รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความปลอดภัยและประโยชน์ต่อสุขภาพของน้ำลูกยอ

Safety and health benefit of noni juice

โดย

ดร. ณัฏยา คนซื่อ
ดร. สุภาภรณ์ ยิ้มเที่ยง
ดร. วิยดา กวานเหียน

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความปลอดภัยและประโยชน์ต่อสุขภาพของน้ำลูกยอ

Safety and health benefit of noni juice

โดย

ดร. ณัฏยา คนซื่อ
ดร. สุภาภรณ์ ยิ้มเที่ยง
ดร. วิยดา กวานเหียน

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยในหัวข้อความปลอดภัยและประโยชน์ต่อสุขภาพของน้ำลูกยอสำเร็จรูปล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์ของบริษัทเชียงรายโนนิ ที่ได้ให้คำแนะนำวิธีการแปรรูปน้ำลูกยอแบบดั้งเดิมและจัดหาวัตถุดิบและอุปกรณ์สำหรับการแปรรูปน้ำลูกยอหมัก นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงที่สนับสนุนงบประมาณในการดำเนินการวิจัย และสนับสนุนเครื่องมือในการทำการวิจัยในครั้งนี้

คณะผู้วิจัย

บทสรุปผู้บริหาร

น้ำลูกยอที่มีจำหน่ายในท้องตลาดมี 3 ประเภท ได้แก่ น้ำลูกยอสด น้ำลูกยอสดผสมน้ำผลไม้ และน้ำลูกยอหมัก โดยความนิยมจะแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ สำหรับประเทศไทยนั้นนิยมบริโภคน้ำลูกยอหมัก ซึ่งการหมักยอมีวัตถุประสงค์เพื่อให้กลิ่นฉุนของผลยอลดลงและเชื่อว่าทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพสูงกว่าน้ำลูกยอสด แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการหมักนี้อาจนำไปสู่ความเป็นพิษของน้ำลูกยออันเนื่องมาจากหลายสาเหตุ เช่น สารเมทานอลที่อาจถูกสร้างขึ้นระหว่างการหมักหรือมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เป็นสาเหตุให้การผลิตน้ำลูกยอหมักในประเทศไทยที่ผลิตด้วยวิธีการดั้งเดิมไม่ได้รับการจดทะเบียนอาหารกับกระทรวงสาธารณสุข และเป็นอุปสรรคต่อการเพิ่มศักยภาพของผู้ประกอบการในการจำหน่ายทั้งในและต่างประเทศ นอกจากนี้ยังไม่มีการทดลองเพื่อเปรียบเทียบคุณประโยชน์ต่อสุขภาพของน้ำหมักเหล่านี้กับน้ำลูกยอสดว่าแตกต่างกันหรือไม่ ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงต้องการเปรียบเทียบความปลอดภัยและสมบัติทางเคมีและจุลินทรีย์ รวมทั้งความสามารถในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ Huh-7 ของน้ำลูกยอสดและน้ำลูกยอหมักชนิดต่างๆ

ในขั้นแรก ได้ทำการเตรียมน้ำลูกยอหมักด้วยกระบวนการแตกต่างกัน ได้แก่ การหมักแบบที่มีการใช้เชื้อบริสุทธิ์และการหมักแบบเชื้อธรรมชาติ (วิธีดั้งเดิม) โดยการหมักทั้งสองแบบสามารถแบ่งได้เป็นชนิดที่มีและไม่มีการใช้น้ำตาล ระยะเวลาในการหมัก 6 เดือน และมีตัวอย่างควบคุมที่หมักนาน 12 เดือน จากนั้นทำการเปรียบเทียบองค์ประกอบและคุณภาพของน้ำลูกยอหมักชนิดต่างๆ กับน้ำลูกยอสด ผลการทดลองพบว่า ภายหลังการหมักน้ำลูกยอมีปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ปริมาณน้ำตาลในน้ำลูกยอหมักแบบใช้น้ำตาลมีค่าสูงกว่าน้ำลูกยอสด และชนิดของน้ำตาลที่พบ ได้แก่ น้ำตาลฟรุกโตสและซูโครส ปริมาณโซเดียมสูงขึ้นเล็กน้อย ส่วนโพแทสเซียมมีปริมาณลดลง เมื่อวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่าง พบว่า ไม่มีเชื้อก่อโรคปนเปื้อน แต่ในตัวอย่างที่ผ่านการหมักมีการปนเปื้อนของยีสต์และรา และแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกเล็กน้อย จึงอาจกล่าวได้ว่าน้ำลูกยอหมักทั้งชนิดที่ใช้เชื้อธรรมชาติและเชื้อบริสุทธิ์มีความปลอดภัยเท่าเทียมกัน สำหรับคุณภาพทางด้านเคมี พบว่าปริมาณกรดสูงขึ้นภายหลังการหมัก โดยไม่มีความแตกต่างกันมากนักระหว่างการใช้เชื้อบริสุทธิ์และเชื้อธรรมชาติ ซึ่งหมายความว่ากระบวนการหมักกรดแลคติกไม่แตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมด พบว่า น้ำลูกยอหมักมีค่าเพิ่มขึ้นเกือบสองเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำลูกยอสด และมีผลทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อแสดงด้วยค่า FRAP เพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณวิตามินซีมีค่าลดลง นอกจากนี้ผลการทดลอง

