- 1.22 กก. ซึ่งจากการจำแนกตามลักษณะของผลมีความสอดคล้องกับรายงานของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชซึ่งแบ่งได้ตามลักษณะผลได้ 6 กลุ่มโดยสายพันธุ์น้อยหน่าเครือผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 และสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง จัดอยู่ในกลุ่มที่ 5 โดยสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดงมีการออกผลนอกฤดู ซึ่งควรมีการทำการศึกษาด้านการการขยายพันธุ์และการจำแนกพันธุ์โดยใช้เทคนิคด้านเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

การจำแนกชนิดของน้อยหน่าเครือ จังหวัดเชียงราย พบน้อยหน่าเครือ 2 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว มีความกว้าง 14.70 เซนติเมตร ยาว 12.50 เซนติเมตร และมีน้ำหนัก 1.22 กิโลกรัม ส่วนสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง มีความกว้าง 8.80 เซนติเมตร ยาว 9.70 เซนติเมตร และมีน้ำหนัก 0.28 กิโลกรัม

การศึกษาการจำแนกลักษณะทางนิเวศวิทยาของน้อยหน่าเครือ จังหวัดเชียงราย ลักษณะดอกและผลน้อยหน่าเครือ พบว่า ลักษณะดอกน้อยหน่าเครือของทั้ง 2 สายพันธุ์ มีเอกลักษณ์เฉพาะ คือ พันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว จะมีกลีบดอกส่วนนอกเป็นสีเขียว กลีบดอกส่วนในเป็นสีขาว ปลายกลีบดอกเป็นสีแดง ส่วนพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดงจะมีกลีบดอกด้านนอกเป็นสีแดงทั้งหมด ส่วนกลีบดอกด้านในส่วนบนมีสีแดง ส่วนกลีบดอกด้านล่างเป็นสีขาว โดยทั้ง 2 สายพันธุ์จะมีกลีบดอกทั้งหมดประมาณ 12 กลีบ ในส่วนของเกสรจะมีทั้งเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียในดอกเดียวกัน ซึ่งเกสรตัวเมียจะอยู่ส่วนปลายของดอก ลักษณะผลของน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาวและพันธุ์ผลสุกเปลือกสี

แดง ผลย่อยสีแดง โดยทั้ง 2 สายพันธุ์ มีลักษณะเปลือกหนา และมีแกนกลาง ในส่วนของสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว ผลดิบเปลือกด้านนอกจะมีสีเขียว เมื่อผลสุกเปลือกด้านนอกจะมีสีเหลืองอ่อน และเปลือกด้านในมีสีชมพู ลักษณะผลย่อยเนื้อในสีขาว เมล็ดมีลักษณะคล้ายรูปหัวใจสีน้ำตาลเข้ม ส่วนสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง ผลดิบเปลือกด้านนอกจะมีสีเขียว เมื่อผลสุกเปลือกด้านนอกและด้านในจะมีสีแดง ลักษณะผลย่อยเนื้อในสีแดง เมล็ดมีลักษณะคล้ายรูปหัวใจสีน้ำตาลเข้ม

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของน้อยหน่าเครือด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ เป็นการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยไม่ได้รับอิทธิผลจากสภาพแวดล้อม ซึ่งอาจก่อให้เกิดความแปรปรวนของลักษณะฟีโนไทป์ของสิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งลักษณะดีเอ็นเอภายในนี้จะไม่เปลี่ยนไปตามสิ่งแวดล้อมในระยะเวลาอันสั้น ทำให้การตรวจวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอมีความแม่นยำสูงกว่าการตรวจวอเคราะห์จากลักษณะปรากฏภายนอก

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทั้งหมด 5 ไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันหลายลักษณะ ล้วนแต่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัวทำให้ทราบได้ว่าน้อยหน่าเครือที่พบนั่น มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง เนื่องจากมีการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ด การผสมพันธุ์เกิดขึ้นตามธรรมชาติไม่มีการควบคุม หรือกำหนดคู่ผสมเพื่อคงลักษณะทางพันธุกรรม จึงทำให้มีโอกาสเกิดการผสมข้ามหรือผสมตัวเอง สร้างลักษณะแปลกใหม่ขึ้นมาได้เรื่อย ๆ จนทำให้พบลักษณะของแถบดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์ที่แตกต่างกันหลายแบบ

บรรณานุกรม

จริงแท้ ศิริพานิช. 2558. สรีรวิทยาและเทคโนโลยีการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้. ภาควิชาพืชสวนคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม. 369 น.

Austin, P.R., C.J. Brine, J.E. Castle and J.P. Zikakis. 1981. Chitin: New facets of research. Science. 212: 749-755.

Alexandra H. Smith and Roderick I. Mackie. 2004. Effect of Condensed Tannins on Bacterial Diversity and Metabolic Activity in the Rat Gastrointestinal Tract. APPLENVIRON MICROB. 70(2): 1101-1115.

Antonio Carraturo, Katia Raieta, Idolo Tedesco, Jinwoong Kim, and Gian Luigi Russo. 2014. Antibacterial Activity of Phenolic Compounds Derived from Ginkgo biloba Sarcotestas against Food-Borne Pathogens. British Microbiology Research Journal. 4(1):18-27.

Blankenship, S.M. and John M.D. 2003. 1-methylcyclopropene : a review Postharvest Biology and Technology (28) 1-25.

Doss A., H. Mohammed Mubarack and R. Dhanabalan. 2009. Antibacterial activity of tannins from the leaves of *Solanum trilobatum* Linn. Indian J Sci Technol. 2(2): 41-43.

Environmental Protection Agency. 2002. Federal Register, 2002. Vol. 67 (144) 48796-48800.

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D. J. 2002. Flavonoid Antioxidants Chemistry, Metabolism and Structure-activity Relationships. The Journal of Nutritional Biochemistry 13: 572–584.

Hisanori Akiyama, Kazuyasu Fujii, Osamu Yamasaki, Takashi Oono, and Keiji Iwatsuki. 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. J ANTIMICROB CHEMOTH. 48: 487-491.

Jantan, L., and Z.M. Zaki. (1998). Development of environment-friendly insect repellents from the leaf oils of selected Malaysian plants. J. Nature Biotechnology, 23, 432-433.

KEW Royal Botanical Gardens. 2557. Herbarium Catalogue. Retrieved on 20th April 2014. From http://apps.kew.org/herbcat/getHomePageResults.do?homePageSearchText=Kadsura + verrucosa

Kim T.J., Silva J.L., Kim M.K., Jung Y.S.. 2010. Enhanced antioxidant capacity and antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing. FOOD CHEM. 118: 740-746.

Lecto, K. and Saunders, R.M.K. 1935. *Kadsura ananosma* Kerr, *Kew Bull.* 1936: 34 (1936). T: Siam [Thailand]: Thanon Thong Chai Range, west-southwest of Chiang Mai, Mê Ka Pak drainage, Doi Ang Ka (Doi Inthanon), 10 Apr. 1935, *H.B.G.Garrett 940*; *Syst. Bot. Monogr.* 54: 41 (1998); isolecto: A, E, K, L.

Lin S. H., Darah I., and Jain K. 2006. Antimicrobial activities of Tannins Extracted from *Rhizophora apiculata* Barks. J TROP FOR SCI. 18(1): 59-65.

Liu, J. -S. and Li, L. 1995a. Schisantherins P and Q, Two Lignans from *Kadsura coccinea*. Phytochemistry 38:1009–1011.

Liu, J. -S. and Li, L. 1995b. Kadsulignans L–N, three dibenzocyclooctadiene lignans from *Kadsura coccinea*. Phytochemistry 38: 241–245.

Meigy Nelce Mailoa, Meta Mahendradatta, Amran Laga, and Natsri Djide. 2014. Antimicrobial Activities Of Tannins Extract From Guava Leaves (*Psidium Guajava* L) On Pathogens Microbial. IJSTR. 3(1): 236-241

Min, B. R., Pinchak, W. E.*, Merkel, R., Walker, S., Tomita, G. and Anderson, R. C. 2008. Comparative antimicrobial activity of tannin extracts from perennial plants on mastitis pathogens. SCI RES ESSAYS. 3(2): 66-73.

Muntha K. Reddy, Sashi K. Gupta, Melissa R. Jacob, Shabana I. Khan, and Daneel Ferreira. 2007. Antioxidant, Antimalarial and Antimicrobial Activities of Tannin-Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from *Punica granatum* L. Planta Med. 73: 461-467.

Nancy E. Hernandez, M.L. Tereschuk, L.R. Abdala. 2000. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafí del Valle (Tucumán, Argentina). J ETHNOPHARMACOL. 73: 317-322.

Ozçelik B., D. Deliorman Orhan, S. Ozgen, F. Ergun. 2008. Antimicrobial Activity of Flavonoids against Extended-Spectrum β-Lactamase (ESβL)-Producing *Klebsiella pneumonia*. TROP J PHARM RES., 7(4): 1151-1157.

Saunders R.M.K. 2001. Species Plantarum Flora of the World. Part 4 Schisandraceae. Australian Biological Resources Study, Canberra. Australia. Retrieve on 20th April 2014. From http://specie splantarum.net/sites/default/ files/floras/s/schisandraceae.pdf

Sevil ALBAYRAK, Ahmet AKSOY, Osman SAGDIC, Umit BUDAK. 2010. Phenolic compounds and antioxidant and antimicrobial properties of *Helichrysum* species collected from eastern Anatolia, Turkey. Turk J Biol. 34: 463-473.

Silvia Helena Taleb-Contini, Marcos Jose Salvador, Evandro Watanabe, Izabel Yoko Ito, and Dioneia Camilo Rodrigues de Oliveira. 2003. Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two *Chromolaena* species. BRAZ. J PHARM SCI. 39(4): 403-408.

Sroka, Z. and Cisowski, W. 2003. Hydrogen Peroxide Scavenging, Antioxidant and Anti-radical Activity of Some Phenolic Acids. Food and Chemical Toxicology 41: 753–758. Sun, J., Shi J., Jiang, Y.,

Suraya Sulaiman, Darah Ibrahim, Jain Kassim, and Lim Sheh-Hong. 2011. Antimicrobial and antioxidant activities of condensed tannin from *Rhizophora apiculata* barks. J. Chem. Pharm. Res. 3(4): 436-444.

Tawatsin, A., Wratten, S.D., Scott, R., Thavara, V. and Techaamrongsin, Y. (2001). Repellency of volatile oils from plant against three mosquito vectors. J. of Vector Ecology, 26(1), 76-82.

Wills, R.H.H., T.H. Lee, D. Graham, W.B. McGlasson and E.G. Hall. 1981.Postharvest: An Introduction to the Physiology and Handling of Fruit and Vegetables. N.S.W.Univ. Press, New South Wales. 161 p.

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการ

โครงการ การศึกษาคุณภาพฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลน้อยหน่าเครือ และคุณภาพระหว่างการเก็บรักษาน้ำน้อยหน่าเครือสดพร้อมดื่ม

Study on quality antimicrobial activity and antioxidant activity of fruit and shelf life quality of ready to drink freshed juice of Noinakreua (*Scarlet kadsura*)

คณะผู้วิจัย สังกัด

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญส่ง แสงอ่อน[1]

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาท[2]

นายพุทธพงษ์ สร้อยเพชรเกษม[2]

[1] ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

[2] ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร

คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

สนับสนุนโดย

งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

ประจำปีงบประมาณ 2560

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ผลไม้เป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยวิตามิน แร่ธาตุต่าง ๆ ซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์ และได้มีการนำผลไม้ที่มีประโยชน์มาใช้ในอุตสาหกรรมกันมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากมนุษย์ให้ความสนใจด้านสุขภาพมากขึ้นด้วย โดยผลไม้ที่มีการนิยมนำมาบริโภคส่วนมากจะเป็นผลไม้วิเศษ หรือที่เรียกว่า superfruit ซึ่งประกอบด้วยผลไม้ในกลุ่มเบอรี่ เช่น บลูเบอรี่ป่า (wild blue berry), อะไคเบอรี่ (acai berry), โกจิเบอรี่ (goji berry), เอลเดอร์เบอรี่ (elderberry), แครนเบอรี่ (cranberry) และ ยัมเบอรี่ (yumberry) นอกจากนั้นยังมีผลไม้อื่นอีก เช่น องุ่นแดง, มังคุด, ลูกยอ และทับทิม เป็นต้น (วินัย ปิติยนต์, 2008) ซึ่งผลไม้เหล่านี้เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่สามารถป้องกันโรคต่าง ๆ ได้ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคเกี่ยวกับระดับภูมิคุ้มกันทำงานผิดปกติ, โรคข้ออักเสบ, โรคแก่ก่อนวัย, โรคต้อกระจก, โรคอัลไซเมอร์, โรคพากินสัน ฯลฯ โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถพบได้ในผลไม้ ได้แก่ กรดอะมิโน (amino acid), วิตามินซี (ascorbic acid), แคโรทีนอยด์ (carotenoids), ฟลาโวนอยด์ (flavonoids), เมลานอยดิน (melanoidin), โทโคฟีรอล (tocopherol), แทนนิน (tannins), เปปไตด์ (peptides), และกรดอินทรีย์อื่น ๆ และสาร antioxidant เหล่านี้สามารถใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial) ได้ เช่น การศึกษาสารสกัดแทนนินจากใบฝรั่งที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Meigy Nelce Mailoa et al., 2014) ซึ่งน้อยหน่าเครือเป็นหนึ่งในผลไม้ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน (Jian Sun et al., 2009)

น้อยหน่าเครือ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Kadsura* sp. ชื่อสามัญ Scarlet kadsura น้อยหน่าเครือชนิด *Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith จัดอยู่ใน Family Schisandraceae เป็นไม้เลื้อยซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองทางภาคใต้ของสาธารณรัฐประชาชนจีน ส่วนเถาและรากของพืชชนิดนี้ถูกนำมาใช้เป็นยาจีนโบราณใช้ในการรักษาโรคกระเพาะและลำไส้ และโรคไขข้ออักเสบ (Liu and Li, 1995a) *Kadsura coccinea* หรือรู้จักในชื่อว่า เสือดำ "black tiger" ประชาชนในบางจังหวัดของสาธารณรัฐประชาชนจีน เช่น จังหวัดกวางสี กุ้ยโจว ยูนนาน และมณฑลกวางตุ้ง นำมาบริโภคเป็นผลไม้สด บางครั้งนำมาแปรรูปเป็นน้ำผลไม้และไวน์ นอกจากนี้มีการศึกษาวิจัยการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์พบว่าสารของ lignans และ triterpenoids ในลำต้นหรือสารสกัดจากเมล็ด มีฤทธิ์ต่อต้านเนื้องอก โรคเอดส์ มีคุณสมบัติต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี antilipid peroxidation และเป็นสารต้านไวรัสตับอักเสบ (Liu and Li, 1995b; Gao *et al.*, 2008) ผล *Kadsura coccinea* มีสาร phenolic acids สาร flavonoids และสาร tannins ซึ่งสารเหล่านี้จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เข้มข้น (Heim *et al.*, 2002; Sroka and Cisowski,

2003) มีรายงานพบว่ามีการใช้ทางการแพทย์ มีผลทาง oxidative stress สูง เนื่องจากมีสาร antioxidant และสารประกอบฟีนอลิค (phenolic compound) สูง ได้แก่ gallic acid ไม่มีความเป็นพิษต่อมนุษย์และมีคุณค่าทางอาหารสูง ได้แก่ โปรตีน ไขมัน (Sum และคณะ, 2011) นิเวศวิทยาในสาธารณรัฐประชาชนจีนพบในพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเล 1,500 – 2,000 เมตร ในประเทศไทย Lecto, K and Saunders, R.M.K. รายงานการค้นพบ *Kadsura ananosma* Kerr ในวันที่ 10 เมษายน พ.ศ. 2478 ในพื้นที่เทือกเขาถนนธงชัย เป็นแนวเขาทางด้านตะวันตกเฉียงใต้ของดอยอินทนนท์ ซึ่งมีการบันทึกการค้นพบใน Kew Bulletin ประเทศอังกฤษ Kerr, A.F.G. รายงานการค้นพบ *Kadsura verrucosa* ในพื้นที่เขาค้อ ประเทศไทย เมื่อวันที่ 1 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2462

การใช้ประโยชน์ด้านอุตสาหกรรมอาหาร ยังไม่ปรากฏรายงานในประเทศไทย การค้นหาสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรที่มีผลข้างเคียงน้อยกว่าจึงเป็นทางเลือกใหม่และเป็นทางเลือกเสริมที่จะนำมาทำประโยชน์ได้ในระดับชุมชน น้อยหน่าเครือเป็นพืชในกลุ่มอนุรักษ์ที่ยังขาดข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการนำมาใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมอาหารและยาอยู่มาก จึงมีความจำเป็นที่ต้องทำการศึกษาให้ครบทุกด้านโดยเฉพาะอย่างยิ่งการขาดข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์ทุกด้าน

จากข้อมูลงานวิจัยในต่างประเทศจะเห็นได้ว่า น้อยหน่าเครือเป็นพืชอนุรักษ์ของไทยที่น่าสนใจอย่างมากในการนำมาใช้ประโยชน์ ดังนั้น งานวิจัยในระยะแรกผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องเร่งสำรวจความหลากหลายของน้อยหน่าเครือทั้งชนิดและปริมาณ ศึกษาคุณภาพทางกายภาพ ทางเคมี และสารต้านจุลินทรีย์จากน้อยหน่าเครือ เพื่อเป็นฐานในการวิจัยและพัฒนาความหลากหลาย การอนุรักษ์ และการใช้ประโยชน์ของน้อยหน่าเครือให้ครบทุกด้านในระยะต่อไป อันจะเป็นประโยชน์ต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยในวงกว้างต่อไป และเพื่อสนองโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.)

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1) เพื่อสนองโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.)
2) เพื่อสำรวจและจำแนกชนิดของน้อยหน่าเครือทางสัณฐานวิทยา
3) เพื่อศึกษาคุณภาพทางกายภาพ เคมี และคุณสมบัติพิเศษในการต้านจุลินทรีย์

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1) สำรวจความหลากหลายของน้อยหน่าเครือในเขตดอยวาวี จังหวัดเชียงราย
2) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของเนื้อและเปลือกของน้อยหน่าเครือ เพื่อเป็นพื้นฐานในการใช้ประโยชน์ของน้อยหน่าเครือ

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นการสำรวจน้อยหน่าเครือ ในพื้นที่ดอยวาวี จังหวัดเชียงราย จากนั้นนำมาทำการจำแนกตามสัณฐานวิทยา และทำการรวบรวมตัวอย่างวัตถุดิบผลน้อยหน่าเครือ (ผลดิบ ผลสุก) มาวิเคราะห์คุณภาพทั้งทางกายภาพ เคมี และคุณสมบัติพิเศษด้านฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ เพื่อเป็นข้อมูลในการใช้ประโยชน์ด้านอุตสาหกรรมอาหารและยาต่อไป

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทำให้ทราบชนิด จำนวน และการแพร่กระจายของน้อยหน่าเครือ

2) ทำให้ทราบคุณภาพทางกายภาพ เคมี และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้อยหน่าเครือ

3) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์จากน้อยหน่าเครือให้หลากหลายต่อไป ตามโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.)

มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.) ได้เริ่มดำเนินการในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2535 เป็นโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริของสมเด็จพรเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารีที่ทรงมีพระราชดำริให้มีการดำเนินการอนุรักษ์พืชพรรณของประเทศ โดยได้มีการจัดสร้างธนาคารพืชพรรณสำหรับการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ การเก็บรักษาโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมทั้งการศึกษาด้านชีวโมเลกุล นอกจากนี้ ยังมีการดำเนินกิจกรรมในการปกปักพันธุกรรมพืช สำรวจเก็บรวบรวม ปลูกรักษา อนุรักษ์และใช้ประโยชน์ ศูนย์ข้อมูลพันธุกรรมพืช วางแผนพัฒนาพันธุ์พืช สร้างจิตสำนึกในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช และกิจกรรมพิเศษสนับสนุนการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช น้อยหน่าเครือ เป็นหนึ่งในพืชที่อยู่ภายใต้โครงการสำรวจความหลากหลายของพันธุ์พืชอนุรักษ์ (อพ.สธ.) เป็นไม้เถาเลื้อยในตระกูล Schisandraceae พบบนพื้นที่สูงเป็นพืชหายาก รูปร่างผลและกลิ่นคล้ายน้อยหน่า ผลสุกรับประทานเป็นผลไม้ มีงานวิจัยพบมีคุณค่าทางสารอาหารและยังมีสารยับยั้งอนุมูลอิสระสูง จีนใช้เป็นยาสมุนไพรโดยใช้ส่วนเถาและรากแก้โรคทางเดินอาหารและไขข้ออักเสบ ปัจจุบันพบเป็นยาที่ทรงคุณค่าในการป้องกันเนื้องอก ต้านเชื้อ HIV ไวรัสตับอักเสบ

น้อยหน่าเครือ จัดอยู่ในวงศ์ (family) Schisandraceae สกุล (genus) *Kadsura spp.* เป็น 1 ในพืชโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ*สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี* (อพ.สธ.) เป็นไม้เถา ใบมีรูปไข่ มีลักษณะปลายแหลม ใน 1 ช่อ มีดอก 2-4 ดอก มีเกสรตัวเมีย 7-24 เกสร และเกสรตัวผู้ 13-80 เกสร มีผลของน้อยหน่าเครือมีความกว้างแนวนอน 3.5-10.5 เซนติเมตร ความกว้างแนวตั้ง 3.0-9.5 เซนติเมตร น้อยหน่าเครือมีอยู่ด้วยกันหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Kadsura coccinea, Kadsura heteroclita, Kadsura induta, Kadsura angustifolia, Kadsura renchangiana, Kadsura longipedunculata* และ *Kadsura longipedunculata* (Jussieu, Ann. 2008) เปลือกด้านนอกมีสีเขียวเข้มหรือเขียวอ่อน โดยเปลือกด้านในมีสีชมพูถึงสีแดง พืชชนิดนี้จะขึ้นบริเวณที่มีอากาศหนาว ติดกับแหล่งน้ำ โดยในประเทศไทยสามารถพบน้อยหน่าเครือได้ตามยอดเขา ที่มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลมากกว่า 1,000 เมตรเป็นต้นไป และติดกับแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งเป็นพันธุ์ไม้หายากใกล้สูญพันธุ์และมีประโยชน์ต่าง ๆ มากมาย เช่น รากและเถาใช้เป็นยาจีนโบราณในการรักษาความผิดปกติของโรคระบบทางเดินอาหาร และโรคไขข้ออักเสบ (Liu and Li, 1995a) ผลของน้อยหน่าเครือ

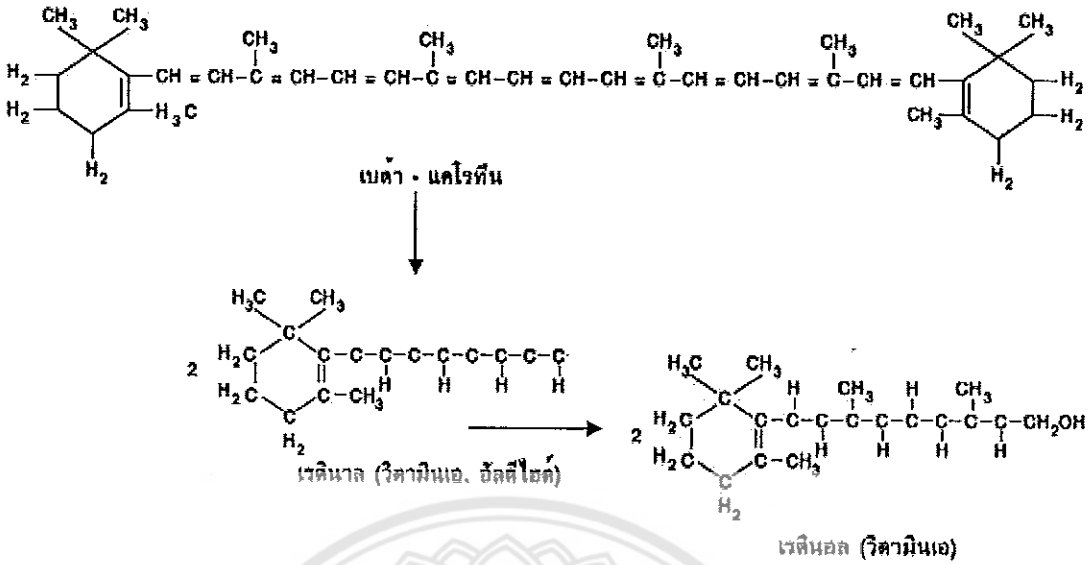
สามารถนำมารับประทานสด และนำมาแปรรูปเป็นน้ำผลไม้และไวน์ได้ เป็นผลไม้ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เนื่องจากมีแร่ธาตุที่จำเป็น คือ แมงกานีส (Mn), แคลเซียม (Ca), ธาตุเหล็ก (Fe), แมกนีเซียม (Mg), ทองแดง (Cu) และ สังกะสี (Zn) (Huang, Long, Wen, & Li, 2006) มีรายงานการวิจัยว่าสารสกัดจากเมล็ดมีประสิทธิภาพในการต้านเนื้องอก (antitumor), ต้าน HIV (anti-HIV), anti-lipid peroxidative, cytotoxic และ anti-hepatitis agents (Liu and Li, 1995b ; Gao et al., 2008) และมีรายงานว่าพบสารต้านอนุมูลอิสระของโพลีฟีนอล (polyphenol) และ แอนโทไซยานิน (anthocyanin) ในผลของน้อยหน่าเครือ (Jian Sun et al., 2009) ในทางชีววิทยา oxidative stress มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคของมนุษย์มาก (Aktan et al., 2003; Mariani et al., 2005; Karp and Koch, 2006) การประยุกต์ใช้สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติในด้านเภสัชวิทยาในการปรับปรุงรักษาโรคเหล่านั้น ซึ่งในผลไม้มักจะมีกรดฟีนอลิก (phenolic acid), ฟลาโวนอยด์ (flavonoids), ไฮโดรไลซ์แทนนิน (hydrolysable tannin) และ คอนเดนส์แทนนิน (condensed tannins) เป็นส่วนประกอบ ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Heim et al., 2002; Sroka and Cisowski, 2006) ที่มีความสามารถในการขับ active oxygen และ electrophiles (Robards et al., 1999)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ หมายถึง สารเคมีหรือเอนไซม์ ที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารตั้งต้น (substrate) ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาได้ โดยสารตั้งต้นดังกล่าว ได้แก่ ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และดีเอ็นเอ (พรทิพย์, 2546) ทั้งนี้ ในการเกิดปฏิกิริยายับยั้งอนุมูลอิสระดังกล่าว สารต้านอนุมูลอิสระจะต้องมีความเข้มข้นต่ำ เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น ที่เป็นเป้าหมายของปฏิกิริยาออกซิเดชันและต้องสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้อย่างมีนัยสำคัญ (Black, 2004)

สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลให้หมดไป หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อสารอนุมูลอิสระที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เช่น

1. เบต้าแคโรทีน (β-carotene) เมื่อเข้าสู่เซลล์ (in vivo) เบต้าแคโรทีนจะเปลี่ยนเป็นวิตามินเอ โดยการแตกหักของพันธะคู่ที่ตำแหน่งกึ่งกลางโมเลกุล ดังรูป



ภาพการสังเคราะห์วิตามินเอจากเบต้าแคโรทีน

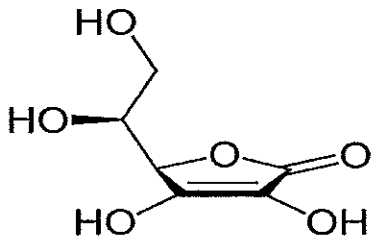
ที่มา: https://www.google.co.th/antioxidant.html

ปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระของเบต้าแคโรทีน คือการกำจัด singlet oxygen (O_2) เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมัน ดังสมการ

$$1O_2 + 1\beta\text{-carotene} \rightleftharpoons 3O_2 + 3\beta\text{-carotene}$$

จากสมการจะเห็นว่า เมื่อเบต้าแคโรทีนทำปฏิกิริยากับ singlet oxygen (O_2) แล้วจะได้เป็น triplet oxygen ($3O_2$) หรือออกซิเจนที่อยู่ในสภาวะพื้น (ground state) และ β-carotenyl radical ซึ่งเป็นสารที่มีความเสถียรและอยู่ในรูปเรโซแนนซ์ (resonance) (อัญชนา, 2544)

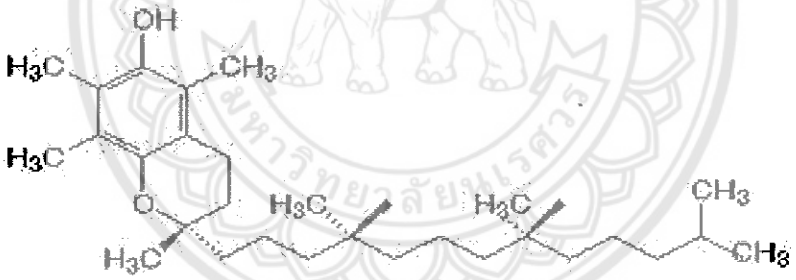
2. วิตามินซี มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี จึงทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์และอวัยวะที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิก ($AscH_2$) มีหมู่ไฮดรอกซี 2 หมู่ที่แตกตัวให้ไฮโดรเจนได้ปฏิกิริยาโดยรวม คือ การให้อิเล็กตรอน 1 ตัว ร่วมกับอะตอมไฮโดรเจน แก่อนุมูลอิสระ เป็นการกำจัดหรือสลายอนุมูลอิสระ คือ $R^{\bullet}$ ให้เป็น RH จากการกำจัดนี้จะได้อนุมูลอิสระตัวใหม่ที่มีความไวต่ำคือ $Asc^{\bullet-}$ แสดงดังรูป



ภาพ ascorbic acid (วิตามินซี)

ที่มา: https://www.google.co.th/ wikipedia.org%252Fwiki%252FVitamin_C

3. วิตามินอี หรือ tocopherol เป็นวิตามินที่ละลายได้ดีในไขมัน โครงสร้างมีหลายไอโซเมอร์หรือรูปแบบ α - tocopherol เป็นไอโซเมอร์ที่มีฤทธิ์สูงสุดจากไอโซเมอร์ทั้งแปด วิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมีไขมันเป็นองค์ประกอบ โดยป้องกันไม่ให้เกิดลิพิดเปอร์ออดชิเดชัน (lipidperoxidation) แสดงดังรูป (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2550)



ภาพ α – tocopherol (วิตามินอี)

ที่มา: https://www.google.co.th/www.il.mahidol.ac.th/biomolecule/chapter3_4.html

4. สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิก จัดเป็นสารต้านอนุมูลที่ได้รับจากภายนอก และพบได้มากในธรรมชาติ ได้แก่ พืชผัก ผลไม้ ชาเขียว ชาดำ ช็อกโกแลต และไวน์แดง เป็นต้น ในปัจจุบันพบสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 8,000 ชนิด ในธรรมชาติ ตั้งแต่โมเลกุลอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก ฟีนิลโปรพานอยด์ และฟลาโวนอยด์ ไปจนถึงโครงสร้างโพลิเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน เมลาลิน และแทนนิน เป็น

ต้น สารประกอบโพลีฟีนอลเป็นสารที่บทบาทสำคัญเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ ต้านการแพ้ และมีคุณสมบัติในการสลายลิ่มเลือด รวมเป็นสารต้านการก่อมะเร็ง และสามารถลดความดันโลหิตในการสลายลิ่มเลือด เหล่านี้เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวนี้มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลโครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอลิก ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวงอะโรมาติกและมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี อย่างน้อย 1 หมู่ (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2550)

ในปี 2009 Jian Sun และคณะ ได้ทำการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากผลน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ *Kadsura coccinea* โดยการสกัดจากส่วนของเนื้อและเปลือก พบว่าในส่วนของเปลือกน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ *Kadsura coccinea* มีโพลีฟีนอล (polyphenol) และส่วนของเนื้อน้อยหน่าเครือมีแอนโทไซยานิน (anthocyanin) เป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Jian Sun และคณะ ปี 2011 ได้มีการตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระจากผลน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ *Kadsura coccinea* พบว่าในเนื้อและเปลือกของผลน้อยหน่าเครือมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ คือ ฟีนอลิกแอซิด (phenolic acid) และกัลลิกแอซิด (gallic acid) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญและมีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์

เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระสามารถจำแนกออกได้เป็นหลายประเภท และมีกลไกในการทำปฏิกิริยาแตกต่างกันออกไปตามคุณสมบัติเฉพาะตัว ดังนั้น การวิเคราะห์หรือทดสอบความสามารถในการยับยั้งหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระจึงไม่สามารถทำได้อย่างสมบูรณ์โดยใช้วิธีการใดวิธีการหนึ่งเพียงวิธีเดียว เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติย่อมมีความซับซ้อนของคุณสมบัติในทางเคมี (Tepe, *et al.*, 2005)

วิธีการทดสอบปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระ ปัจจุบันมีหลายวิธี โดยทั่วไปจะอาศัยหลักการของการเกิดเรโซแนนซ์ (electron spin resonance : ESR) และความสามารถในการปลดปล่อยพลังงานแสงของสารเคมี (chemiluminescence) เพื่อวัดปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระต่ออนุมูลอิสระ (Aruna, 2001) ยกตัวอย่างวิธีการทดสอบหาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นที่นิยมในปัจจุบัน ได้แก่

1. 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay (DPPH assay) (Hou et al., 2001)

อนุมูล $DPPH^{\cdot}$ เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วง อยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว โดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูล การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธีไฮโดรเจนอะตอม การวัดทำโดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

DPPH radical ใช้ในการทดสอบความสามารถในการทำอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง (scavening activity) สารละลายของ $DPPH^{\cdot}$ มีสีม่วงในเอทานอล และเมื่อได้รับ H จะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีเหลือง ตามสมการดังนี้

$$DPPH^{\cdot} + RH \longrightarrow DPPH\text{-}H + R^{\cdot}$$

สีม่วง ตัวอย่างทดสอบ สีเหลือง

ค่าที่วัดได้จะแสดงความสามารถในสารต้านออกซิเดชันออกมาในค่า %inhibition ตามสมการ ดังนี้

$$\%\text{inhibition} = \frac{\text{Absorbance of control - Absorbance of test sample}}{\text{Absorbance of control}} \times 100$$

เมื่อ $A_{517\ control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ในตัวทำละลาย

$A_{517\ test\ sample}$ = ค่าการการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

2. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (เพชรรุ่ง เทพทอง และคณะ, 2555) เป็นการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนอิสระ (reducing agent) โดยอาศัยคุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ในปฏิกิริยา redox-linked colorimetric method โดยที่ ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) complex จะถูกรีดิวซ์ด้วยสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ ทำให้เกิด Fe^{2+}-TPTZ complex ดังนั้นวิธีนี้ สามารถใช้วัด total reducing power ของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้ Fe^{3+} เปลี่ยนเป็น Fe^{2+} ได้ เทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานคือ $FeSO_4$ และ โทลอกซ์ (Trolox) สร้างกราฟมาตรฐานในการหาปริมาณ Fe^{2+} ที่เกิดจากปฏิกิริยาของโทลอกซ์หรือสารสกัดสมุนไพร แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นค่า FRAP value (Fe(II)/g) และ ค่า TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) (mg Trolox/g)

3. 2, 2'-azinobis-(3-ethylbensothiazoline)-6-sulfonic acid assay (ABTS assay) (Re et al., 1999)

วิธีนี้เป็นวิธีวัดทางอ้อมโดยใช้สาร 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS ที่มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ มาทำให้เป็นอนุมูลอิสระโดยการถูก

ออกซิไดซ์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ให้กลายเป็น $ABTS^{+\bullet}$ ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีสีฟ้าเขียว มี λmax ที่ 660, 734 และ 820 nm แต่จะนิยมวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm โดยปรับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น $ABTS^{+\bullet}$ ให้เป็น 0.700±0.02 เมื่อเติมสารทดสอบที่มีกิจกรรมต้านออกซิเดชัน จะทำให้ $ABTS^{+\bullet}$ ลดลง ซึ่งทำให้สีจางลง และสามารถนำไปคำนวณเป็น % inhibition ได้ตามสมการ

$$\%\text{inhibition} = \frac{\text{Absorbance of control - Absorbance of test sample}}{\text{Absorbance of control}} \times 100$$

ผลการวิเคราะห์จะคำนวณเป็นค่าที่สัมพันธ์กับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน Trolox แล้วแสดงผลในรูปของค่า Tolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

4. Oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC assay)

วิธี ORAC เป็นวิธีการทดสอบประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระโดยอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของโปรตีนที่เรืองแสงได้ เช่น β-phycoerythrin หรือ γ-phycoerythrin (PE) เป็นต้น โดยใช้สาร 2,2' - azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride เป็นสารตั้งต้นของการเกิดอนุมูลเพอรอกซิลเพื่อทำปฏิกิริยากับ PE และใช้ trolox (α-tocopherol) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (Sanchez et al., 2007) ซึ่งผลการทดสอบจะอยู่ในรูปของค่า ORAC (ORAC value) หรือจำนวนโมล (μmol) สมมูลของ trolox ต่อ 1 ลิตรของตัวอย่าง (μmol trolox equivalence/l) (Bonanni, et al., 2007) โดยค่า ORAC จะคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟเมื่อค่าคงที่ของอัตราการเรืองแสงของ PE ลดลงถึง lag phase (Wang et al., 2004)

สารต้านจุลินทรีย์และกลไกการยับยั้งเชื้อ

สารต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial agent) หมายถึง สารเคมีที่เติมลงในอาหารเพื่อป้องกันหรือชะลอการเสื่อมเสียของอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์ เช่น รา ยีสต์ หรือแบคทีเรีย โดยอาจมีผลทำให้คุณสมบัติของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์เปลี่ยนไป ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หรือมีผลต่อกลไกทางพันธุกรรม ซึ่งทำให้จุลินทรีย์หยุดการเจริญเติบโตและตายในที่สุด โดยมีปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารต้านจุลินทรีย์ ได้แก่ ความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ ชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน

อุณหภูมิของอาหาร คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของอาหาร (เยาวพา สุวัตถิ, 2557) คุณสมบัติของสารต้านจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในอาหารนั้น ต้องเป็นสารที่ให้ผลดีในการยับยั้งจุลินทรีย์ มีความคงตัวในอาหารและไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่น ๆ ที่เติมลงไป หรือองค์ประกอบของอาหาร ไม่ก่อให้เกิดสี กลิ่น รส ที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้ต้องไม่เป็นสารที่ทำให้เกิดพิษต่อร่างกายด้วย การใช้สารต้านจุลินทรีย์ในอาหารต้องใช้ในปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดเท่านั้น ซึ่งประสิทธิภาพของสารต้านจุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นและองค์ประกอบทางเคมี และความเป็นกรด-เบสของอาหาร

ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) เป็นยากลุ่มหนึ่งของยาต้านจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นยาที่สกัดมาจากจุลินทรีย์บางชนิด เช่น เชื้อแบคทีเรีย หรือเชื้อรา โดยสามารถแบ่งยาปฏิชีวนะออกเป็นกลุ่ม ๆ ได้หลายวิธี เช่น แบ่งตามโครงสร้างทางเคมีของยา (Chemical Structure) แบ่งตามผลของการออกฤทธิ์ของยา (Mode of Action) หรือแบ่งตามกลไกการออกฤทธิ์ (Mechanism of Action) ซึ่งการแบ่งตามกลไกการออกฤทธิ์นั้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภทคือ

1. ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (Inhibition of Cell Wall Synthesis) ได้แก่ ยาทั้งหลายในกลุ่ม บาซิทราซิน (betalactams), ฟอสโฟมัยซิน (fosfomycin), แวนโคมัยซิน (vancomycin) และบาซิทราซิน (bacitracin) เป็นต้น ยาเหล่านี้จะทำหน้าที่ในการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียไม่สมบูรณ์ ไม่สามารถทนทานต่อความกดดันภายในเซลล์ที่สูงกว่าความกดดันของสภาพแวดล้อมภายนอกเซลล์มาก ๆ ได้ ทำให้เกิดการแตกสลาย (lysis) ของเซลล์ตามมา ยาที่ออกฤทธิ์โดยกลไกนี้จึงมีผลเป็น bactericidal และออกฤทธิ์ได้เฉพาะต่อเชื้อที่กำลังมีการเจริญเติบโตแบ่งตัวหรือสร้างผนังเซลล์อยู่เท่านั้น

2. ขัดขวางการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Inhibition of Cell Membrane Function) ได้แก่ polymyxin B และ colistin เป็นต้น ยาในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่จับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย มีผลทำให้กลไลการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่าง ๆ ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เสียไป มีการสูญเสีย แมคโครโมเลกุล (macromolecules) และไอออน (ions) ต่าง ๆ ที่สำคัญของเซลล์ออกสู่ภายนอก ทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถมีชีวิตอยู่ต่อไปได้ (bactericidal) ยาที่ออกฤทธิ์ได้ทุกขณะ ไม่ว่าเชื้อแบคทีเรียจะกำลังมีการเจริญเติบโตหรือแบ่งตัวอยู่หรือไม่ก็ตาม

3. ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (inhibition of Protein Synthesis) ได้แก่ ยาในกลุ่ม แมคโครไลด์ (macrolides), เตตระไซคริล (tetracyclines), คลอแรมฟีนิคอล (chloramphenicols) และอมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycosides) เป็นต้น ยาเหล่านี้ทำหน้าที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของ

แบคทีเรียในขั้นตอนต่าง ๆ แตกต่างกันไป เช่น erythromycin ยับยั้งในขั้นตอนของการสังเคราะห์ initiation complex (mRNA-ribosome-f-methionul tRNA complex) และขั้นตอน translocation, Tetracyclines ยับยั้งในขั้นตอนที่ aminoacyl-tRNA จะเข้าไปจับกับ A site (acceptor site) ของ ribosome และ chloramphenicol ยับยั้งในขั้นตอนต่อ transpeptidation เป็นต้น

4. ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลิอิก (Inhibition of Nucleic Acid Synthesis) ตัวอย่างของยาในกลุ่มนี้ได้แก่ ritampicin ซึ่งยับยั้งการสังเคราะห์ RNA และยาในกลุ่ม quinolones ได้แก่ nalidxic acid และยาในกลุ่ม fluoroquinolones ซึ่งยับยั้งการสังเคราะห์ RNA และยาในกลุ่ม quinolones ได้แก่ nalidixic acid และยาในกลุ่ม fluoroquinolones ซึ่งยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากกรดนิวคลิอิกจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย ดังนั้นยาเหล่านี้จึงมักจะให้ผลเป็น bactericidal

ถึงแม้การใช้ยาปฏชีวนะในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์นั้นสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ผลดี แต่ถ้ามีการใช้ที่ผิดวิธีหรือไม่ทำตามวิธีที่ถูกต้องก็สามารถทำให้เชื้อจุลินทรีย์นั้นเกิดการดื้อยาขึ้นได้ (ศิริพร วงศ์ดินดำ, ม.ป.ป.)

การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้สารสกัดจากธรรมชาติและสมุนไพรเป็นทางเลือกใหม่เพื่อเพิ่มความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค โดยในปี 2014 Meigy Nelce Mailoa และคณะ ได้มีการทดสอบผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดแทนนินจากใบฝรั่งในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งผลของสารสกัด แทนนินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ คือ เชื้อ *Escherichia coli, Pseudomonas aureginosa, Staphilococcus aureus, Aspergillus niger* และ *Candida albicans* ในปี 2013 Chun-Lin Ye ได้มีการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์และทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระจากน้ำมันหอมระเหยจากหอมหัวใหญ่ ผลของน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli, Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* เชื้อยีสต์ *Rhodotorula glutinis, Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida tropicalis* และเชื้อรา *Aspergillus niger, Monascus purpureus* และ *Aspergillus terreus* และงานวิจัยของ ลินจง สุขลำภู และคณะ เรื่อง กิจกรรมต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่และทองดี ผลจากกาสารสกัดจากเปลือกส้มโอทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium* ได้

จุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร

Aspergillus niger

เชื้อรา Aspergillus จัดอยู่ในกลุ่ม Ascomycyte เป็นสิ่งมีชีวิตที่ต้องการออกซิเจนสูง สืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะสร้างสปอร์ และแบบไม่อาศัยเพศจะเรียกว่า โคนิเดีย (conidia) สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน ซากพืช ซากสัตว์ และมูลสัตว์ (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิตยา รัตนาปนนท์, ม.ป.ป.) โคโลนีของ A. niger เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีทั้งสีเหลืองในช่วงแรก และเป็นสีดำเมื่อแก่ ลักษณะคล้ายกำมะหยี่ หรือเป็นปุยคล้ายสำลี เป็นสาเหตุให้อาหารเสื่อมเสีย (microbial spoilge) ได้ทั้งเนื้อสัตว์ น้ำนม ผักผลไม้ เพราะสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น เอนไซม์อะไมเลส (amylase) ย่อยโมเลกุลของแป้งให้เป็นน้ำตาล เอนไซม์โปรตีเอส (protease) ย่อยโมเลกุลของโปรตีนให้เป็นกรดแอมิโน เอนไซม์เพกทิเนส (pecinase) ย่อยสลายเพกทิน (pectin) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช และ บางสายพันธุ์ยังสร้างสารพิษ (mycotoxin) เช่น aflatoxin ochratoxin ซึ่งเป็นอันตรายในอาหาร (ชลนิชา ทองขลิบ, 2548)

1. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน (rod shape) เจริญได้ดีทั้งในสภาพมีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facaltative anaerobe) สามารถสร้างสปอร์ได้ (spore forming) สามารถสร้างสารพิษ (toxin) ที่ทนต่อความร้อนได้ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง ในร่างกายมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 28-37 องศาเซลเซียส ไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส และสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (water activity) ต่ำสุดที่สามารถเจริญได้คือ 0.92 ส่วนใหญ่การปนเปื้อนมักเกิดจากสปอร์ปนเปื้อนลงไปในห่วงโซอาหารที่ได้รับการปรุงไม่เหมาะสม เมื่อสปอร์เจริญเป็น vegetative cell จะสร้างสารพิษ (enterotoxin) และทำให้เกิดโรคเมื่อบริโภคอาหารนั้นเข้าไป ปริมาณที่ก่อโรคได้คือ มากกว่า 106 เซลล์ต่อกรัมอาหาร สิ่งแวดล้อมที่พบเชื้อ ได้แก่ อากาศ ฝุ่น และปะปนมากับอาหารแห้ง เช่น น้ำตาล วัตถุเจือปนอาหาร เครื่องเทศ และพบบ่อยในอาหารกลุ่ม แป้ง เมล็ดธัญพืช (cereal grain) เช่น ข้าวหุงสุก เส้นก๋วยเตี๋ยว พาสต้า อาหารกึ่งสำเร็จรูป เช่น ข้าวกึ่งสำเร็จรูป อาหารประเภทเนื้อและสัตว์ปีก เช่น ไก่งวง เนื้อวัว รวมทั้งอาหารทะเล สลัด มันฝรั่ง ข้าว ก๋วยเตี๋ยว อาหารผสม (ซอส ซุป คาซเซอโรล) นมผง ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ขนมหวาน โดยเฉพาะที่มีคัสตาร์ดและครีมรวมอยู่ด้วย

โรคที่เกิดจาก Bacillus cereus ทำให้เกิดอาการ 2 ลักษณะ คือ

1. อาการอาเจียน (Emetic syndrome) เกิดจากที่ร่างกายได้รับสารพิษ (intoxication) ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในอาหารก่อนที่จะบริโภคเข้าไป สารพิษนี้ทนต่ออุณหภูมิสูง และทนต่อความเป็นกรดในกระเพาะอาหารได้ดี ผู้ป่วยจะเกิดอาการคลื่นไส้และอาเจียน ภายหลังจากการบริโภค

อาหารที่มีสารพิษเข้าไปประมาณ 5 ชั่วโมง โดยทั่วไปอาการจะอยู่ไม่เกิน 24 ชั่วโมง โรคอาหารเป็นพิษลักษณะนี้ มักเรียกว่า Chinese restaurant syndrome เนื่องจากมักพบในผู้ป่วยรับประทานอาหารจีน ซึ่งมักเป็นข้าวผัด ที่ทำจากข้าวสุกที่หุงค้างไว้นาน ทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตและสารสร้างสารพิษที่ทนต่อความร้อน

2. อาการถ่ายเหลว (Diarrhea syndrome) เกิดจากการบริโภคอาหารที่มีเซลล์ของแบคทีเรีย และเพิ่มจำนวนในลำไส้ของมนุษย์ ใช้เวลาฟักตัวประมาณ 8-16 ชั่วโมง มีสารพิษเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ที่ไม่ทนต่อความร้อน ทำให้เกิดอาการการปวดท้อง เป็นตะคริวที่ท้อง และถ่ายอุจจาระเหลวโดยทั่วไปอาการเป็นอยู่ไม่เกิน 14 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดโรค (infective dose) 100-100,000 เซลล์ต่อกรัม (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิตยา รัตนาปนนท์, ม.ป.ป.)

2. *Candida albicans*

C. albicans เป็นเชื้อยีสต์ เซลล์ที่มีรูปทรงกลมหรือรูปไข่ ผิวด้านหน้าโคโลนีเรียบ ขยายพันธ์ด้วยการแตกหน่อย (budding) เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ในร่างกายมนุษย์บริเวณผิวหนัง ทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร ช่องคลอดของผู้หญิง โดยปกติแล้วไม่มีอันตราย มีความสามารถในการก่อโรค candidiosis หรือ candidiasis ซึ่งเป็นการติดเชื้อในบริเวณเยื่อบุตามร่างกาย และสามารถลุกลามไปสู่อวัยวะภายใน รวมทั้งสามารถกระจายสู่ระบบหมุนเวียนโลหิตได้ และเมื่อสภาวะของช่องคลอดมีการเปลี่ยนแปลง อาจทำให้เกิดการตกขาวได้ (นเรศ วโรภาสตระกูล, ม.ป.ป.)

3. *Escherichia coli*

Escherichia coli หรือเรียกว่า *E.coli* เป็นแบคทีเรียอยู่ในวงศ์ (family) Enterobacteriaceae แกรมลบ (gram negative) รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) เจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน และเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม (coliform) ประเภท fecal coliform ซึ่งเป็นโคลิฟอร์มที่พบในอุจจาระของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น

E. coli ส่วนใหญ่ไม่ใช่จุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) แต่บางชนิดที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) หรือเรียกว่า Enterovirulent Escherichia coli group (EEC group) มี 4 ประเภทคือ

1. Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) อาการทั่วไปคือ ท้องร่วง ปวดท้อง ไข้ต่ำ คลื่นไส้ และอ่อนเพลีย การแสดงอาการเกิดจากหลังจากได้รับเชื้อเข้าไปประมาณ 100 ล้านถึง 1,000 ล้านเซลล์ ซึ่งอาการจะเกิดขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากได้รับเชื้อเข้าไปแล้วเชื้อมีการสร้างสารพิษระหว่างการเจริญ โดยแหล่งที่พบคือ น้ำที่ปนเปื้อน หรือจากผู้ป่วยที่ไปสัมผัสอาหาร

2. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เป็น *E. coli* ที่พบได้ในคนและสัตว์หลายชนิด เช่น วัว ควาย หมู และมักก่อโรคในเด็ก ที่ทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วงมีมูกเลือก คล้ายกับเชื้อ *Shigella* ที่เรียกว่า Shigatoxin อาหารที่มักพบโดยทั่วไปคือ เนื้อวัว เนื้อไก่ดิบ หรือน้ำที่นำไปชงนมให้เด็ก เป็นต้น

3. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) เป็น *E. coli* ที่สามารถสร้างสารพิษประเภท verotoxin ที่คล้ายกับ shigatioxin ที่สร้างโดย *Shigella dysenteriae* ที่สามารถทำลายเยื่อบุลำไส้ ความรุนแรงคือทำให้เกิดลำไส้ใหญ่อักเสบจนตกเลือด (hemorrhagic colitis) อาการคือ ปวดท้องรุนแรง อุจจาระร่วงและมีมูกเลือด อาจมีการอาเจียนบ้าง มีไข้ต่ำหรือไม่มี อาหารที่พบมากได้แก่ เนื้อบด น้ำผลไม้ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ไส้กรอกหมูปนเนื้อวัว ผักกาดหอม และน้ำนมดิบ ลักษณะพิเศษของเชื้อกลุ่มนี้ อาจทำให้ไตวายได้ โดยเชื้อสำคัญของกลุ่มนี้ คือ *E. coli* 0157:H7

4. Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เป็น *E. coli* ที่ทำให้เกิดอาการคล้ายโรคบิด ของเชื้อ *Shigella dysenteriae* ที่เรียกว่า บิดมีตัว (bacillary dysentery) ทำให้ท้องร่วงมีมูกเลือด โดยปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดอาการปริมาณ 10 เซลล์ อาหารที่เกี่ยวข้อง คือ เนื้อแฮมเบอร์เกอร์ และน้ำนมที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิตยา รัตนาปนนท์, ม.ป.ป.)

4. *Lactobacillus plantarum*

เป็นแบคทีเรียในวงศ์ (family) Lactobacillaceae แกรมบวก (gram positive bacteria) รูปร่างท่อน (rod shape) ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มที่เจริญได้ทั้งที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobic bacteria) เซลล์มีขนาดประมาณ 0.5-1 x 2-9 ไมครอน เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ในช่องปาก ทางเดินอาหาร ท่อปัสสาวะ และช่องคลอด แต่ไม่พบบนผิวหนัง สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่เป็นกรด และสร้างกรดแลกติด (lactic) จากกระบวนการสลายน้ำตาลกลูโคส (ภัทรชัย กีรติสิน, 2551) พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและพบมากในน้ำนม เนื้อสัตว์ ส่วนในผักและพืชพบเล็กน้อย นอกจากนั้นยังสามารถยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย รวมทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ด้วย ปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์ในการเป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตอาหารหมักหลากหลายชนิด เช่น ไส้กรอกหมัก แหนม ผลิตภัณฑ์นมหมัก ผักดองและผลไม้ดอง เป็นต้น (Eom et al., 2007)

นอกจากนี้กระบวนการหมักยังสามารถเพิ่มกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ดังงานวิจัยของ Juan และ Chou (2010) รายงานว่ากระบวนการหมักถั่วดำด้วย *Bacillus subtilis* BCRC14715 สามารถเพิ่มกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Chavasit และคณะ ปี 2002 ซึ่งกล่าวว่า กระบวนการทำมะม่วงหรือมะละกอสุกแช่อิ่มอบแห้ง ทำให้เบตาแคโรทีนสูญเสียไปประมาณ 17-18% และอาจสูญเสียต่อไปเป็น 30-40% เมื่อเก็บไว้นานกว่า 3 เดือน ขณะที่การหมักดองผักกาดเขียว หรือผักเสี้ยน

5. *Proteus mirabilis*

จัดอยู่ในวงศ์ (family) Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram- negative) รูปร่างท่อน rod-shape เจริญได้ในทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนได้ (facultatively anaerobic) สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาแบบ peritrichous flagella สามารถพบเชื้อได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม รวมถึงลำไส้คนและสัตว์ เชื้อ *Proteus mirabilis* มักพบเป็นสาเหตุของโรคทางเดินปัสสาวะ โดยสามารถใช้เอนไซม์ยูเรียแอส (urease) ซึ่งออกฤทธิ์สลายยูเรียให้เป็นแอมโมเนีย ทำให้มีความเป็นด่างเพิ่มขึ้นและเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุทางเดินปัสสาวะ รวมถึงกระตุ้นการเกิดนิ่วได้ นอกจากนี้ยังอาจพบก่อให้เกิดการติดเชื้อของบาดแผลและการติดเชื้อในกระแสเลือดได้ (ภัทรชัย กีรติสิน, 2551)

6. *Pseudomones aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ (family) Pseudomonadaceae แกรมลบ (gram negative) รูปร่างท่อน (rod shape) กว้าง 0.5 ถึง 1.0 ไมโครเมตร ยาว 1.5-5.0 ไมโครเมตร เจริญได้ในที่มีอากาศ (obligate aerobic bacteria) สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา 1 เส้น (polar monotrichous flagella) บริเวณหัว อุณหภูมิที่เหมาะในการเจริญเติบโตระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส สามารถอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมทั่วไปทั้งในดิน น้ำ พืช และสัตว์ รวมถึงสามารถพบเชื้อได้ในอาหารและของใช้ต่าง ๆ เช่น เครื่องสำอาง

นอกจากนั้น *Pseudomonas aeruginosa* ยังเป็นเชื้อฉวยโอกาส มีการติดเชื้อกับผู้ที่ภูมิคุ้มกันต่ำหรือป่วยมากๆ หรือผู้ป่วยที่พักรักษาตัวในโรงพยาบาล โดยจะอาศัยอยู่ตามอ่างล้างมือ น้ำยาฆ่าเชื้อ สารน้ำต่าง ๆ ยาฉีด และเครื่องมือแพทย์ บางทีจึงเรียกโรคติดเชื้อที่เกิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* ว่าโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล โรคติดเชื้อที่เกิดกับคนปกติ เช่น การอักเสบติดเชื้อกระจกตาจากการใช้คอมแทคเลนส์ การอักเสบของกระดูกและกล้ามเนื้อ ที่เกิดขึ้นหลังจากเกิดอุบัติเหตุแล้วเกิด

บาดแผล การติดเชื้อทางเดินปัสสาวะจากผู้ป่วยที่คาสายสวนปัสสาวะ โรคลิ้นหัวใจอักเสบหรือโรคผีหนอง (ภัทรชัย กีรติสิน, 2551)

7. Saccharomyces cerevisiae

เป็นเชื้อยีสต์ อยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae เป็นเซลล์เดียว รูปร่างกลมหรือรี สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) มีโครงสร้างแบบยูคาริโอต มีผนังเซลล์คล้ายพืช (มีเซลลูโลสและไคติน) แต่ไม่มีคลอโรฟิลล์ทำให้ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ Saccharomyces cerevisiae เป็นจุลินทรีย์หลักที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อการหมัก (fermentation) เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ ไวน์ ใช้เป็นสารให้ขึ้นฟู ในขนมปัง และใช้ผลิตสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)

S. cerevisiae อาจ ใช้ร่วมกับจุลินทรีย์อื่น เช่น แบคทีเรีย รา เพื่อการหมักอาหารโปรตีน เช่น อาหารหมักจากถั่วเหลือง ให้ได้กลิ่นหอมของแอลกอฮอล์ เช่น การหมักซีอิ้วแบบหมัก (fermented soy sauce) เป็นต้น การผลิตเบียร์ (beer) ซึ่งอาจเรียกว่า Brewer's yeast ใช้ผลิตเบียร์ชนิด เอล (Ale) อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Ale yeast มีลักษณะพิเศษคือ ผลิตแอลกอฮอล์สูง ที่อุณหภูมิ 16-24 องศาเซลเซียส หลังจากการหมัก เซลล์ยีสต์ลอยตัวเป็นกลุ่มอยู่ที่ผิวหน้าของเบียร์ทำให้เรียกได้อีกชื่อว่า Top-fermenting yeast หรือ Top yeast หรือ surface yeast ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มแอลกอฮอล์จาก *S. cerevisiae* ไวน์ (wine) สาเก (sake) ปรั่นดี (brandy) วิสกี้ (whiskey) รัม (rum) และใช้เป็นสารที่ทำให้ขึ้นฟู (leavening agent) เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ เบเกอรี่ (bakery) ทำให้อาจเรียก Saccharomyces cerevisiae ว่า Baker's yeast ใช้เพื่อการผลิตขนมปัง (bread) โดนัทยีสต์ ขนมปังที่ขึ้นฟูด้วยยีสต์เรียกว่า yeast leavening bread ยีสต์ที่ใช้สำหรับเบเกอรี่ อาจใช้ รูปแบบของยีสต์สด หรือยีสต์แห้ง (active dried yeast) โดยผสมกับแป้งสาลี (wheat flour) และน้ำตาล ในขั้นตอนแรกของการผลิตขนมปัง ยีสต์จะใช้น้ำตาลเป็นอาหารแล้วผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้แป้งสาลี (wheat flour) ซึ่งมีโปรตีน กลูเตน (gluten) ที่มีลักษณะเหนียว ยืดหยุ่น ขยายตัวเกิดเป็นรูอากาศ (air cell) เป็นช่องว่างเล็กๆ ในเนื้อของขนมปัง ทำให้เกิดโครงสร้างของ ขนมปังขึ้นฟู (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิตยา รัตนาปนนท์, ม.ป.ป.)

8. Salmonella typhimurium

Salmonella เป็นชื่อของแบคทีเรียในวงศ์ (family) Enterobacteriaceae แกรมลบ (gram negative) รูปร่างท่อนสั้น (rod shape) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) ขนาดประมาณ 0.7-1.5 ไมครอน x 2.5 ไมครอน เคลื่อนที่ได้ (motile) โดยอาศัยแฟลกเจลล่ารอบตัว (peritrichous flagella)

สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสและแมนโนสได้ แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาล แลกโตสและซูโครสได้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิช่วง 8-45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส เจริญได้ที่ค่า pH 4-9 ค่า pH ที่เหมาะสมคือ 6.5-7.5 ปริมาณน้ำที่ใช้ (water activity) ประมาณ 0.93-0.99 เชื้อนี้ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือ ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที หรือ 62 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ส่วนที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส ไม่สามารถทำลายเชื้อได้ เพียงแต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เท่านั้น (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2006)

โดยทั่วไปอาการของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella typhimurium* จะเกิดขึ้นหลังจากบริโภคอาหารหรือน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อเข้าไปประมาณ 12-24 ชั่วโมง เชื้อที่เข้าสู่ร่างกายจะจับเกาะเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้และรุกเข้าเซลล์เพื่อเริ่มต้นเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอยู่ภายในกระเปาะที่เซลล์ผนังลำไส้ ซึ่งกระบวนการนี้จะช่วยให้เชื้อรอดจากการ Phagocytosis ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องและถ่ายเหลว เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอุจจาระร่วงทั้งในคนและสัตว์ ทั้งยังสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อรุนแรงในคน เช่น การติดเชื้อในกระแสเลือด เยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็กเล็กและผู้มีภูมิต้านทานต่ำ อาหารที่มักจะพบเชื้อ ได้แก่ พายเนื้อ ไส้กรอก แฮม เบคอน แซนวิส เนื้อหมู เนื้อไก่ ไข่ นม ผลิตภัณฑ์ปลา และอาหารที่ไม่ได้ผ่านความร้อนเพียงพอ อาหารสุกๆ ดิบๆ เช่น แหนม ลาบ ยำ ปูเค็ม ปูดอง ผักสด (ศุภชัย, 2006)

ในปี พ.ศ. 2554-2556, นันทศักดิ์ มุสิกศิลป์ และพงษ์พิทักษ์ ตันสมรส ได้ทำการศึกษาเนื้อสุกรจากโรงฆ่าสัตว์และสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์ในเขนพื้นที่จังหวัดกำแพงเพชร รวมทั้งสิ้น 163 ตัวอย่าง ที่ทำการส่งตรวจเชื้อ *Salmonella spp.* โดยผลการทดลองพบว่าเนื้อสุกรจากโรงฆ่าสัตว์ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานการตรวจเชื้อ คิดเป็นร้อยละ 72.73 และเนื้อสุกรจากสถานที่จำหน่ายเนื้อสัตว์ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานการตรวจเชื้อ คิดเป็นร้อยละ 65.38

9. *Staphylococcus aureus*

เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งในวงศ์ (family) *Micrococcaceae* แกรมบวก (gram positive) รูปร่างกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) เจริญได้ดีในทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน แต่เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีกว่า เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 6-46 องศาเซลเซียส โดยช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30-37 องศาเซลเซียส สร้างสารพิษได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 10 องศาเซลเซียส เจริญได้ในช่วงค่า pH 4.0-10.0 โดยช่วงที่เหมาะสมคือ 7.0-7.5 ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (water

activity,a_w) ต่ำสุดที่เจริญได้คือ 0.85 แต่ถ้าค่า a_w ต่ำกว่า 0.94 จะเจริญได้อย่างช้า ๆ สามารถทนเกลือได้สูงถึง 15-18% สร้างสารพิษชนิดเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ซึ่งมีคุณสมบัติที่ทนความร้อน

ส่วนมากพบว่าคนเป็นพาหะของ Staphylococcus aureus ได้มากพอกับที่พบเชื้อในอาหาร ถ้าผู้เป็นพาหะจับต้องอาหารด้วยมือ จะทำให้เชื้อปนเปื้อนลงไปและอาจก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษเมื่อบริโภคอาหารได้ (วันทนา, 2538) Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในอาหาร ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ชนิด intoxication ซึ่งเกิดจากบริโภคอาหารที่มีสารพิษ enterotoxin ที่เชื้อสร้างขึ้น ปนเปื้อนในปริมาณน้อยกว่า 1 ไมโครกรัม จะสามารถทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยได้ มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียน เป็นตะคริวในช่องท้องและอ่อนเพลีย ผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการปวดศีรษะ เป็นตะคริวที่กล้ามเนื้อ และมีการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตเป็นระยะๆ รวมทั้งอาจมีการเต้นของชีพจรผิดปกติ ซึ่งโดยทั่วไปอาการจะดีขึ้นภายใน 2-3 วัน ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับสภาพความต้านทานสารพิษของร่างกาย ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารและปริมาณสารพิษที่สร้างขึ้นในอาหาร รวมทั้งสภาพร่างกายโดยทั่วไปของผู้ที่ได้รับเชื้อด้วย อาหารที่เกี่ยวข้อง เช่น เนื้อหมู หอยแมลงภู่สด กุ้งแห้ง เป็นต้น (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิตยา รัตนาปนนท์, ม.ป.ป.)

10. *Streptrococcus faecalis*

Streptococcus เป็นชื่อสกุล (genus) ของแบคทีเรียในวงศ์ (family) Strptococcaceae ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive bacteria) จัดอยู่ในกลุ่ม lactic acid bacteria ที่สามารถหมัก น้ำตาลกลูโคส (glucose) น้ำตาลแล็กโทส (lactose) ให้เกิดกรด แลคติก (lactic acid) ประเภท homofermentation รูปร่างเป็นทรงกลม (coccus) หรือรูปไข่ ต่อกันเป็นสายหรือเป็นคู่ เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ต้องการสารอาหารที่มีโครงสร้างซับซ้อน ไม่สร้างสปอร์ (non spore forming bacteria) มักจะไม่เคลื่อนที่ และทนต่อการฉายรังสี (food irradiation) แหล่งที่พบ ได้แก่ ลำไส้ น้ำลาย อุจจาระของมนุษย์และสัตว์ พืชบางชนิด อาหารสัตว์ และเครื่องมือที่ใช้ในโรงงานนม ประโยชน์ใช้ในการหมัก (fermentation) ผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ซาวเคราท์ (sauerkraut) แตกกวาดอง เนยแข็ง (cheese) น้ำนมหมัก (fermented milk) โยเกิร์ต (yogurt) cultured butter, ครีมเปรี้ยว แหนม เป็นต้น ส่วนโทษ เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสีย (microbial spoilage) ของอาหารหลายชนิด เช่น การเสื่อมเสียของน้ำนม การเสื่อมเสียของเนื้อสัตว์แปรรูป เช่น แฮม ไส้กรอก น้ำผลไม้เข้มข้น อาหารกึ่งแห้ง ครีม ผลไม้บรรจุกระป๋อง เป็นต้น (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิตยา รัตนาปนนท์, ม.ป.ป.)

วิธีจุลินทรีย์วิเคราะห์ (Microbial assay)

วิธีจุลินทรีย์วิเคราะห์ (Microbial assay) เป็นการตรวจสอบตัวอย่างทดสอบโดยใช้จุลินทรีย์ ซึ่งวัดจากการเจริญเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ เมื่อในตัวอย่างทดสอบมีสารอาหารที่กระตุ้นการเจริญ หากมีสารอาหารมากจุลินทรีย์ก็จะเจริญได้มาก จึงสามารถใช้การเจริญของจุลินทรีย์เป็นตัวบ่งชี้ปริมาณสารอาหารในตัวอย่าง หรือจะเป็นการวัดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เมื่อมีสารหรือยาต้านจุลินชีพตกค้างอยู่ในตัวอย่างทดสอบ และหากมีสารยับยั้งการเจริญในตัวอย่างทดสอบในปริมาณมากจุลินทรีย์จะถูกยับยั้ง ทำให้การเจริญลดลงหรือไม่สามารถเจริญได้ ดังนั้นวิธีจุลินทรีย์วิเคราะห์จึงนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารที่มีอยู่ในปริมาณน้อยได้ ซึ่งหากใช้วิธีวิเคราะห์ทางเคมีจะมีขั้นตอนวิธีการที่จำเพาะกับสารแต่ละชนิดโดยอาศัยเครื่องมือที่ทันสมัย นอกจากนี้การวิเคราะห์ทางเคมีอาจไม่สามารถตรวจวัดได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของสาร แต่สามารถวัดการเปลี่ยนแปลงได้จากจากการวัดกิจกรรมของจุลินทรีย์ (ศิริวรรณ วิชัย, 2557, หน้า 61)

เทคนิค disc diffusion method เป็นการทดสอบเชิงคุณภาพ จากการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากสารตัวอย่างหรือจากสารสกัดจารสมุนไพร เช่น ผลของการสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร (วรยุทธ ยอดบุญ และคณะ, ม.ป.ป.) การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (วันเพ็ญ เพ็ชรจันทร์ และธีรพร กงยังเกิด, 2551) การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากผลหมาก (สุภลัคน์ พานโชติ และคณะ, 2554) โดยมีหลักการทั่วไป คือ การใส่สารตัวอย่างลงในกระดาษกรอง (paper disc) แล้วนำไปวางบนอาหารที่มีเชื้อจุลินทรีย์กระจายอยู่ทั่วจานเพาะเชื้อ อ่านผลทดสอบจากการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส่ (inhibition zone) รอบ ๆ แผ่นกระดาษกรอง วิธีการนี้สามารถตรวจหาฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ในเบื้องต้นได้ ซึ่งมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเกิด inhibition zone ด้วย เช่น อัตราการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ การซึมของสารตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะความเป็นกรด-ด่าง ตลอดจนระยะเวลาในการบ่มเชื้อ ซึ่งจะต้องมีการควบคุมให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมด้วย (ประสาทพร บริสุทธิเพ็ชร และคณะ, 2551, หน้า 98)

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ หน่วยที่ใช้โดยทั่วไป คือ ไมโครกรัม (µg) ต่อมิลลิลิตร (ml) หรือหน่วยสากล (IU, international unit) ต่อมิลลิลิตร (ml) ค่า MIC นี้สามารถนำมาใช้เป็นการเปรียบเทียบเพื่อดูความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลินชีพหลายชนิด หรือความไวของเชื้อหลาย ๆ ชนิดต่อยาชนิดใดชนิดหนึ่ง และรวมทั้งเพื่อประเมินค่าอื่นที่เกี่ยวข้องกับยาหรือการแปรผลของยาต่อเชื้อ ในการทดสอบเพื่อหาค่า MIC นั้นจะต้องมี

การเจือจางให้มีระดับความเข้มข้นลดลงทุก ๆ 2 เท่า (2-fold serial dilution) (ประสาท บริสุทธิ์เพ็ชร และคณะ, 2551)

วิธีการเตรียมน้ำผลไม้

ในการสกัดน้ำผลไม้นั้นมีอยู่หลายวิธี เช่น การให้ความร้อนในการช่วยสกัด หรือไม่ต้องให้ความร้อนในการช่วยสกัด เป็นต้น ผลไม้ที่ต้องให้ความร้อนในการสกัด เช่น องุ่นแดง มะเขือเทศ เป็นต้น ส่วนผลไม้ที่ไม่ต้องใช้ความร้อนในการสกัดน้ำผลไม้ ได้แก่ พวกเกรฟฟรุท มะนาว องุ่นขาว และผลไม้พวกส้ม เป็นต้น การสกัดน้ำผลไม้ต้องกระทำให้เร็วที่สุดเท่าที่จะเร็วได้ จะต้องให้สัมผัสกับอากาศน้อยที่สุดภายหลังจากที่สกัด และกรองน้ำผลไม้ออกมาแล้ว

การสกัดน้ำผลไม้จะใช้ผลไม้ที่ไม่มีตำหนิและสุกพอดี การเกิดการช้ำที่ผิวของผลไม้จะต้องไม่มีผลต่อน้ำผลไม้ แล้วเลือกผลไม้และล้างน้ำให้สะอาด ทำให้แหลกหรือบดผลไม้เพื่อเพื่อให้ได้ผลไม้เป็นปริมาณมากๆ เมื่อทำการกดหรือบีบ ใช้ถุงผ้าในการบีบเอาน้ำผลไม้ออกมาจากผลไม้ซึ่งมีเนื้อนิ่ม ใช้ถุงผ้ามัสลิน หรือผ้าใบเพื่อให้ได้น้ำผลไม้ที่ใสโดยการบีบเอาน้ำผลไม้ออกมา หลังจากที่บีบน้ำผลไม้เสร็จแล้ว ให้นำมาผ่านถุงผ้าที่สะอาดเพื่อไม่ให้มีผลต่อรสชาติที่ไม่พึงประสงค์ ซึ่งอาจเกิดขึ้น หรืออาจใช้ตะแกรงกรองแยกเอาน้ำและเนื้อผลไม้ออกจากกัน แล้วบรรจุลงในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (วารสารเกษตรกรรมธรรมชาติ, หน้า 40-46)

การเก็บรักษาน้ำผลไม้

น้ำผลไม้ที่เตรียมอย่างถูกต้อง และถูกวิธีจะไม่เสีย ถึงแม้จะเก็บไว้ในที่อุ่น แต่อย่างไรก็ตามน้ำผลไม้จะค่อยๆ สูญเสียรสชาติ สี และวิตามิน ถ้าเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 15 – 25 $^{\circ}$C แต่การสูญเสียจะเกิดมากอย่างรวดเร็ว ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 25 $^{\circ}$C และอายุการเก็บจะยืดยาวออกไป ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 – 4 $^{\circ}$C ในการเก็บน้ำผลไม้พร้อมดื่มจะสามารถเก็บไว้ได้นานประมาณ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (วารสารเกษตรกรรมธรรมชาติ, หน้า 40-46)

การเสื่อมเสียของน้ำผลไม้นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัย 3 ประเภท คือ ทางกายภาพ, ทางเคมี และทางจุลชีววิทยา

- ปัจจัยทางกายภาพ การตกหล่นลงไปของเศษวัสดุสิ่งของต่าง ๆ ทั้งก่อนและหลังกระบวนการผลิต เช่น เศษดินจากการล้างไม่สะอาด แมลงต่าง ๆ หรือแม้กระทั่งเศษเปลือกของผลไม้เอง ซึ่งสิ่งต่าง ๆ เหล่านี้อาจมีส่งทำให้รสชาติ สี กลิ่น ของน้ำไม้ เปลี่ยนแปลงได้

- ปัจจัยทางเคมี ส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีในอาหารตามธรรมชาติ ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม เอนไซม์ดังกล่าวจะทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงลักษณะคุณภาพของน้ำผลไม้ได้ ซึ่งอาจส่งผลทำให้รสชาติ สี กลิ่น ของน้ำไม้ เปลี่ยนแปลงได้

- ปัจจัยทางจุลินทรีย์ ในการเสื่อมเสียของน้ำผลไม้อาจมีผลมาจากการปนเปื่อนทั้งก่อนการผลิต ระหว่างการผลิต หรือหลังจากผลิต โดยจุลินทรีย์เหล่านี้ส่งผลโดยตรงทำให้น้ำผลไม้เกิดการเน่าเสีย บางชนิดทำให้เกิดแก๊ส บางชนิดทำให้เกิดรสเปรี้ยวจากกรด บางชนิดทำให้ดลิ่นเหม็นเน่า หรือบางชนิดสามารถเจริญอยู่บนผิวหน้าของน้ำไม้ได้ (สุดสาย ตรีวานิช และวราภา มหากาญจนกุล, 2012)

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัยแบ่งเป็น 4 ขั้นตอนได้แก่ ขั้นตอนการสำรวจและเก็บตัวอย่าง ขั้นตอนการศึกษาลักษณะทางเคมีและกายภาพของผลน้อยหน่าเครือ วิธีการสกัดสารจากผลน้อยหน่าเครือ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และวิธีการสกัดน้ำน้อยหน่าเครือสดพร้อมดื่ม

ขั้นตอนที่ 1 การสำรวจและการเก็บตัวอย่างน้อยหน่าเครือ

1.1 การสำรวจ

จะมีการสำรวจในเขตพื้นที่จังหวัดเชียงราย จังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดลำปาง โดยการสอบถามข้อมูลจากชาวบ้านในพื้นที่ ซึ่งจะมีการสำรวจตั้งแต่ช่วงเดือนมีนาคม ถึงเดือนตุลาคม โดยช่วงเดือนมีนาคมจะเป็นการสำรวจลักษณะของดอก และช่วงเดือนกรกฎาคมถึงเดือนตุลาคมจะเป็นการเก็บตัวอย่างผลน้อยหน่าเครือ

1.2 การเก็บตัวอย่าง

ในการเก็บตัวอย่างผลน้อยหน่าเครือจะเก็บในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งอยู่ภายใน เมื่อตัวอย่างถึงห้องปฏิบัติการแล้ว จะนำไปเก็บไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียสก่อนจนกว่าจะใช้ทดลอง

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาลักษณะทางเคมีและกายภาพของผลน้อยหน่าเครือ

2.1 ลักษณะทางกายภาพของผลน้อยหน่าเครือ

สังเกตลักษณะทางกายด้วยตาเปล่าและบรรยายลักษณะด้วยภาพถ่าย

2.1.1 วัดขนาดผล น้ำหนักผล น้ำหนักเปลือก น้ำหนักเนื้อ และน้ำหนักเมล็ดน้อยหน่าเครือ วัดขนาดผลและชั่งน้ำหนักของน้อยหน่าเครือทั้งผลโดยใช้เครื่องชั่ง ส่วนเปลือก เนื้อ และเมล็ด ต้องแยกออกจากกันก่อน แล้วชั่งด้วยเครื่องชั่ง เพื่อหาน้ำหนักของแต่ละส่วนต่อผล

2.1.2 สีเปลือก สีเนื้อและสีเมล็ด

การเปรียบเทียบสีเนื้อ สีเปลือกของผล และเมล็ด โดยใช้เครื่อง Minolta รุ่น DP-1000 และรายงานผลเป็นค่า L*, a* และ b* และ Hue angle (H°) โดยการวัด 3 ซ้ำ

2.1.3 ความแน่นเนื้อเปลือก ความแน่นเนื้อ และความแน่นของเมล็ด

ความแน่นเนื้อของผลน้อยหน่าเครือ โดยใช้เครื่อง fruit texture

analyzer โดยใช้ตัวรับแรงกดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร กดลึก 0.5 เซนติเมตร ค่าที่คำนวณได้เป็นกิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

2.2 ลักษณะทางเคมีของผลน้อยหน่าเครือ

2.2.1 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Soluble solid)

การวิเคราะห์ปริมาณ soluble solid (SS) วัดน้ำคั้นจากเนื้อน้อยหน่าเครือโดยใช้ digital refractometor แล้วอ่านค่าเป็น °Brix โดยการวัด 3 ซ้ำ

2.2.2 ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (Titratable acidity), (AOAC, 1990)

โดยนำน้ำคั้นของเนื้อน้อยหน่าเครือปริมาณ 5 มิลลิลิตร เติม phenolphthalein 1% 1-2 หยด เป็น indicator แล้วไตเตรทด้วยสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1N จนกระทั่งถึง end point (น้ำคั้นเปลี่ยนเป็นสีชมพู) นำค่าปริมาณสารละลายด่างที่ใช้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์จากสูตร

$$\%\text{กรดซิตริก (citric acid)} = \frac{\text{ml NaOH x N NaOH x meq.wt ของกรด x 100}}{\text{ปริมาณน้ำคั้นที่ใช้}}$$

โดย N base คือ normality ของสารละลายด่าง NaOH

มิลลิลิตร base คือ ปริมาณของสารละลายที่ใช้ในการไตเตรทเป็นมิลลิลิตร

2.2.3 ปริมาณวิตามินซี (ascorbic acid) (AOAC, 1990)

2.2.3.1 วิธีการเตรียมสารเคมีสำหรับการหาปริมาณวิตามินซี

2.2.3.1.1 สารละลาย metaphosphoric acetic acid

ชั่ง metaphosphoric acid (HPO_3) 15 กรัม ละลายในสารละลายที่มีกรดอะซิติก (HOAc) 40 มิลลิลิตร และน้ำ 200 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร เก็บในอุณหภูมิตู้เย็น (เก็บได้นาน 7-10 วัน)

2.2.3.1.2 สารละลาย Indophenol

ละลายเกลือโซเดียมของ 2-3 dichlorophenollindophenol 0.05 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ที่มี sodiumhydrogencarbonate ($NaHCO_3$) 0.042 กรัม คนจนละลายหมด ปรับปริมาตรให้ครบ 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง แล้วใส่ในขวดสีชาเก็บไว้ในอุณหภูมิตู้เย็น

2.2.3.1.3 สารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid ความเข้มข้น 0.01 กรัม ละลาย ascorbic acid 0.05 กรัม ด้วยสารละลาย metaphosphoric acetic acid (ในข้อ 1) คนจนละลาย แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

2.2.3.2 วิธีการไตเตรทปริมาณวิตามินซี

2.2.3.2.1 ตัวอย่างน้ำน้อยหน่าเครือคั้น

นำน้ำน้อยหน่าเครือคั้นปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมด้วย metaphosphoric acetic acid 5 มิลลิลิตร จากนั้นไตเตรทด้วยสารละลาย indophenol จนถึงจุดยุติ และบันทึกค่าที่ได้

2.2.3.2.2 Standard

นำ ascorbic acid ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมด้วย metaphosphoric acetic acid 5 มิลลิลิตร จากนั้นไตเตรทด้วยสารละลาย indophenol จนถึงจุดยุติ และบันทึกค่าที่ได้

2.2.3.2.3 Blank

นำ metaphosphoric acetic acid ปริมาตร 7 มิลลิลิตร แล้วไตเตรทกับสารละลาย indophenol จนถึงจุดยุติ และบันทึกค่าที่ได้

นำค่าทั้งหมดที่ได้มาคำนวณ จากสูตร

$$\text{ปริมาณวิตามินซี (mg/100 mg ตัวอย่าง)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำคั้นที่ได้ทั้งหมด x (sample – blank)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง x (standard – blank)}} \times 100$$

2.2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนรวม โดยวิธี Kjeldahl Method (AOAC, 2000)

2.2.4.1 สารเคมีที่ใช้

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (Conc. Sulfuric acid)

2. Mix Catalyst (สารผสมระหว่าง copper sulfate: potassium sulfate อัตราส่วน 1:10)

3. Sodium hydroxide เข้มข้นร้อยละ 40 โดยใช้ Sodium hydroxide 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

4. 0.1N Hydrochloric

5. Boric acid เข้มข้นร้อยละ 4 เตรียมโดยต้มน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรให้ร้อน แล้วใส่ผงกรดบอริกลงไป 4.0 กรัม ต้มจนละลายหมด ทิ้งไว้จนสารละลายเย็นลงแล้วจึงเติมน้ำ

อัตรา 150 หยดต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำไประเหยเอาสารละลายออกภายใต้ความดันด้วยเครื่อง rotary evaporator หลังจากนั้นนำบีกเกอร์ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสจนแห้ง ชั่งน้ำหนัก แล้วอบซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำ หนักทั้งสองครั้ง ติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

คำนวณหาปริมาณไขมันจากสูตร

ปริมาณไขมัน (%) = (W_2 / W_1) x 100

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักขวดตัวอย่างก่อนอบ

W_2 คือ น้ำหนักขวดตัวอย่างหลังอบ

2.2.6 การวิเคราะห์ปริมาณใยอาหารโดยใช้วิธีการสกัดด้วยกรด-ด่าง (AOAC, 2000)

2.2.6.1 สารเคมีที่ใช้

1. กรดซัลฟิวริก (1.25N H_2SO_4)
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (1.25N NaOH)
3. เอทิลแอลกอฮอล์ (95% alcohol)

2.2.6.2 วิธีการทดสอบ

นำกระดาษกรองอบในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงแล้วนำมาใส่ในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการสกัดไขมันออกและนำมาใส่ในบีกเกอร์สำหรับวิเคราะห์ใยอาหาร เติมกรดซัลฟิวริก ปริมาตร 200 มิลลิลิตร วางบีกเกอร์ลงบนอุปกรณ์ให้ความร้อนที่ต่อกับเครื่องควบแน่นและเปิดน้ำหล่อเครื่องควบแน่น ต้มให้เดือดนาน 30 นาที แล้วกรองตัวอย่างขณะร้อนผ่านกระดาษกรองล้างด้วยน้ำร้อนจนกระทั่งน้ำล้างหมดความเป็นกรด ถ่ายกากที่ได้ในบีกเกอร์ใบเดิมเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 200 มิลลิลิตร ล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำกระดาษกรองพร้อมกากใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบและอบในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักซ้ำจนกระทั่งได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

คำนวณหาปริมาณใยอาหารจากสูตร

$$\text{ปริมาณใยอาหาร (\%)} = \frac{(M2 - M1)}{S} \times 100$$

เมื่อ M_1 คือน้ำหนักตัวอย่างหลังเผา

M_2 คือผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

S คือน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น

ขั้นตอนที่ 3 วิธีการสกัดสารจากผลน้อยหน่าเครือ

การสกัดสารจากผลน้อยหน่า ทำโดยนำผลน้อยหน่าไปล้างด้วยน้ำคลอรีนแล้วผึ่งจนแห้ง แยกส่วนผลน้อยหน่าออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนของเปลือก เนื้อ และเมล็ดของน้อยหน่า ส่วนของเปลือกและเนื้อ ทำให้แห้งด้วยเทคนิค freez dry จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น ในส่วนที่เป็นเมล็ดจะต้องทำให้ละเอียดด้วยครกหิน แล้วทำการสกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล ปริมาตร 1:3 w/v โดยการแช่ย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองหยาบด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำไประเหยเอาสารละลายออกภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 40 °C ด้วยเครื่อง rotary evaporator เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ (ดัดแปลงจาก Anas Abdelqader et al., 2012)

ขั้นตอนที่ 4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่

4.1 การวัดปริมาณฟีนอลรวม (total Phenolic content) (AOAC, 1990)

4.1.1 สารเคมีที่ใช้

1. 10% Folin phenol reagent
2. 7.5% Na_2CO_3 (โซเดียมคาร์บอเนต)
3. Gallic acid (ใช้ทำกราฟมาตรฐาน)

4.1.2 การเตรียมสารเคมี

1. 10% Folin phenol reagent เตรียม 1 ลิตร

ในสารละลาย Folin 100 มิลลิลิตร มี Folin 10%

ถ้าต้องการเตรียม Folin 10% ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

<u>ดังนั้น</u> ต้องเตรียม Folin 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