ยังแสดงให้เห็นว่าน้ำลูกยอหมักมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิด ซึ่งตัวอย่างน้ำลูกยอเกือบทุกชนิดมีฤทธิ์เป็น bacteriocidal ยกเว้นน้ำลูกยอสด โดยมีผลในการยับยั้งและทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาปริมาณสารสำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ damnacanthal และ scopoletin ในน้ำลูกยอสดและน้ำลูกยอหมักพบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก โดยน้ำลูกยอที่หมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์เป็นเวลานาน 12 เดือนมีค่าสูงที่สุด ซึ่งมีรายงานว่าสารทั้งสองชนิดนี้มีคุณสมบัติในการต่อต้านมะเร็งได้ ดังนั้นเมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ พบว่าค่า IC50 หรือความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 มีค่าใกล้เคียงกันทุกตัวอย่าง (57.14-62.09 μL/mL) ยกเว้นน้ำลูกยอที่หมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์เป็นเวลานาน 12 เดือน พบว่ามีค่า IC50 ต่ำที่สุด หรือหมายความว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงที่สุด และในตัวอย่างที่หมักโดยไม่มีน้ำตาลไม่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้เลย (ไม่มีการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในตัวอย่างเหล่านี้)

จากผลการวิจัยที่ได้พบว่า น้ำลูกยอที่หมักโดยการใช้เชื้อบริสุทธิ์และไม่ใช้เชื้อบริสุทธิ์นั้นมีความปลอดภัยใกล้เคียงกัน กล่าวคือ ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรค และมีปริมาณเมทานอลต่ำกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนด ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่าการผลิตน้ำลูกยอด้วยวิธีดั้งเดิมไม่ทำให้ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคแต่อย่างใด นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงประโยชน์ต่อสุขภาพของน้ำลูกยอชนิดต่างๆ พบว่าการหมักจะทำให้ได้น้ำลูกยอที่มีสมบัติดีกว่าน้ำลูกยอสด เช่น ปริมาณสารโพลีฟีนอล ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ สำหรับประโยชน์ในด้านการยับยั้งมะเร็งพบว่าทั้งน้ำลูกยอสดและน้ำลูกยอหมักมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน ซึ่งการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่มีการเปรียบเทียบสมบัติและประโยชน์ของน้ำลูกยอสดและน้ำลูกยอหมัก แต่อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาในสัตว์ทดลองเพื่อยืนยันผลต่อไป

บทคัดย่อ

เพื่อศึกษาความปลอดภัยของน้ำลูกยอสดที่ผ่านกระบวนการพาสเจอไรซ์และน้ำลูกยอหมักแบบต่างๆ ได้ทำการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ของน้ำลูกยอ ผลการทดลองพบว่าองค์ประกอบทางเคมีมีค่าแตกต่างกัน กล่าวคือ ภายหลังการหมักมีปริมาณแอลกอฮอล์ (เอทานอลและเมทานอล) เพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่ยังต่ำกว่าค่ามาตรฐานอยู่มาก ปริมาณน้ำตาลมีค่าสูงกว่าเนื่องจากมีการเติมน้ำตาลในกระบวนการหมัก และประกอบด้วยน้ำตาลสองชนิด ได้แก่ น้ำตาลฟรุกโตสและซูโครส ซึ่งก็คือน้ำตาลที่พบในผลไม้และน้ำตาลทรายตามลำดับ ปริมาณโซเดียมสูงขึ้น ส่วนโพแทสเซียมมีปริมาณลดลงเล็กน้อย