2. 7.5% Na_2CO_3 เตรียม 1 ลิตร

ในสารละลาย 100 มิลลิลิตร มี Na_2CO_3 7.5 กรัม

ในสารละลาย 1,000 มิลลิลิตร มี Na_2CO_3 $\frac{7.5 \times 1,000}{100}$ = 75 กรัม

<u>ดังนั้น</u> ต้องชั่ง Na_2CO_3 75 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

3. การเตรียม Gallic acid เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

ชั่ง gallic acid 100 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของ gallic acid 1,000 ส่วนในล้านส่วน หรือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากนั้น เตรียม gallic acid working standard solution 11 ความเข้มข้น คือ 10, 25, 50, 75, 100, 125 , 150, 175, 200, 225 และ 250 ppm

มีวิธีการเตรียมดังนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

เมื่อ C1 คือ ความเข้มข้นของ stock solution ซึ่งเท่ากับ 1,000 ppm

V1 คือ ปริมาตรที่ต้องปิเปตต์จาก stock solution ที่ต้องการทราบ

C2 คือ ความเข้มข้นของสารละลายที่เราต้องการ ซึ่งในที่นี้คือ10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

V2 คือ ปริมาตรของสารละลายที่เราต้องการ ในที่นี้ คือ 10 มิลลิลิตร

$$1{,}000 * V1 = 10 \times 10$$

$$V1 = \frac{10 \times 10}{1{,}000}$$

$$= 0.1 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้น ต้องดูดจาก stock solution ของ gallic acid มา 0.1 มิลลิลิตร แล้วเติมบัฟเฟอร์อีก 9.9 มิลลิลิตร ให้ได้ 10 มิลลิลิตร

การเตรียมกราฟมาตรฐานของ gallic acid ดูได้ดังตาราง 1

ตาราง 1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของ gallic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นที่ต้องการเตรียม (mg/ml)	ปริมาตรของ stock solution (ml)	ปริมาตรของน้ำกลั่น (ml)
0	0	10
10	0.10	9.90
25	0.25	9.75
50	0.50	9.50
75	0.75	9.25
100	1.00	9.00
125	1.25	8.75
150	1.50	8.50
175	1.75	8.25
200	2.00	8.00
225	2.25	7.75
250	2.50	7.50

4.1.3 การทำกราฟมาตรฐาน

เติม 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง แล้วปิเปตสาร gallic acid standard solution ความเข้มข้น 0, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 และ 250 ppm ลงในหลอดทดลองที่มี 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 8 นาที เติม 7.5% Na_2CO_3 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปทำกราฟมาตรฐาน (ค่าที่ได้ควรให้ค่า R2 = 0.99999)

4.1.4 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลทั้งหมด

เติม 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง แล้วปิเปตสารสกัดที่ได้จากการสกัดเปลือก เมล็ด และเนื้อของผลน้อยหน่าเครือด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ลงในหลอดทดลองที่มี 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 8 นาที เติม 7.5% Na_2CO_3 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยใช้ gallic acid เป็นกราฟมาตรฐาน

*** การทำ blank จะเตรียมโดย 2 มิลลิลิตร ของตัวทำละลาย (น้ำ, ethanol และ methanol) + 10 มิลลิลิตร ของ 10% Folin-Ciocalteu reagent + 8 มิลลิลิตร ของ 7.5% Na_2CO_3

4.2 การวัดปริมาณ DPPH (Free radical scavenging) (Turkmen,N.,Sari,F & Velioglu,Y.S., 2005)

4.2.1 สารเคมีที่ใช้

1. สารละลาย DPPH 0.1 มิลลิโมลาร์
2. น้ำ
3. เอทานอล (ethanol)
4. เมทานอล (methanol)

4.2.2 วิธีการทดสอบ DPPH

ชั่งตัวอย่างเปลือก, เนื้อ และเมล็ด อย่างละ 0.3 กรัม เติมตัวทำละลายน้ำ เอทานอล และเมทานอล แต่ชนิดลงไปในตัวอย่างแต่ละชนิด ชนิดละ 50 มิลลิลิตร ปั่นผสมด้วยเครื่องปั่น (blender) ประมาณ 1 นาที แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นนำส่วนใสที่ได้จากการกรองใส่ในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย DPPH 0.1 มิลลิโมลาร์ ลงไปในหลอดทดลอง 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 60 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นา

โนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้ตัวทำละลาย (น้ำ เอทานอล และ เมทานอล) เป็น blank คำนวณหาร้อยละของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\%\text{inhibition} = \frac{\text{Absorbance of control - Absorbance of test sample}}{\text{Absorbance of control}} \times 100$$

เมื่อ Absorbance of control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ในตัวทำละลาย

Absorbance of test sample คือ ค่าการการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

4.3 การวัดปริมาณ FRAP (ferric reducing antioxidant power) (เพชรรุ่ง เทพทอง และคณะ, 2555)

4.3.1 สารเคมีที่ใช้

1. FRAP reagent
2. Acetate buffer (pH 3.6)
3. Ferric chloride solution
4. TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine) solution
5. Ferrous sulfate
6. Trolox
7. $FeSO_4$

4.3.2 วิธีการทดสอบ FRAP

การเตรียมสารละลาย FRAP reagent เตรียมโดยการผสม 300 มิลลิโมลาร์ (mM) ของ acetate buffer (pH 3.6) กับ 20 มิลลิโมลาร์ (mM) Ferric chloride solution และ 10 มิลลิโมลาร์ (mM) ของ TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine) solution ให้เข้ากันในอัตราส่วน 10:1:1 แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ทำการเตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml) ด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ในนาทีที่ 8 ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Ferrous sulfate และ Trolox คำนวณหาปริมาณ Relative antioxidant activity (FRAP value) และค่า TEAC (Trilox equivalent antioxidant capacity) จากกราฟมาตรฐานของ $FeSO_4$ และ Trolox ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ $FeSO_4$, Trolox กับค่า absorpbance โดยต้องเจืองจางสารสกัดตัวอย่างให้อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน

1.4 การวัด ABTS (2, 2'-azinobis-(3-ethylbensothiazoline)-6-sulfonic acid assay) (ดัดแปลงจาก Almeida et al., 2011)

1.4.1 สารเคมีที่ใช้

1. 7mM ABTS
2. Potassium persulfate (K_2SO_5)

1.4.2 วิธีการทดสอบ ABTS

เตรียมสารละลาย ABTS โดยใช้ 7 mM ABTS เติม 140 mM ของสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟสปริมาตร 88 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้เป็นเวลา 14 ชั่วโมง นำตัวอย่างปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย ABTS ปริมาตร 2850 ไมโครลิตร จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร (เตรียม blank โดยการเตรียมสารละลาย ABTS ผสมกับน้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง) คำนวณกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระในหน่วยร้อยละ (%Redical-scavenging activity)

$$\text{Redical-scavenging activity (\%)} = [(B - A) / B] \times 100$$

เมื่อ A คือ ค่าความยาวคลื่นของตัวอย่าง

B คือ ค่าความยาวคลื่นของ blank

1.5 การวัด ORAC (Oxygen radical absorbance capacity assay)

1.5.1 สารเคมีที่ใช้

1. ฟลูออเรสซีน (Fluorescene sodium salt)
2. 2',2' –Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH)
3. Phosphat buffer pH7.0

4.5.2 วิธีการทดสอบ ORAC

นำสารสกัดมา 20 ไมโครลิตร ใส่ใน 96-well plate เติมสารละลายฟลูโอเรสซีน 200 ไมโครลิตร โดยใช้สารละลายฟลูออเรสซีนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้ว หลังจากนั้นนำ 96-well plate ใส่ในเครื่องวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ กำหนดให้ปั๊มภายในเครื่องเติมสารละลาย AAPH (ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที) (Prior et al., 2003; Prior et al., 2005) ความเข้มข้น 63.4 mM ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ลงในหลุมแล้ว ทำการอ่านค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สัมพันธ์ (Relative fluorescence intensity) ทันที โดยมีการ

ตั้งค่าความยาวคลื่น excitation เป็น 480 นาโนเมตร และ emission เป็น 520 นาโนเมตร ทำการอ่านค่าทุก 65 วินาที

ขั้นตอนที่ 5 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

5.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

จุลินทรีย์ทดสอบทั้งหมด 11 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus cereus, Lactobacillus plantarum, Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus faecalis* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli , Pseudomonas aeruginosa, Proteus miramilis* และ *Salmonella typhimurium* เชื้อยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans* และ *Saccharomyces cerevisiae* และ เชื้อรา *Aspergill niger*

การเตรียมจุลินทรีย์จะทำในตู้ปลอดเชื้อ เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้งหมดก่อนนำมาทดสอบในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อผิวเอียง โดยเชื้อแบคทีเรียเลี้ยงในอาหาร TSA slant tube ที่อุณหภูมิ 32.5 ± 2.5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เชื้อรา และยีสต์ เลี้ยงในอาหาร SDA slant tube ที่อุณหภูมิห้อง โดย *C. albicans* บ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ส่วน *A. niger* บ่มเป็นเวลา 3-5 วัน ก่อนนำมาทดสอบ

การเตรียม suspension ของเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้ Tryptone salt solutionส่วน *A. niger* ใช้ Tryptone salt solution ผสม 0.5% polysorbate 80 แล้วนำ suspension ของเซลล์ *A. niger* กรองผ่านกรวยกรองสำลี นำ suspension ของจุลินทรีย์ และ conidias ของเชื้อรา ไปวัดค่าส่งผ่านของแสง (%Transmittance) ที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร โดยใช้ spectopotometer แล้วปรับค่าส่งผ่านของแสง ด้วย Tryptone salt solution และ Tryptone salt solution ผสม 0.5% polysorbate 80 ตามชนิดของจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ 1 x 10^8 cfu/ml

5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดโดยวิธี paper disc diffusion

เตรียมจุลินทรีย์ทดสอบทั้ง 11 สายพันธุ์ โดยใช้ suspension ของเชื้อจากข้อ 4.1 มาเจือจางให้มีปริมาณเซลล์ 10^5-10^6 cfu/ml จากนั้นใช้ไม้สำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงใน suspension ที่เตรียมไว้ แล้วป้ายลงบนอาหาร Tryptone Soy Agar (TSA) สำหรับแบคทีเรีย และป้ายลงบนอาหาร Potato Dextoes Agar (PDA) สำหรับยีสต์และรา ให้ทั่วทั้งจานเพาะเชื้อ แล้วหงายจานเพาะเชื้อไว้เพื่อให้เชื้อซึมลงในอาหารได้อย่างทั่วถึง

เตรียมแผ่น disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นทำการหยดสารสกัดที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (µl) บนแผ่น disc ปล่อยให้แห้ง

แล้วนำไปวางบนจานเพาะเชื้อที่มีการป้ายเชื้อแล้ว โดยมี bacitracine และ gentamicin เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32.5 ± 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรีย ส่วนยีสต์และราบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเกิดโซนใส (inhibition zone) รอบ ๆ แผ่น disc (ดัดแปลงจาก Leon W. Nitiema et al., 2012)

5.3 การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการสกัด Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

ในการทดสอบนี้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ซึ่งจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone soy broth (TSB) การเตรียมสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ โดยนำสารที่สกัดได้จากการสกัดแล้ว มาทำละลายในตัวทำละลายนั้น ๆ ให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบทำได้ด้วยการนำหลอดทดลองขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและแห้งแล้วจำนวน 12 หลอด ปิเปตต์อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวใส่ลงในหลอดที่ 2 -12 หลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตต์สารสกัดลงในหลอดทดลองที่ 1 และ 2 หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมหลอดที่ 2 ให้เท่ากัน แล้วปิเปตต์สารในหลอดที่ 2 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 3 ผสมให้เข้ากัน แล้วเปตต์สารในหลอดที่ 3 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 4 ทำซ้ำไปจนถึงหลอดที่ 11 เมื่อผสมหลอดที่ 11 เสร็จแล้ว ให้ปิเปตต์สารละลายทิ้ง 1 มิลลิลิตร ส่วนหลอดที่ 12 จะมีแต่อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว ซึ่งจะใช้เป็น positive control จะได้ความเข้มข้นของสารสกัด เท่ากับ 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, 0.08 และ 0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่ขนาด 10^5-10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (cfu/ml) ลงในทุกหลอดทดลองจำนวน 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เชื้อรา และยีสต์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง โดย *C. albicans* บ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ส่วน *A. niger* บ่มเป็นเวลา 3-5 วัน เมื่อบ่มครบเวลาที่กำหนดแล้ว ให้สังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่มีจุลินทรีย์เจริญหรืออาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น อ่านค่าปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่า MIC บันทึกหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5.4ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ Minimal microbicidal concentration (MBC)

ค่า MMC จะประกอบด้วย Minimal bactericidal concentration (MBC) และ Minimal fungicidal concentration (MFC) ในการหาค่า MMC หาได้จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้เชื้อไม่เจริญในอาหารเหลวนั้น สามารถนำมาหาค่า MMC ได้ โดยนำหลอดที่ทำการทดสอบจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดไป spread plate บนอาหาร TSA สำหรับแบคทีเรีย และอาหาร PDA สำหรับ เชื้อยีสต์และรา ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ จะไม่พบการเจริญของเชื้อบน

อาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าเชื้อไม่ตายก็จะพบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ดัดแปลงจาก Li et al., 2012; Tenore et al., 2011)

ขั้นตอนที่ 6 วิธีการสกัดน้ำน้อยหน่าเครือสดพร้อมดื่ม

นำส่วนของเนื้อน้อยหน่าเครือที่ทำการแยกเปลือกและเมล็ดออกแล้วใส่ในผ้าขาวบาง คั้นเอาส่วนที่เป็นน้ำออกมา เมื่อได้น้ำคั้นแล้วเก็บในขวดสีชา จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4, 15 และ 30 องศาเซลเซียส แล้วตรวจวัด จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด เชื้อราและยีสต์ด้วยเทคนิค spread plate บนอาหาร Standard Platecount agar และ Rose Bengal agar ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ของแต่ละสภาวะ บ่มที่อุณหภูมิ 32.5 ± 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อบนอาหาร ตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลง pH ปริมาณกรด และบันทึกผลการทดลอง

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การทดลองที่ 1 การสำรวจและการเก็บตัวอย่างน้อยหน่าเครือ

1) การสำรวจตำแหน่งของพื้นที่ ลักษณะการเจริญและชนิดของน้อยหน่าเครือ (ดังตาราง 1) พบว่า พื้นที่ที่พบสายพันธุ์น้อยหน่าเครือผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว มีอยู่ 3 ที่ คือ 1) บ้านขุนลาว ต.เจดีย์ใหม่ อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย พิกัด ; ละติจูด 19; 6; 59.4100 , ลองติจูด 99; 21; 43.4199 2) ต.ป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ พิกัด : ละติจูด 19; 8; 1.9100 , ลองติจูด 98; 39; 17.8599 3) บ้านป่าเหมี้ยง ต.แจ้ซ้อน อ.ปาน จ. ลำปาง ส่วนสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง จะพบที่ ต.ป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ พิกัด : ละติจูด 18; 54; 36.6100 ,ลองติจูด 99; 14; 44.9799 ซึ่งทั้ง 2 สายพันธุ์พบว่ามีการเจริญอยู่บนหุบเขาที่มีแหล่งน้ำไหลผ่าน ที่ระดับความสูง 1000 เมตรขึ้นไป (ตาราง 1) ช่วงเวลาการออกดอกของน้อยหน่าเครือทั้ง 2 สายพันธุ์ อยู่ในช่วงเดือนมีนาคม และเริ่มพัฒนาเป็นผลอ่อนประมาณเดือนเมษายน เป็นต้นไป โดยผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว จะสามารถเก็บเกี่ยวผลได้ในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิกายน (ในจังหวัดเชียงราย) ส่วนพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดงจะสามารถเก็บเกี่ยวผลได้ประมาณเดือนมกราคม (ในจังหวัดเชียงราย) แต่ถ้าพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดงออกทวายจะสามารถเก็บเกี่ยวผลได้ประมาณช่วงเดือนมีนาคม (ในจังหวัดเชียงใหม่) (ตาราง 2)

ตาราง 1 ชนิดของน้อยหน่าเครือ พื้นที่ที่พบ และแหล่งเจริญเติบโตของน้อยหน่าเครือ

พันธุ์น้อยหน่าเครือ	พื้นที่ที่พบน้อยหน่าเครือ	พิกัดทางภูมิศาสตร์		แหล่งเจริญเติบโตของน้อยหน่าเครือ
		Latitude	Longitude	
ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว	1) บ้านขุนลาว ต.เจดีย์ใหม่ อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย	19; 6; 59.4100	99; 21; 43.4199	เจริญเติบโตอยู่บนหุบเขาที่มีแหล่งน้ำไหลผ่าน ที่ความสูงระดับ 1000 เมตรขึ้นไป
	2) ต.ป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่	19; 8; 1.9100	98; 39; 17.8599	
	3) บ้านป่าเหมี้ยง ต.แจ้ซ้อน อ.ปาน จ.ลำปาง	-	-	

ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง	1) ต.ป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่	18; 54; 36.6100	99; 14; 44.9799	เจริญเติบโตอยู่บนหุบเขาที่มีแหล่งน้ำไหลผ่าน ที่ความสูงระดับ 1000 เมตรขึ้นไป

ตาราง 2 ระยะเวลาการออกดอก ติดผล และการเก็บเกี่ยวผลผลิตของน้อยหน่าเครือ

พันธุ์น้อยหน่าเครือ	ช่วงเวลาการออกดอก	ช่วงเวลาการติดผล	ช่วงเวลาการเก็บเกี่ยว
ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว (จังหวัดเชียงราย)	เดือนมีนาคม	เดือนเมษายนถึงเดือนกันยายน	เดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิกายน
ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง	เดือนมีนาคม	เดือนเมษายนถึงเดือนพฤศจิกายน	1) เดือนมกราคม (จังหวัดเชียงราย) 2) ออกทวายช่วงเดือนมีนาคม (จังหวัดเชียงใหม่)

2) ภาพการสำรวจน้อยหน่าเครือ

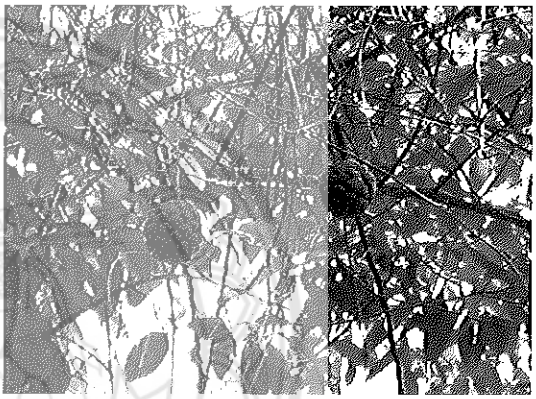
ภาพ 1 ลักษณะเส้นทางการเดินรถ

ภาพ 2 ลักษณะเส้นทางการเดินเท้า

ภาพ 3 ลักษณะต้นของน้อยหน่าเครือ

ภาพ 4 ลักษณะใบของน้อยหน่าเครือ

ภาพ 5 ลักษณะการออกดอกของน้อยหน่าเครือ



ภาพ 6 ลักษณะการออกผลของน้อยหน่าเครือ

4.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาลักษณะทางเคมีและกายภาพของผลน้อยหน่าเครือ

ลักษณะทางกายภาพของผลน้อยหน่าเครือ

1) การวิเคราะห์ขนาด/น้ำหนัก

พบว่า ขนาดและน้ำหนักของผลน้อยหน่าเครือทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว มีความกว้าง 14.70 เซนติเมตร ยาว 12.50 เซนติเมตร และมีน้ำหนัก 1.22 กิโลกรัม ส่วนสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง มีความกว้าง 8.80 เซนติเมตร ยาว 9.70 เซนติเมตร และมีน้ำหนัก 0.28 กิโลกรัม (ตาราง 3)

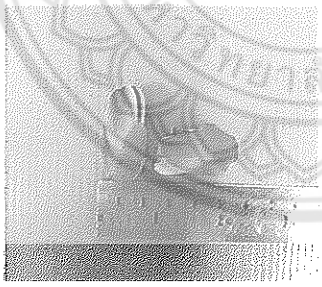
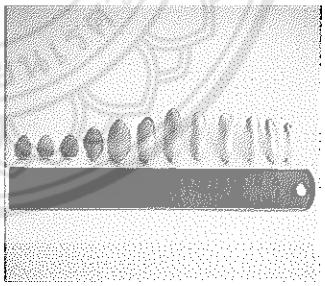
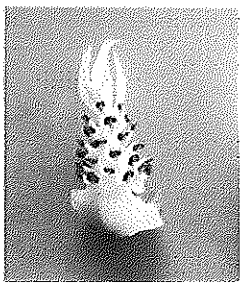
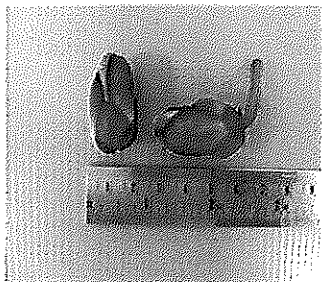
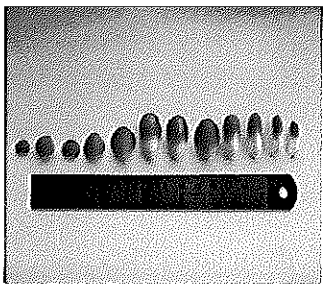
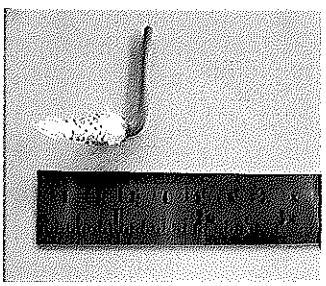
ตาราง 3 ขนาดและน้ำหนักของผลน้อยหน่าเครือ

พันธุ์น้อยหน่าเครือ	ความกว้าง (ซม.)	ความยาว (ซม.)	น้ำหนัก (กก.)
ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว	14.70	12.50	1.22
ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง	8.80	9.70	0.28

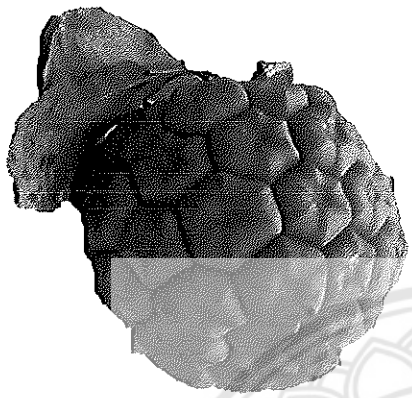
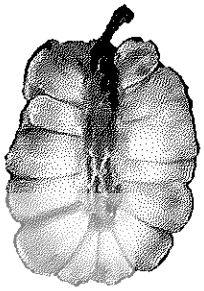
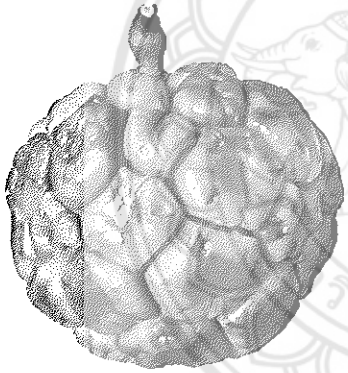
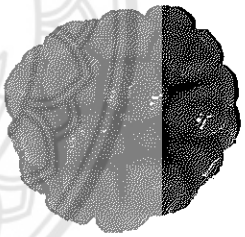
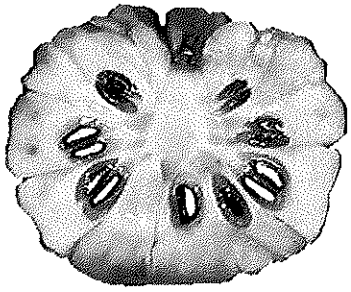
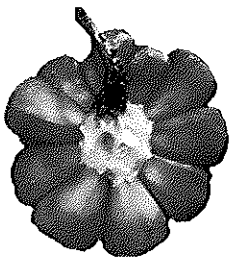
2) ลักษณะดอกและผลน้อยหน่าเครือ

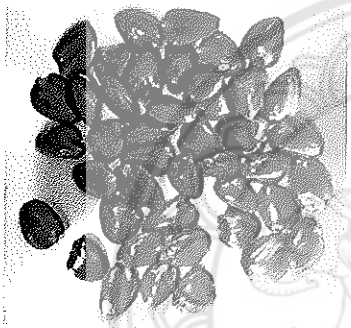
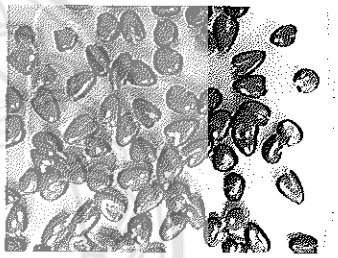
พบว่า ลักษณะดอกน้อยหน่าเครือของทั้ง 2 สายพันธุ์ มีเอกลักษณ์เฉพาะ คือ พันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว จะมีกลีบดอกส่วนนอกเป็นสีเขียว กลีบดอกส่วนในเป็นสีขาว ปลายกลีบดอกเป็นสีแดง ส่วนพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดงจะมีกลีบดอกด้านนอกเป็นสีแดงทั้งหมด ส่วนกลีบดอกด้านในส่วนบนมีสีแดง ส่วนกลีบดอกด้านล่างเป็นสีขาว โดยทั้ง 2 สายพันธุ์จะมีกลีบดอกทั้งหมดประมาณ 12 กลีบ ในส่วนของเกสรจะมีทั้งเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียในดอกเดียวกัน ซึ่งเกสรตัวเมียจะอยู่ส่วนปลายของดอก (ตาราง 4) ลักษณะผลของน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาวและพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง โดยทั้ง 2 สายพันธุ์ มีลักษณะเปลือกหนา และมีแกนกลาง ในส่วนของสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว ผลดิบเปลือกด้านนอกจะมีสีเขียว เมื่อผลสุกเปลือกด้านนอกจะมีสีเหลืองอ่อน และเปลือกด้านในมีสีชมพู ลักษณะผลย่อยเนื้อในสีขาว เมล็ดมีลักษณะคล้ายรูปหัวใจสีน้ำตาลเข้ม ส่วนสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง ผลดิบเปลือกด้านนอกจะมีสีเขียว เมื่อผลสุกเปลือกด้านนอกและด้านในจะมีสีแดง ลักษณะผลย่อยเนื้อในสีแดง เมล็ดมีลักษณะคล้ายรูปหัวใจสีน้ำตาลเข้ม (ตาราง 5)

ตาราง 4 ลักษณะของดอก กลีบดอก และเกสรของน้อยหน่าเครือ 2 สายพันธุ์

พันธุ์น้อยหน่าเครือ	ลักษณะ		
	ดอก	กลีบดอก	เกสร
ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว			
ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง			

ตาราง 5 ลักษณะผลของน้อยหน่าเครือ 2 สายพันธุ์

สายพันธุ์น้อยหน่าเครือ	
ผลดิบเปลือกสีเขียว ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว	ผลดิบเปลือกสีเขียว ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง
 ลักษณะผลดิบเปลือกสีเขียว	 ลักษณะผลดิบเปลือกสีเขียว
 ลักษณะผลสุกเปลือกสีเหลือง	 ลักษณะผลสุกเปลือกสีแดง
 ลักษณะเนื้อในผลสุก	 ลักษณะเนื้อในผลสุก

สายพันธุ์น้อยหน่าเครือ	
ผลดิบเปลือกสีเขียว ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว	ผลดิบเปลือกสีเขียว ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง
ลักษณะผลย่อยเนื้อในสีขาว	ลักษณะผลย่อยเนื้อในสีแดง
 ลักษณะเมล็ด	 ลักษณะเมล็ด

3) ลักษณะของสีเปลือก สีเนื้อ และความแน่นเนื้อของผลน้อยหน่าเครือ

การเทียบสีของเปลือกและเนื้อของผลน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว โดยทำการวัด 3 บริเวณ คือ เปลือกนอก เปลือกใน และเนื้อ ในบริเวณเปลือกนอกวัดค่าการเทียบสีเฉลี่ยได้ ค่า a* เท่ากับ 15.9, ค่า b* เท่ากับ 26.2, ค่า L* เท่ากับ 34.3 และค่า H° เท่ากับ 60.8 ส่วนบริเวณเปลือกในวัดค่าการเทียบสีเฉลี่ยได้ ค่า a* เท่ากับ 20.2, ค่า b* เท่ากับ 24.4, ค่า L* เท่ากับ 40.4 และค่า H° เท่ากับ 48.1 และบริเวณเนื้อวัดค่าการเทียบสีเฉลี่ยได้ ค่า a* เท่ากับ 10.1, ค่า b* เท่ากับ 40.2, ค่า L* เท่ากับ 46.6 และค่า H° เท่ากับ 72.8 (ตาราง 6)

การเทียบสีของเปลือกและเนื้อของผลน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง โดยทำการวัดบริเวณเปลือก วัดค่าการเทียบสีเฉลี่ยได้ ค่า a* เท่ากับ 20.9, ค่า b* เท่ากับ 32.0, ค่า L* เท่ากับ 21.8 และค่า H° เท่ากับ 56.9 (ตาราง 7) โดยน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว และพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง มีค่าความแน่นเนื้อเฉลี่ยเท่ากับ 3.99 และ 2.82 $kg./cm^3$ ตามลำดับ (ตาราง 8)

ตาราง 6 ลักษณะสีของเปลือกและเนื้อน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว

บริเวณที่วัด	ลักษณะของสี			
	a*	b*	L*	H^o
เปลือกนอก	15.9	26.2	34.3	60.8
เปลือกใน	20.2	24.4	40.4	48.1
เนื้อ	10.1	40.2	46.6	72.8

ตาราง 7 ลักษณะสีของเปลือกน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง

บริเวณที่วัด	ลักษณะของสี			
	a*	b*	L*	H^o
เปลือก	20.9	32.0	21.8	56.9

ตาราง 8 ลักษณะความแน่นเนื้อของเปลือกน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว และพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง

พันธุ์น้อยหน่าเครือ	ความแน่นเนื้อ ($kg./cm^3$)
ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว	3.99
ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง	2.82

ลักษณะทางเคมีของผลน้อยหน่าเครือ

ลักษณะทางเคมีของน้ำน้อยหน่าเครือสด ในสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว มีค่า pH เท่ากับ 2.88, ค่า Soluble solid (SS) เท่ากับ 6.43%, ค่า Titratable acidity (TA) เท่ากับ 1.64% และมีปริมาณวิตามินซี เท่ากับ 7.22 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมตัวอย่าง ส่วนสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง มีค่า pH เท่ากับ 3.07, ค่า Soluble solid (SS) เท่ากับ 6.30%, ค่า Titratable acidity (TA) เท่ากับ 1.41% และมีปริมาณวิตามินซี เท่ากับ 0.70 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมตัวอย่าง (ตาราง 9)

ตาราง 9 ลักษณะทางเคมีของน้อยหน่าเครือ

คุณภาพ	ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว	ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง
pH	2.88	3.07
%Total soluble solid (TSS) (^{o}Brix)	6.43	6.30
%Titratable acidity (TA)	1.64	1.41
ปริมาณวิตามินซี (mg/100 mg ตัวอย่าง)	7.22	0.70

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการของน้อยหน่าเครือ

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้อยหน่าเครือทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าในเนื้อน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลืองมีปริมาณความชื้น 93.80% คาร์โบไฮเดรต 4.18% ปริมาณโปรตีน 0.28% ปริมาณไขมัน 0.12% มีปริมาณเยื่อใย 0.80% และปริมาณเถ้าเท่ากับ 0.19% ส่วนเนื้อน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดงมีปริมาณความชื้น 90.29% คาร์โบไฮเดรต 7.21% ปริมาณโปรตีน 0.54% ปริมาณไขมัน 0.14% มีปริมาณเยื่อใย 1.48% และปริมาณเถ้าเท่ากับ 0.34% (ตาราง 10)

ตาราง 10 องค์ประกอบทางโภชนาการของเนื้อน้อยหน่าเครือ

องค์ประกอบทางโภชนาการ (% น้ำหนักเปียก)	สายพันธุ์น้อยหน่าเครือ	
	ผลสุกเปลือกสีเหลือง	ผลสุกเปลือกสีแดง
ความชื้น	93.80	90.29
คาร์โบไฮเดรต	4.81	7.21
โปรตีน	0.28	0.54
ไขมัน	0.12	0.14
เยื่อใย	0.80	1.48
เถ้า	0.19	0.34

4.3 การทดลองที่ 3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วิธีการสกัดสารจากผลน้อยหน่าเครือ

การสกัดสารจากผลน้อยหน่า ทำโดยนำผลน้อยหน่าไปล้างด้วยน้ำคลอรีนแล้วผึ่งจนแห้ง แยกส่วนผลน้อยหน่าออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนของเปลือก เนื้อ และเมล็ดของน้อยหน่า ส่วนของเปลือกและเนื้อ ทำให้แห้งด้วยเทคนิค freez dry จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น ในส่วนที่เป็นเมล็ดจะต้องทำ

ให้ละเอียดด้วยครกหิน แล้วทำการสกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล ปริมาตร 1:3 w/v โดยการแช่ย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองหยาบด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำไประเหยเอาสารละลายออกภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 40 oC ด้วยเครื่อง rotary evaporator เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ (ดัดแปลงจาก Anas Abdelqader et al., 2012)

การวัดปริมาณฟีนอลรวม (total Phenolic content) (AOAC, 1990)

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมดโดยใช้สารละลาย gallic acid เป็นมาตรฐาน พบว่า สารสกัดจากจากเปลือก เนื้อ และเมล็ดน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลืองมีปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 150.71-178.51 µg GEA/ml (ตาราง 11) โดยที่สารสกัดหยาบจากเนื้อน้อยหน่าเครือที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายมีปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมดสูงที่สุด ในขณะที่สารสกัดหยาบจากเปลือกน้อยน่าเครือที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายมีปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมดน้อยที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ต่อกับหมู่แอริล (R) ซึ่งสามารถถูกจับด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วใกล้เคียงกัน โดยส่วนใหญ่สารประกอบฟีนอลิกจะละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูง (Jung, et al., 2006) ดังนั้นการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำจึงมีปริมาณฟีนอลิกมากกว่าตัวทำละลายเอทานอล และเมทานอล

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

1. กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดจากเปลือก เนื้อ และเมล็ดของน้อยหน่าเครือ พบว่าสารสกัดจากจากเปลือก เนื้อ และเมล็ดน้อยหน่าเครือมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ระหว่างร้อยละ 31.97-47.51 โดยที่สารสกัดหยาบจากเนื้อน้อยหน่าเครือที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด และสารสกัดหยาบจากเมล็ดน้อยหน่าเครือที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ให้ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยที่สุด

2. กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP เป็นวิธีที่ใช้วัด total reducing power ของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้ Fe3+เปลี่ยนเป็น Fe2+ ได้ เทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานTrolox (เพชรรุ่ง เทพทอง และคณะ 2555) พบว่าสารสกัดจากจากเปลือก เนื้อ และเมล็ดน้อยหน่าเครือมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ระหว่าง 13.08-27.62 mg TEAC/g (ตาราง 11) โดยที่สารสกัดหยาบจากเนื้อน้อยหน่าเครือที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ FRAP มากที่สุด และสารสกัดหยาบจากเปลือกน้อยหน่าเครือที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด

3. กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS เป็นการวิเคราะห์โดยใช้สาร สาร 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS ที่มีสูตรโมเลกุล C18H18N4O6S4 มาทำให้เป็นอนุมูลอิสระโดยการถูกออกซิไดซ์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ให้กลายเป็น ABTS•+ (Re et al., 1999) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Trolox พบว่าสารสกัดจากจากเปลือก เนื้อ และเมล็ดน้อยหน่าเครือมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ระหว่าง 2.54-4.36 mM TEAC/mg (ตาราง 4) โดยที่สารสกัดหยาบจากเปลือกที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS มากที่สุด และสารสกัดหยาบจากเมล็ดน้อยหน่าเครือที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS น้อยที่สุด

4. กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ORAC

ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลเปอร์ออกซี (peroxyl radical) ของสารสกัดจากเปลือก เนื้อ และเมล็ดน้อยหน่าเครือด้วยวิธี Oxygen redical absorbance capacity (ORAC) assay พบว่าการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือก เนื้อ และเมล็ดน้อยหน่าเครือมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ORAC เท่ากับ 3,816, 2,122 และ 7,169 µM TE/100 กรัม ตามลำดับ (ตาราง 11)

ตาราง 11 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดจากน้อยหน่าเครือ (สายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง) จำแนกตามตัวอย่างตัวทำละลาย

ตัวอย่าง	ตัวทำละลาย	วิธีวิเคราะห์				ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (µg GEA/ml)
		DPPH (%)	FRAP (mg TEAC/g)	ABTS (mM TEAC/mg)	ORAC (µM TE/100 g)	
เปลือก	เอทานอล	37.76 ± 6.65	20.27 ± 1.81	3.89 ± 0.47	NT	164.07 ± 2.12
	เมทานอล	32.21 ± 1.76	13.08 ± 0.37	3.09 ± 0.26	3,816	150.71 ± 6.94
	น้ำ	45.34 ± 4.52	18.09 ± 1.48	4.36 ± 0.28	NT	172.64 ± 6.16
เนื้อ	เอทานอล	43.69 ± 4.45	21.00 ± 0.74	3.51 ± 0.34	NT	169.62 ± 8.34
	เมทานอล	37.91 ± 2.67	27.62 ± 0.40	2.97 ± 0.34	2,122	151.98 ± 4.14
	น้ำ	47.51 ± 6.09	22.12 ± 0.18	4.11 ± 0.33	NT	178.51 ± 3.49
เมล็ด	เอทานอล	40.15 ± 2.25	24.07 ± 1.57	3.10 ± 0.29	NT	168.50 ± 3.96
	เมทานอล	31.97 ± 3.84	26.71 ± 0.60	2.54 ± 0.20	7,169	155.60 ± 1.17
	น้ำ	42.96 ± 4.21	20.41 ± 0.55	3.87 ± 0.48	NT	174.15 ± 0.59

หมายเหตุ : NT หมายถึง ไม่ได้ทดสอบ (not test)

4.4 การทดลองที่ 4 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

ผลการศึกษาการยับยั้งเชื้อทดสอบต่างๆ โดยใช้สารสกัดหยาบจากเปลือกและเนื้อของผลน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว จากจังหวัดเชียงราย ผลการศึกษาแสดงดังตาราง 10 , 11 และภาพ 7 , 8 จากตาราง 12 พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกน้อยหน่าเครือที่สกัดด้วยน้ำ สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Streptococcus faecaliis, Lactobacillus plantarum, Escherichia coli, Proteus milabilis, Pseudomonas aeruginosa,* และ *Sallmonella typhimurium* ได้ โดยให้ค่าเฉลี่ย clear zone เท่ากับ 12.80, 15.00, 9.27, 9.36, 11.87, 10.87, 11.70 และ 9.87 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากเปลือกที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Streptococcus faecaliis, Lactobacillus plantarum, Escherichia coli, Proteus milabilis, Pseudomonas aeruginosa,* และ *Sallmonella typhimurium* โดยให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.27, 11.73, 7.67, 8.21, 10.80, 9.87, 12.47 และ 11.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสารสกัดหยาบจากเปลือกที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Streptococcus faecaliis, Lactobacillus plantarum, Escherichia coli, Proteus milabilis, Pseudomonas aeruginosa,* และ *Sallmonella typhimurium* โดยให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.77, 12.47, 8.53, 10.10, 8.66, 9.77, 10.87 และ 12.10 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากตาราง 13 พบว่าสารสกัดหยาบจากเนื้อที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Streptococcus faecaliis, Lactobacillus plantarum, Escherichia coli, Proteus milabilis, Pseudomonas aeruginosa,* และ *Sallmonella typhimurium* โดยให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.07, 10.93, 7.60, 7.66, 8.67, 8.07, 9.20 และ 6.50 เซนติเมตร ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากเนื้อที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Streptococcus faecaliis, Lactobacillus plantarum, Escherichia coli, Proteus milabilis, Pseudomonas aeruginosa,* และ *Sallmonella typhimurium* โดยให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.73, 10.23, 7.23, 6.95, 8.63, 8.33, 9.70 และ 6.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากเนื้อที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Streptococcus faecaliis, Lactobacillus plantarum, Escherichia coli, Proteus milabilis, Pseudomonas aeruginosa,* และ *Sallmonella typhimurium* โดยให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.50, 9.57, 9.50, 8.77, 8.97, 8.67, 8.93 และ 7.43 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วน positive control ที่ใช้ คือ Bacitracin สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Streptococcus faecaliis,* และ *Sallmonella typhimurium* โดยให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 16.73, 12.23, 25.59 และ 9.00 มิลลิเมตร เชื้อ *Escherichia coli, Proteus milabilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* ไม่สามารถยับยั้งได้ และ

ตาราง 13 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง Clear zone (mm) ของจุลินทรีย์ที่เกิดจากการยับยั้งของสารสกัดหยาบจากเนื้อน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาวที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ

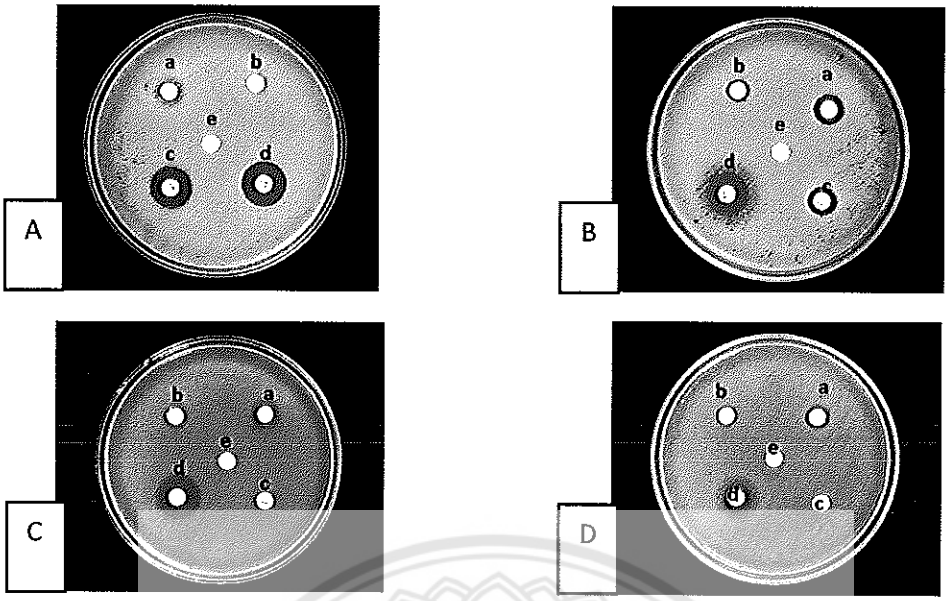
จุลินทรีย์ทดสอบ	Clear zone ± SD (mm)				
	ตัวทำละลาย			positive control	
	เอทานอล	เมทานอล	น้ำ	Bacitracin	gentamycin
Staphylococcus aureus	8.73±0.25	8.50±0.82	8.07±0.32	16.73±0.21	17.50±0.26
Streptococcus faecalis	7.23±0.75	9.50±2.31	7.60±0.10	25.59±2.65	19.60±0.56
Lactobacillus plantarum	6.95±0.33	8.77±0.28	7.66±0.09	24.47±0.71	18.79±0.80
Bacillus cereus	10.23±0.21	9.57±0.25	10.93±0.49	12.23±0.95	17.77±0.38
Escherichia coli	8.63±0.06	8.97±0.21	8.67±0.45	-	14.23±0.67
Proteus milabilis	8.33±0.15	8.67±0.06	8.07±0.06	-	19.67±0.64
Pseudomonas aeruginosa	9.70±0.35	8.93±0.32	9.20±1.04	-	18.40±1.22
Salmomella typhimurium	6.50±0.00	7.43±0.06	6.50±0.00	9.00±0.00	12.67±0.58

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่พบ clear zone

ตาราง 14 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง Clear zone (mm) ของจุลินทรีย์ที่เกิดจากการยับยั้งของสารสกัดหยาบจากเมล็ดน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาวที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ

จุลินทรีย์ทดสอบ	Clear zone ± SD (mm)				
	ตัวทำละลาย			positive control	
	เอทานอล	เมทานอล	น้ำ	Bacitracin	Gentamycin
Staphylococcus aureus	12.53±0.15	11.00±1.73	13.97±0.21	16.73±0.21	17.50±0.26
Streptococcus faecalis	8.73±0.25	8.93±0.32	9.97±0.21	25.59±2.65	19.60±0.56
Lactobacillus plantarum	8.67±0.21	9.03±0.38	9.77±0.06	24.47±0.71	18.79±0.80
Bacillus cereus	12.13±0.21	12.53±0.06	15.23±0.06	12.23±0.95	17.77±0.38
Escherichia coli	11.47±0.25	11.40±0.20	12.07±0.21	-	14.23±0.67
Proteus milabilis	11.07±0.15	10.97±0.21	11.60±0.10	-	19.67±0.64
Pseudomonas aeruginosa	12.90±0.10	11.33±0.15	12.83±1.32	-	18.40±1.22
Salmomella typhimurium	11.87±0.21	12.73±0.21	10.17±0.40	9.00±0.00	12.67±0.58

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่พบ clear zone



ภาพ 7 clear zone ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดหยาบของน้อยหน่าเครือ

A = *Staphylococcus aureus* B = *Bacillus cereus*

C = *Pseudomonas aeruginosa* และ D = *Proteus milabilis*

โดย a = สารสกัดจากเปลือก, b = สารสกัดจากเนื้อ, c = bacitracin, d = gentamycin และ e = negative control (DMSO)

ตาราง 15 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง Clear zone (mm) ของจุลินทรีย์ที่เกิดจากการยับยั้งของสารสกัดหยาบจากเปลือกน้อยหน่าเครือพันธุ์เปลือกสีแดงที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ

จุลินทรีย์	โซนใส ± SD (มม.)				
	ตัวทำละลาย			positive control	
	เอทานอล	เมทานอล	น้ำ	Bacitracin	gentamycin
Staphylococcus aureus	8.07±2.69	-	-	16.73±0.21	17.50±0.26
Streptococcus faecalis	-	-	-	25.59±2.65	19.60±0.56
Lactobacillus plantarum	-	-	-	24.47±0.71	18.79±0.80
Bacillus cereus	8.10±2.70	6.67±2.22	-	12.23±0.95	17.77±0.38
Proteus milabilis	6.50±0.00	-	-	-	19.67±0.64
Salmomella typhimurium	-	-	-	9.00±0.00	12.67±0.58

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่พบ clear zone

ตาราง 16 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง Clear zone (mm) ของจุลินทรีย์ที่เกิดจากการยับยั้งของสารสกัดหยาบจากเนื้อน้อยหน่าเครือพันธุ์เปลือกสีแดงที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ

จุลินทรีย์	โซนใส ± SD (มม.)				
	ตัวทำละลาย			positive control	
	เอทานอล	เมทานอล	น้ำ	Bacitracin	gentamycin
Staphylococcus aureus	6.77±2.26	7.10±2.37	-	16.73±0.21	17.50±0.26
Streptococcus faecalis	7.83±2.61	7.10±2.37	-	25.59±2.65	19.60±0.56
Lactobacillus plantarum	7.39±0.27	8.23±0.29	-	24.47±0.71	18.79±0.80
Bacillus cereus	10.07±3.35	11.83±3.94	10.73±3.58	12.23±0.95	17.77±0.38
Proteus milabilis	11.70±3.90	13.73±4.58	13.37±4.46	-	19.67±0.64
Salmomella typhimurium	8.60±2.87	10.07±3.36	10.43±3.48	9.00±0.00	12.67±0.58

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่พบ clear zone

สารสกัดหยาบจากเปลือกที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* และ *Proteus milabilis* โดยให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.07, 8.10 และ 6.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Streptococcus faecalis* และ *Salmomella typhimurium* ได้ และสารสกัดหยาบจากเปลือกที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* โดยให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.67 มิลลิเมตร แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Proteus milabilis* และ *Salmomella typhimurium* ส่วนสารสกัดหยาบจากเปลือกที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายไม่สามารถยับยั้งเชื้อที่นำมาทดสอบได้ทุกชนิด ดังตาราง 15 สารสกัดหยาบจากเนื้อที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus, Streptococcus faecaliis, Bacillus cereus, Proteus milabilis* และ *Sallmonella typhimurium* โดยให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.77, 7.83, 10.07, 11.70 และ 8.60 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากเนื้อที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus, Streptococcus faecaliis, Bacillus cereus, Proteus milabilis* และ *Sallmonella typhimurium* โดยให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.10, 7.10, 11.83, 13.73 และ 10.07 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดหยาบจากเนื้อที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย สามารถยับยั้งเชื้อ, *Bacillus cereus, Proteus milabilis* และ *Sallmonella typhimurium* โดยให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.73, 13.37 และ 10.43 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus faecaliis* ได้ ดังตาราง 16

ส่วน positive control ที่ใช้ คือ Bacitracin สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Streptococcus faecaliis,* และ *Sallmonella typhimurium* โดยให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 16.73, 12.23, 25.59 และ 9.00 มิลลิเมตร เชื้อ *Escherichia coli, Proteus milabilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* ไม่สามารถยับยั้งได้ และ Gentamycin สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Streptococcus faecaliis, Escherichia coli, Proteus milabilis, Pseudomonas aeruginosa,* และ *Sallmonella typhimurium* โดยให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 17.50, 17.77, 19.60, 14.23, 19.67, 18.40 และ 12.67 มิลลิเมตร

ภาพ 8 clear zone ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดหยาบของน้อยหน่าเครือ E = *Bacillus cereus* และ F = *Proteus milabilis* โดย a = สารสกัดจากเนื้อ, b = สารสกัดจากเปลือก, c = gentamycin, d = bacitracin และ e = negative control (DMSO)

ตาราง 17 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากเปลือก เนื้อ และเมล็ดน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาวที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ

จุลินทรีย์	MIC (mg/ml)								
	สารสกัดหยาบจากเปลือก			สารสกัดหยาบจากเนื้อ			สารสกัดหยาบจากเมล็ด		
	เอทานอล	เมทานอล	น้ำ	เอทานอล	เมทานอล	น้ำ	เอทานอล	เมทานอล	น้ำ
S. aureus	25	25	25	25	25	25	25	25	12.5
S. faecalis	50	25	25	50	25	50	50	25	25
L. plantarum	25	25	25	50	25	50	50	25	25
B. cereus	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
E. coli	25	25	25	12.5	25	12.5	25	25	12.5

จุลินทรีย์	MIC (mg/ml)								
	สารสกัดหยาบจากเปลือก			สารสกัดหยาบจากเนื้อ			สารสกัดหยาบจากเมล็ด		
	เอทานอล	เมทานอล	น้ำ	เอทานอล	เมทานอล	น้ำ	เอทานอล	เมทานอล	น้ำ
P. milabilis	25	12.5	12.5	25	12.5	25	25	12.5	12.5
P. aeruginosa	12.5	12.5	12.5	12.5	50	25	12.5	12.5	12.5
S. typhimurium	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5

ตาราง 18 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกและเนื้อน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดงที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ

จุลินทรีย์	MIC (mg/ml)					
	สารสกัดหยาบจากเปลือก			สารสกัดหยาบจากเนื้อ		
	เอทานอล	เมทานอล	น้ำ	เอทานอล	เมทานอล	น้ำ
Staphylococcus aureus	25	-	-	25	25	-
Streptococcus faecalis	-	-	-	50	50	-
Lactobacillus plantarum	-	-	-	50	25	-
Bacillus cereus	25	100	-	6.25	6.25	12.5
Proteus milabilis	50	-	-	25	12.5	12.5
Salmonella typhimurium	-	-	-	12.5	12.5	12.5

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่ได้ทดสอบ

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากผลน้อยหน่าเครือทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าเปลือกน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาวที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่า MIC อยู่ในช่วง 12.5-25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อทดสอบที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุดคือ *B. cereus, Ps. aeruginosa* และ *S. typhimurium* สารสกัดด้วยเมทานอลมีค่า MIC อยู่ในช่วง 12.5-25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุด คือ *B. cereus, P. milabilis, Ps. aeruginosa* และ *S.*

typhimurium และสารสกัดด้วยน้ำมีค่า MIC อยู่ในช่วง 12.5-25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุด คือ *B. cereus, P. milabilis, Ps. aeruginosa* และ *S. typhimurium* ส่วนสารสกัดจากเนื้อน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาวที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่า MIC อยู่ในช่วง 12.5-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อทดสอบที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุดคือ *B. cereus, E. coli, Ps. aeruginosa* และ *S. typhimurium* สารสกัดด้วยเมทานอลมีค่า MIC อยู่ในช่วง 12.5-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุด คือ *B. cereus, P. milabilis* และ *S. typhimurium* และสารสกัดด้วยน้ำมีค่า MIC อยู่ในช่วง 12.5-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุด คือ *B. cereus, E. coli* และ *S. typhimurium* สารสกัดหยาบจากเมล็ดน้อยหน่าเครือที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่า MIC อยู่ในช่วง 12.5-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเชื้อที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุดคือ *B. cereus, P. aeruginosa* และ *S. typhimurium* สารสกัดหยาบที่ใช้สกัดด้วยเมทานอลมีค่า MIC อยู่ในช่วง 12.5-25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุดคือ *B. cereus, P. milabilis, Ps. aeruginosa* และ *S. typhimurium* และสารสกัดหยาบจากเมล็ดที่สกัดด้วยน้ำมีค่า MIC อยู่ในช่วง 12.5-25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุดคือ *B. cereus, E. coli, P. milabilis, P. aeruginosa* และ *S. typhimurium* ดังตาราง 17

จากตาราง 15 พบว่าสารสกัดจากเปลือกน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดงที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่า MIC เท่ากับ 25-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อทดสอบที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุดคือ *S. aureus* และ *B. cereus* และสารสกัดด้วยเมทานอลมีค่า MIC เท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุด คือ *B. cereus* ส่วนสารสกัดจากเนื้อน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดงที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่า MIC อยู่ในช่วง 6.25-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อทดสอบที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุดคือ *B. cereus* สารสกัดด้วยเมทานอลมีค่า MIC อยู่ในช่วง 6.25-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุด คือ *B. cereus* และสารสกัดด้วยน้ำมีค่า MIC อยู่ในช่วง 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุด คือ *B. cereus, P. milabilis* และ *S. typhimurium* ดังตาราง 18

ตาราง 19 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือก เนื้อ และเมล็ดของน้อยหน่าเครือ (สายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง) ที่สกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และน้ำ

จุลินทรีย์	MBC (mg/ml)								
	สารสกัดหยาบจากเปลือก			สารสกัดหยาบจากเนื้อ			สารสกัดหยาบจากเมล็ด		
	เอทานอล	เมทานอล	น้ำ	เอทานอล	เมทานอล	น้ำ	เอทานอล	เมทานอล	น้ำ
S. aureus	50	50	50	100	50	50	50	50	50
S. faecalis	100	50	50	100	50	100	100	50	50
L. plantarum	50	50	50	100	50	100	100	50	50
B. cereus	25	50	25	25	50	25	25	25	25
E. coli	50	50	50	50	50	50	50	50	50
P. milabilis	50	25	50	50	25	50	50	50	25
P. aeruginosa	50	25	25	50	50	50	25	50	25
S. typhimurium	100	100	>100	100	>100	100	100	50	100

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากผลน้อยหน่าเครือ ผลการทดสอบค่าต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ได้ (MBC) พบว่า จากตาราง 9 ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ได้ของสารสกัดจากผลน้อยหน่าเครือสามารถหาได้จากการนำผลของค่า MIC ทุกความเข้มข้นมาทดสอบการเจริญบนอาหารแข็ง พบว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกน้อยหน่าเครือที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่า MBC อยู่ในช่วง 25-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุด คือ *L. plantarum* และ *B. cereus* สารที่สกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลมีค่า MBC อยู่ในช่วง 25-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุด คือ *S. faecalis*, *L. plantarum*, *P. milabilis* และ *P. aeruginosa* ส่วนสารสกัดหยาบจากเปลือกที่สกัดด้วยน้ำมีค่า MBC อยู่ในช่วง 25 ถึงมากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุด คือ *S. faecalis*, *L. plantarum*, *B. cereus* และ *P. aeruginosa*

สารสกัดจากเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่า MBC อยู่ในช่วง 25-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุด คือ *B. cereus* สารที่สกัดด้วยเมทานอลมีค่า MBC อยู่ในช่วง 25 ถึงมากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุด คือ *S. faecalis*, *L. plantarum* และ *P. milabilis* ส่วนสารสกัดจากเปลือกที่สกัดด้วยน้ำมีค่า MBC อยู่ในช่วง 25-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุด คือ *B. cerus*

สารสกัดจาเมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่า MBC อยู่ในช่วง 25-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุดคือ *B. cereus* และ *Ps. aeruginosa* สารที่สกัดด้วยเมทานอลมีค่า MBC อยู่ในช่วง 25-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อที่มีความไวต่อสารสกัดมากที่สุดคือ B. cereus ส่วนสารสกัดหยาบจากเมล็ดน้อยหน่าเครือที่สกัดด้วยน้ำมีค่า MBC อยู่ในช่วง 25-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อที่มีความไวต่อสารสกัดมากที่สุดคือ B. *cereus*, *P. milabilis* และ *P. aeruginosa*

4.5 การทดลองที่ 5 วิธีการสกัดน้ำน้อยหน่าเครือสดพร้อมดื่ม

คัดเลือกน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลืองมาใช้ในการผลิตน้ำน้อยหน่าเครือ เนื่องจากผลใหญ่ มีปริมาณเนื้อ ส่วนสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดงมีผลขนาดเล็ก และมีปริมาณเนื้อน้อย

นำน้อยหน่าเครือที่คัดเลือกแล้วมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด จากนั้นใช้มีดที่สะอาดแยกส่วนของเนื้อน้อยหน่าเครือออกจากเปลือกและเมล็ด ชั่งน้ำหนักเนื้อที่ได้ นำเนื้อน้อยหน่าเครือที่ได้ใส่ในผ้าขาวบางที่สะอาด แล้วใช้มือคั้นเพื่อให้ได้น้ำน้อยหน่าเครือ นำน้ำคั้นปริมาตร 200 ml บรรจุขวดแก้วปลอดเชื้อขนาด 250 ml ปิดด้วยฝาเกลียว จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4, 15 และ 30 องศาเซลเซียส แล้วทำการวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS) ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (%TA) ปริมาณวิตามินซี (Vit C) และตรวจผลการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนยีสต์และราในชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60 และ 72 การตรวจจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยใช้เทคนิค pour plate บนอาหาร plate count agar (PCA) บ่มที่อุณหภูมิ 32.0 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และอาหาร rose bengal agar (RBA) สำหรับเชื้อยีสต์และรา บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน นับจำนวนเชื้อบนอาหาร

จากการวิเคราะห์คุณภาพน้ำน้อยหน่าเครือสดพร้อมดื่มหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 15 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำอยู่ระหว่างร้อยละ 6.23-7.33 °Brix ปริมาณกรดอยู่ระหว่าง 1.03-1.60% และมีปริมาณวิตามินซีอยู่ระหว่าง 3.44-15.80 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรตัวอย่าง

ผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และราเพิ่มขึ้นเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิสูงขึ้นและที่เวลานานขึ้น โดยมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 0-7.02 Log CFU/ml และมียีสต์และรา อยู่ในช่วง 0.52-8.59 CFU/ml โดยในชั่วโมงที่ 72 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และราสูงที่สุด

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจตำแหน่งของพื้นที่ ลักษณะการเจริญและชนิดของน้อยหน่าเครือ พบว่าพื้นที่ที่พบสายพันธุ์น้อยหน่าเครือผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว มีอยู่ 3 ที่ คือ 1) บ้านขุนลาว ต.เจดีย์ใหม่ อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย 2) ต.ป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่) บ้านป่าเหมี้ยง ต.แจ้ซ้อน อ.ปาน จ. ลำปาง ส่วนสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง จะพบที่ ต.ป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ ซึ่งทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่ามีการเจริญอยู่บนหุบเขาที่มีแหล่งน้ำไหลผ่าน ที่ระดับความสูง 1,000 เมตรขึ้น โดยช่วงเวลาการออกดอกของน้อยหน่าเครือทั้ง 2 สายพันธุ์ อยู่ในช่วงเดือนมีนาคม โดยผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว จะสามารถเก็บเกี่ยวผลได้ช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิกายน (ในจังหวัดเชียงราย) ส่วนพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดงจะสามารถเก็บเกี่ยวผลได้ในช่วงเดือนมกราคม (ในจังหวัดเชียงราย) แต่ถ้าพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดงออกทวายจะสามารถเก็บเกี่ยวผลได้ช่วงเดือนมีนาคม (ในจังหวัดเชียงใหม่) โดยมีน้ำหนักผลตั้งแต่ 0.28- 1.22 กก. ซึ่งจากการจำแนกตามลักษณะของผลมีความสอดคล้องกับรายงานของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชซึ่งแบ่งได้ตามลักษณะผลได้ 6 กลุ่มโดยสายพันธุ์น้อยหน่าเครือผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว จัดอยู่ในกลุ่มที่1และสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง จัดอยู่ในกลุ่มที่ 5 โดยสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดงมีการออกผลนอกฤดู ซึ่งควรมีการทำการศึกษาด้านการการขยายพันธุ์และการจำแนกพันธุ์โดยใช้เทคนิคด้านเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

การตรวจสอบองค์ประกอบทางกายภาพและทางเคมี

พบว่า ขนาดและน้ำหนักของผลน้อยหน่าเครือทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว มีความกว้าง 14.70 เซนติเมตร ยาว 12.50 เซนติเมตร และมีน้ำหนัก 1.22 กิโลกรัม ส่วนสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง มีความกว้าง 8.80 เซนติเมตร ยาว 9.70 เซนติเมตร และมีน้ำหนัก 0.28 กิโลกรัม

ลักษณะดอกและผลน้อยหน่าเครือ พบว่า ลักษณะดอกน้อยหน่าเครือของทั้ง 2 สายพันธุ์ มีเอกลักษณ์เฉพาะ คือ พันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว จะมีกลีบดอกส่วนนอกเป็นสีเขียว กลีบดอกส่วนในเป็นสีขาว ปลายกลีบดอกเป็นสีแดง ส่วนพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดงจะมีกลีบดอกด้านนอกเป็นสีแดงทั้งหมด ส่วนกลีบดอกด้านในส่วนบนมีสีแดง ส่วนกลีบดอกด้านล่างเป็นสีขาว โดยทั้ง 2 สายพันธุ์จะมีกลีบดอกทั้งหมดประมาณ 12 กลีบ ในส่วนของเกสรจะมีทั้งเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียในดอกเดียวกัน ซึ่งเกสรตัวเมียจะอยู่ส่วนปลายของดอก ลักษณะผลของน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสี

เหลือง ผลย่อยสีขาวและพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง โดยทั้ง 2 สายพันธุ์ มีลักษณะเปลือกหนาและมีแกนกลาง ในส่วนของสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว ผลดิบเปลือกด้านนอกจะมีสีเขียว เมื่อผลสุกเปลือกด้านนอกจะมีสีเหลืองอ่อน และเปลือกด้านในมีสีชมพู ลักษณะผลย่อยเนื้อในสีขาว เมล็ดมีลักษณะคล้ายรูปหัวใจสีน้ำตาลเข้ม ส่วนสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดง ผลย่อยสีแดง ผลดิบเปลือกด้านนอกจะมีสีเขียว เมื่อผลสุกเปลือกด้านนอกและด้านในจะมีสีแดง ลักษณะผลย่อยเนื้อในสีแดง เมล็ดมีลักษณะคล้ายรูปหัวใจสีน้ำตาลเข้ม

ลักษณะของสีเปลือก สีเนื้อ และความแน่นเนื้อของผลน้อยหน่าเครือ ผลของการเทียบสีของเปลือกและเนื้อของผลน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลือง ผลย่อยสีขาว โดยทำการวัด 3 บริเวณ คือ เปลือกนอก เปลือกใน และเนื้อ ในบริเวณเปลือกนอกวัดค่าการเทียบสีเฉลี่ยได้ ค่า a* เท่ากับ 15.9, ค่า b* เท่ากับ 26.2, ค่า L* เท่ากับ 34.3 และค่า H° เท่ากับ 60.8 ส่วนบริเวณเปลือกในวัดค่าการเทียบสีเฉลี่ยได้ ค่า a* เท่ากับ 20.2, ค่า b* เท่ากับ 24.4, ค่า L* เท่ากับ 40.4 และค่า H° เท่ากับ 48.1 และบริเวณเนื้อวัดค่าการเทียบสีเฉลี่ยได้ ค่า a* เท่ากับ 10.1, ค่า b* เท่ากับ 40.2, ค่า L* เท่ากับ 46.6 และค่า H° เท่ากับ 72.8

องค์ประกอบทางโภชนาการของเนื้อน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีเหลืองมีปริมาณความชื้น 93.80% คาร์โบไฮเดรต 4.18% ปริมาณโปรตีน 0.28% ปริมาณไขมัน 0.12% มีปริมาณเยื่อใย 0.80% และปริมาณเถ้าเท่ากับ 0.19% ส่วนเนื้อน้อยหน่าเครือสายพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดงมีปริมาณความชื้น 90.29% คาร์โบไฮเดรต 7.21% ปริมาณโปรตีน 0.54% ปริมาณไขมัน 0.14% มีปริมาณเยื่อใย 1.48% และปริมาณเถ้าเท่ากับ 0.34%

การศึกษาผลน้อยหน่าเครือด้วยตัวทำละลายเอทานอล เมทานอล และน้ำ เพื่อหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ DPPH, FRAP, ABTS และ ORAC พบว่ามีปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมดอยู่ในช่วงระหว่าง 150.71-178.51 µg GEA/ml โดยที่สารสกัดหยาบจากเนื้อน้อยหน่าเครือที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายมีปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมดสูงที่สุด ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ระหว่างร้อยละ 31.97-47.51 โดยที่สารสกัดหยาบจากเนื้อน้อยหน่าเครือที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 13.08-27.62 mg TEAC/g โดยที่สารสกัดหยาบจากเนื้อน้อยหน่าเครือที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ FRAP มากที่สุด ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค ABTS พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 2.54-4.36 mM TEAC/mg โดยที่สารสกัดหยาบจากเปลือกที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS มากที่สุด และมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ORAC ของเปลือก เนื้อ และเมล็ดเท่ากับ 3,816, 2,122 และ 7,169 µM TE/100 กรัม โดยที่สารสกัดจากเมล็ดน้อยหน่าเครือมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด สารสกัดหยาบจากน้ำมีแนวโน้มในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าเอทานอล และเมทานอล

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเนื้อ เปลือก และเมล็ดน้อยหน่าเครือพบว่าสารสกัดจากเนื้อ เปลือก และเมล็ดของน้อยหน่าเครือพันธุ์เปลือกสุกสีเหลือง ผลย่อยสีขาวมีความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ 8 ชนิด คือ *Bacillus cereus, Lactobacillus plantarum, Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus faecalis* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli , Pseudomonas aeruginosa , Proteus mirabilis* และ *Salmonella typhimurium* แต่สารสกัดจากเปลือกและเนื้อของน้อยหน่าเครือพันธุ์เปลือกสุกสีเหลือง ผลย่อยสีขาวที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ได้แก่ *Candida albicans* และ *Saccharomyces cerevisiae* และเชื้อรา *Aspergillus niger* แต่สารสกัดจากเปลือกน้อยหน่าเครือพันธุ์ผลสุกเปลือกสีแดงมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดจากส่วนอื่นๆ และสารสกัดที่ได้จากน้อยหน่าเครือทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ และเชื้อราทดสอบได้ มีรายงานการตรวจสอบ phenolic acid, flavonoids และ tannins (Heim et al., 2002, Sroka and Cisowki, 2003) ซึ่ง tannin มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *E. coli, Pseudomonas, S. aureus, Salmonella typhi, Streptococcus pyogenes, Proteus vulgaris, L. monocytogenes, E. sakasakii, Candida albicans* และ *Aspergillus niger* (Doss, Mubarack and Dhanabalan, 2009; Kim et al., 2010 and Suraya et al., 2011) ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ ยกเว้นสารสกัดจากผลน้อยหน่าเครือทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์และราได้ ส่วน phenolic compound ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้หลายชนิด (Sevil et al., 2010 and Antonio et al., 2003)

การวิเคราห์ผลของคุณภาพน้ำน้อยหน่าเครือสดพร้อมดื่มหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 15 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำอยู่ระหว่างร้อยละ 6.23-7.33 °Brix, ปริมาณกรดอยู่ระหว่าง 1.03-1.60%, ปริมาณวิตามินซีอยู่ระหว่าง 3.44-15.80 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรตัวอย่าง มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 0-7.02 Log CFU/ml และมียีสต์และรา อยู่ในช่วง 0.52-8.59 Log CFU/ml โดยในชั่วโมงที่ 24 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 36 และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 72 มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเกินมาตรฐานกำหนด คือ 1 × 104 CFU/ml หรือ 4 Log CFU/ml ส่วนยีสต์และรามีจำนวนเกินมาตรฐานกำหนดคือ 100 CFU/ml หรือ 2 Log CFU/ml ที่ชั่วโมงที่ 12 ทั้ง 3 อุณหภูมิทดสอบ

วิจารณ์ผลการทดลอง

เมื่อพิจารณาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดกับค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, FRAP, ABTS พบว่ามีความสอดคล้องกัน โดยสารสกัดหยาบที่มีปริมาณฟีนอลิกมาก จะมีแนวโน้มมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมาก จึงทำให้ในสารสกัดหยาบที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดตามไปด้วย ถ้าในตัวอย่างมีฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารนี้จะประกอบด้วย aromatic ring แทนที่ด้วย hydroxyl group ซึ่งส่วนมากเป็นสารที่มีขั้วละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วเช่นกัน กลไกการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารจำพวกฟีนอลจะเกิดเมื่อมีอนุมูลอิสระมาดึงอิเล็กตรอนไป แต่ในโครงสร้างมีอิเล็กตรอนหนาแน่นทำให้อนุมูลอิสระติดไปกับโครงสร้างอิเล็กตรอนและเกิดการเคลื่อนย้ายไปทั่วโครงสร้าง ทำให้โครงสร้างเสถียรไม่เกิดเป็นอนุมูลอิสระอีกต่อไป (Pietta, 2000) ปัจจุบันพบว่าสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกเป็นสารที่ลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และมีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระในระบบร่างกายผู้บริโภค จากการศึกษาด้านระบาดวิทยาพบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนี้ช่วยลดอัตราการเกิดโรคหัวใจ โรคมะเร็ง โรคเกี่ยวกับหลอดเลือด รวมทั้งโรคอื่นๆ (โอภา, 2549) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของผลไม้จะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของผลไม้

ในการทดสอบด้วยเทคนิค paper disc diffusion พบว่าสารสกัดจากผลน้อยหน่าเครือทั้ง 3 ส่วน คือ เปลือก เนื้อ และเมล็ด สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ แต่ในงานวิจัยของ สุคนธ์ ตันติไพบูรณ์วุฒิ และคณะ (2012) ที่พบว่าเปลือกของส้มเขียวหวานที่สกัดด้วยน้ำร้อนและเอทานอล95% ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. typhimurium* ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบจากเปลือกน้อยหน่าเครือแล้ว สารสกัดหยาบจากเปลือกน้อยหน่าเครือมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ รวมถึงเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เป็นเชื้อที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ดื้อยาและเป็นเชื้อก่อโรคในโรงพยาบาลอีกด้วย โดยความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของผลไม้ ส่วนต่างๆ ของผลไม้ และตัวทำละลายที่นำมาสกัด รวมไปถึงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบด้วย

จากการทดลองค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์จะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบจากเปลือก เนื้อ และเมล็ดของน้อยหน่าเครือในทุกๆ ตัวทำละลายมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้คือ เชื้อ *B. cereus* และ *S. typhimurium* โดยให้ค่า MIC เท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อพิจารณาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ พบว่าค่า MBC เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อที่ไวต่อสารสกัดมากที่สุดคือ *B. cereus* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อที่มี

ความไวต่อสารสกัดน้อยที่สุดคือ *S. typhimurium* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากในแบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ที่ซับซ้อนกว่าแบคทีเรียแกรมบวก และมีลิโพพอลิแซกคาไรด์ (lipopolysaccharide) ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ชั้นนอกสุด (outer membrane) ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันสารที่เป็นพิษเข้าสู่ภายในเซลล์ การซึมผ่านของสารสกัดจึงลดลง ทำให้แบคทีเรียแกรมลบถูกยับยั้งได้น้อยกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shan และคณะ (2007) ที่ได้ทำวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเครื่องเทศและสมุนไพรทั้งหมด 46 ตัวอย่าง ทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรคจากการกินอาหาร 5 ชนิด คือ *B. cereus, L. monocytogenes, S. aureus, E. coli* และ *S. anatum* โดยใช้เทคนิค agar-well diffusion พบว่าสารสกัดที่ได้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ โดยเชื้อ *S. aureus* มีความไวต่อสารสกัดได้ดีที่สุด ส่วนเชื้อ *E. coli* ถูกยับยั้งได้น้อยที่สุดจากการวิเคราะห์น้ำน้อยหน่าเครือในแต่ละชั่วโมงทดสอบพบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำลดลง และปริมาณกรดเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลานานขึ้น อาจเป็นผลมาจากการที่จุลินทรีย์เปลี่ยนน้ำตาลในน้ำน้อยหน่าเครือเปลี่ยนเป็นกรดทำให้ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำลดลงและปริมาณกรดเพิ่มขึ้นตามไปด้วย โดยในชั่วโมงที่ 72 ของทั้ง 3 อุณหภูมิทดสอบมีปริมาณกรดมากที่สุด ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในน้ำน้อยหน่าเครือพบว่าปริมาณวิตามินซีมีแนวโน้มลดลงไปตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นด้วย อาจเนื่องมาจากแสงสว่าง และอุณหภูมิในเก็บรักษาน้ำน้อยหน่าเครือ จากผลการทดลองจะเห็นว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีปริมาณวิตามินซีลดลงจาก 15.02 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรตัวอย่าง เหลือเพียง 3.44 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 100 ตัวอย่าง

เมื่อพิจารณาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์และรา ตามมาตรฐาน มผช.1307/2557 ที่กำหนดว่าต้องพบจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน 1 × 104 CFU/ml หรือ 4 Log CFU/ml และยีสต์และราต้องไม่เกิน 100 CFU/ml หรือ 2 Log CFU/ml จากการทดลองจะเห็นได้ว่ามีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำน้อยหน่าเครือเกินมาตรฐานที่กำหนดในชั่วโมงที่ 24 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 36 และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 72 ส่วนการตรวจหาปริมาณยีสต์และราในน้ำน้อยหน่าเครือหลังจากเก็บรักษาพบว่า ในชั่วโมงที่ 12 มีปริมาณยีสต์และราเกินมาตรฐานกำหนด โดยการเก็บรักษาน้ำน้อยหน่าเครือไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้นานยิ่งขึ้น ดังนั้นควรมีการเก็บรักษาน้ำผลไม้ไว้ในที่อุณหภูมิเย็นมากกว่าการเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง

ข้อเสนอแนะ

1. ควรสำรวจพื้นที่และการเก็บตัวอย่างน้อยหน่าเครือสายพันธุ์อื่น ๆ มาทำการวิจัยเพิ่มเติม
2. ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระควรมีการใช้ตัวทำละลายชนิดอื่นเพิ่มเติมด้วย และควรมีการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในการสกัดสารของแต่ละตัวทำละลายด้วย
3. จากผลการศึกษามีความเป็นไปได้ที่จะสามารถนำสารสกัดจากผลน้อยหน่าเครือมาใช้ไปใช้ในด้านต่างๆ เช่น ด้านอุตสาหกรรมอาหาร ด้านอุตสาหกรรมเกษตร ด้านเภสัชกรรม และด้านอื่นๆ
4. ควรวิเคราะห์ชนิด และปริมาณของสารกลุ่ม phenolic compound โดยละเอียดเพิ่มเติม
5. ควรวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการอื่นๆ เช่น ชนิดและปริมาณ anthocyanin เนื่องจาก พบน้อยหน่าเครือสายพันธุ์เปลือกสีแดงซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้
6. ควรนำสารสกัดหยาบไปทดสอบ anti-cancer, anti-tumor และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์
7. ควรศึกษาการถนอมน้ำน้อยหน่าเครือด้วยวิธีการอื่นๆ เช่น การใช้ความร้อน การแช่เยือกแข็ง เป็นต้น

มหาวิทยาลัยนเรศวร

บรรณานุกรม

ชลนิชา ทองขลิบ. (2548). การคัดเลือกเชื้อรา Aspergillus ที่ผลิตเอนไซม์อาหารสัตว์และปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบ solid state ที่ใช้ฟางข้าว. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นเรศ วโรภาสตระกูล. (ไม่ระบุวันเดือนปีที่ตีพิมพ์). Candidiasis. จาก https://www.google.co.th/CandidiasisThai.pdf

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, พิทัย กาญบุตร และสาธร พรตระกูลพิพัฒน์. (2551). การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ. ประชุมวิชาการสัตวแพทย์ มข.ครั้งที่ 9 "สัตวแพทย์ทางเลือกวันนี้".คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, หน้า 96-98.

เพชรรุ่ง เทพทอง, จิตพิสุทธิ์ จันทร์ทองอ่อน, อรมณี ประจวบจินดา, ศรีโสภา เรืองหนู และอรุณพร อิฐรัตน์. (2555). การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดชั้นเอทานอลของขิง พริกไทยดำ และดีปลี. การประชุมเครือข่ายวิชาการบัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 1 วันที่ 18 ธันวาคม 2555 มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

ภัทรชัย กีรติสิน. (2551). ตำราแบคทีเรียทางการแพทย์. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิยาลัยมหิดล.

เยาวพา สุวัตถิ. (2557). การบรรจุอาหารแบบต่อต้านจุลินทรีย์. วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม ปีที่21 ฉบับที่ 2.

วรยุทธ ยอดบุญ, ประเวทย์ ตุ้ยเต็มวงศ์ และ ฆรณี ตุ้ยเต็มวงศ์. (ไม่ระบุวันเดือนปีที่ตีพิมพ์). ผลของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900.

วันทนา(ไม่ระบุนามสกุล). (2538). ความเกี่ยวข้องระหว่าง *Staphylococcus aureus* กับคน. (สืบค้นวันที่ 12 พฤศจิกายน 2557)

วันเพ็ญ เพ็ชรจันทร์ และธีรพร กงบังเกิด. (2551). การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารและการประยุกต์ใช้. วารสารวิทยาศาสตร์.9(1), 26-36.

วินัย ปิติยนต์. (2008). ผลไม้วิเศษ (superfruit). วารสาร Quality for food Vol.14 No.124, 101-104

ศิริพร วงศ์ดินดำ. (ไม่ระบุวันเดือนปีที่ตีพิมพ์). การเปรียบเทียบวิธีตรวจหา ESBLs และ AmpC และอุบัติการณ์ของ CTX-M gene ในเชื้อ Enterobacteriaceae ที่แยกได้จากโรงพยาบาลรามาธิบดี. ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ศิริวรรณ วิชัย. (2557). วิธีทดสอบ Microbial assay. คู่มือปฏิบัติการ การประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการทดสอบจุลชีววิทยา เล่ม 2. (หน้า 61-66). ภาควิชา จุลชีววิทยาและปริสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ. (2549). ความปลอดภัยของอาหาร Food Safty. กรุงเทพมหานคร : Sister Print & Medis Group, 122-146.

สุภลัคน์ พานโชติ, ภานุพงศ์ ใจวุฒิ และ ปัญญวัฒน์ ปินตาทอง. (2554). การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากผลหมาก. สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. (2549). ตำราจุลชีววิทยาทางอาหาร Food microbiology. กรุงเทพมหานคร, โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, 150-157.

Alexandra H. Smith and Roderick I. Mackie. 2004. Effect of Condensed Tannins on Bacterial Diversity and Metabolic Activity in the Rat Gastrointestinal Tract. APPL ENVIRON MICROB. 70(2): 1101-1115.

Almeida, M.M.B., de Sousa, P.H.M., Arriaga, A.M.C., do Prado, G.M., Magallhaes, C.E.C., Maia, G.A., de Lemos, T.L.G.. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. Food Res. Int, 44, 2155-2159

Antonio Carraturo, Katia Raieta, Idolo Tedesco, Jinwoong Kim, and Gian Luigi Russo. 2014. Antibacterial Activity of Phenolic Compounds Derived from *Ginkgo biloba* Sarcotestas against Food-Borne Pathogens. British Microbiology Research Journal. 4(1): 18-27.

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

Chun-Lin Ye, De-Hui Dai and Wei-Lian Hu. (2013). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion(Allium cepa L.). School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, PR China, 48-53.

Doss A., H. Mohammed Mubarack and R. Dhanabalan. 2009. Antibacterial activity of tannins from the leaves of *Solanum trilobatum* Linn. Indian J Sci Technol. 2(2): 41-43.

Gao, X. -M., Pu, J. -X., Xiao, W. -L., Huang, S. -X., Lou, L. -G. and Sun, H. D. (2008).

Kadcoccilactones K–R, triterpenoids from *Kadsura coccinea*. Tetrahedron, 64, 11673–11679.

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D. J. 2002. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-activity Relationships. The Journal of Nutritional Biochemistry 13: 572–584.

Hisanori Akiyama, Kazuyasu Fujii, Osamu Yamasaki, Takashi Oono, and Keiji Iwatsuki. 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. J ANTIMICROB CHEMOTH. 48: 487-491.

Jantan, L., and Z.M. Zaki. (1998). Development of environment-friendly insect repellents from the leaf oils of selected Malaysian plants. J. Nature Biotechnology, 23, 432-433.

Jian Sun, Jinyan Yao, Shaoxi Huang, Xing Long, Jubing Wang and Elena García-García. (2009). Antioxidant activity of polyphenol and anthocyanin extracts from fruits of *Kadsura coccinea* (Lem.) A.C. Smith. Food Chemistry, 117, 276–281.

Jussieu, Ann. Mus. Natl. Hist. Nat.(2008).*Kadsura* . Flora of China, 7, 39–41.

KEW Royal Botanical Gardens. 2557. Herbarium Catalogue. Retrieved on 20th April 2014. From http://apps.kew.org/herbcat/getHome PageResults.do?homePageSearchText=Kadsura + verrucosa

Kim T.J., Silva J.L., Kim M.K., Jung Y.S.. 2010. Enhanced antioxidant capacity and antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing. FOOD CHEM. 118: 740-746.

Lecto, K. and Saunders, R.M.K. 1935. *Kadsura ananosma* Kerr, *Kew Bull.* 1936: 34 (1936). T: Siam [Thailand]: Thanon Thong Chai Range, west-southwest of Chiang Mai, Mê Ka Pak drainage, Doi Ang Ka (Doi Inthanon), 10 Apr. 1935, *H.B.G.Garrett 940*; *Syst. Bot. Monogr.* 54: 41 (1998); isolecto: A, E, K, L.

Leon W. Nitiema, Aly Savadogo, Jacques Simpore, Dayeri Dianou and Alfred S. Traore. (2012). In vitro Antimicrobial Activity of Some Phenolic Compounds (Coumarin and Quercetin) Against Gastroenteritis Bacterial Strains. International Journal of Microbiological Research, 3(3), 183-187.

Li, W. J., Nie, S. P., Liu, X. Z., Zhang, H., Yang, Y., Yu, Q., et al. (2012). Antimicrobial properties, antioxidant activity and cytotoxicity of ethanol-soluble acidic

components from Ganoderma atrum. Food and Chemical Toxicology, 50, 689-694.

Lin S. H., Darah I., and Jain K. 2006. Antimicrobial activities of Tannins Extracted from Rhizophora apiculata Barks. J TROP FOR SCI. 18(1): 59-65.

Liu, J. -S. and Li, L. 1995a. Schisantherins P and Q, Two Lignans from *Kadsura coccinea*. Phytochemistry 38:1009–1011.

Liu, J. -S. and Li, L. 1995b. Kadsulignans L–N, three dibenzocyclooctadiene lignans from *Kadsura coccinea*. Phytochemistry 38: 241–245.

Meigy Nelce Mailoa, Meta Mahendradatta, Amran Laga, and Natsri Djide. 2014. Antimicrobial Activities Of Tannins Extract From Guava Leaves (Psidium Guajava L) On Pathogens Microbial. IJSTR. 3(1): 236-241

Min, B. R., Pinchak, W. E.*, Merkel, R., Walker, S., Tomita, G. and Anderson, R. C. 2008. Comparative antimicrobial activity of tannin extracts from perennial plants on mastitis pathogens. SCI RES ESSAYS. 3(2): 66-73.

Muntha K. Reddy, Sashi K. Gupta, Melissa R. Jacob, Shabana I. Khan, and Daneel Ferreira. 2007. Antioxidant, Antimalarial and Antimicrobial Activities of Tannin-Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from *Punica granatum* L. Planta Med. 73: 461-467.

Nancy E. Hernandez, M.L. Tereschuk, L.R. Abdala. 2000. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi´ del Valle (Tucuma´n, Argentina). J ETHNOPHARMACOL. 73: 317-322.

Ozçelik B., D. Deliorman Orhan, S. Ozgen, F. Ergun. 2008. Antimicrobial Activity of Flavonoids against Extended-Spectrum β-Lactamase (ESβL)-Producing *Klebsiella pneumonia*. TROP J PHARM RES., 7(4): 1151-1157.

Prior, R. L., H. Hoang, L. Gu, X. Wu, M. Bacchiocca, L. Howard, M. Hampsch-Woodill,D. Huang, B. Ou and R. Jacob. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. J. Agric. Food Chem, 51, 3273-3279.

Prior, R. L., X. Wu and K. Schaich. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplement. J. Agric. Food Chem, 53, 4290-4302.

Saunders R.M.K. 2001. Species Plantarum Flora of the World. Part 4 Schisandraceae. Australian Biological Resources Study, Canberra. Australia. Retrieve on 20th April 2014. From http://specie splantarum.net/sites/default/files/floras/s/schisandraceae.pdf

Sevil ALBAYRAK, Ahmet AKSOY, Osman SAGDIC, Umit BUDAK. 2010. Phenolic compounds and antioxidant and antimicrobial properties of *Helichrysum* species collected from eastern Anatolia, Turkey. Turk J Biol. 34: 463-473.

Silvia Helena Taleb-Contini, Marcos Jose Salvador, Evandro Watanabe, Izabel Yoko Ito, and Dioneia Camilo Rodrigues de Oliveira. 2003. Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two *Chromolaena* species. BRAZ. J PHARM SCI. 39(4): 403-408.

Sroka, Z. and Cisowski, W. 2003. Hydrogen Peroxide Scavenging, Antioxidant and Anti-radical Activity of Some Phenolic Acids. Food and Chemical Toxicology 41: 753–758. Sun, J., Shi J., Jiang, Y.,

Suraya Sulaiman, Darah Ibrahim, Jain Kassim, and Lim Sheh-Hong. 2011. Antimicrobial and antioxidant activities of condensed tannin from *Rhizophora apiculata* barks. J. Chem. Pharm. Res. 3(4): 436-444.

Tawatsin, A., Wratten, S.D., Scott, R., Thavara, V. and Techaamrongsin, Y. (2001). Repellency of volatile oils from plant against three mosquito vectors. J. of Vector Ecology, 26(1), 76-82.