เมื่อเปรียบเทียบคุณภาพทางด้านเชื้อจุลินทรีย์ของตัวอย่างน้ำลูกยอ โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ 6 ชนิด ตามกำหนดของมาตรฐานผลิตภัณฑ์พืชหมัก (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม) ได้แก่ *Salmonella* sp. *Escherichia coli* *Clostridium perfringens* ยีสต์และรา และแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก พบว่าในตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์และเชื้อธรรมชาติไม่มีเชื้อก่อโรคปนเปื้อน แต่พบยีสต์และรา และแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกเล็กน้อย สำหรับคุณภาพทางด้านเคมี พบว่าปริมาณกรดสูงขึ้นภายหลังการหมัก โดยไม่มีความแตกต่างกันมากนักระหว่างการใช้เชื้อบริสุทธิ์และเชื้อธรรมชาติ ส่วนปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมด พบว่า น้ำลูกยอหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์และเชื้อธรรมชาติมีค่าใกล้เคียงกัน โดยเพิ่มขึ้นเกือบสองเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำลูกยอสด ส่งผลให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อแสดงด้วยค่า FRAP มีค่าสูงขึ้นเช่นกัน ส่วนปริมาณวิตามินซีมีค่าลดลงหลังการหมักตามความคาดหมาย

เมื่อศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ (ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) และความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ (MBC)) 5 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* *Bacillus subtilis* *Enterococcus feacalis* *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumonia* พบว่าน้ำลูกยอทั้งชนิดสดและหมัก (ด้วยเชื้อบริสุทธิ์และเชื้อธรรมชาติ) มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิด แต่ *E. coli* และ *K. pneumonia* สามารถต้านทานน้ำลูกยอได้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการหมักแบบมีน้ำตาลและไม่มีน้ำตาล พบว่า น้ำลูกยอหมักแบบมีการใช้น้ำตาลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายเชื้อจุลินทรีย์สูงกว่าแบบไม่ใช้น้ำตาล โดยค่า MIC มีค่าเท่ากับ 31.25 μL/mL ยกเว้นในน้ำลูกยอสดที่มีค่าสูงกว่า 2 เท่า คือ 62.50 μL/mL และในตัวอย่างหมักที่ไม่มีการเติมน้ำตาลต้องการความเข้มข้นสูงถึง 250 μL/mL ส่วนระยะเวลาในการหมัก 6 เดือน และ 12 เดือน มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย โดยการหมัก 12

เดือนมีประสิทธิภาพสูงกว่าในการทำลายเชื้อ *E. coli* เท่านั้น ขณะที่ค่า MBC มีค่าใกล้เคียงกับ MIC ยกเว้นน้ำลูกยอสดที่ต้องการความเข้มข้นสูงถึง 250 μL/mL จึงจะสามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้

ผลการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค Ames test ในเชื้อจุลินทรีย์ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 พบว่า น้ำลูกยอทุกชนิดไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตาม เพื่อยืนยันความปลอดภัยควรมีการทดสอบในสัตว์ทดลองต่อไป ส่วนความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ พบว่าน้ำลูกยอสดและน้ำลูกยอหมักชนิดที่มีการเติมน้ำตาลสามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ใกล้เคียงกัน แต่ในตัวอย่างน้ำหมักที่ไม่มีการเติมน้ำตาลไม่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้

ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าน้ำลูกยอสดที่ผ่านกระบวนการพาสเจอไรซ์และน้ำลูกยอที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์และเชื้อจากธรรมชาติมีความปลอดภัยทุกชนิด ส่วนคุณสมบัติที่สำคัญต่อสุขภาพ พบว่าน้ำลูกยอที่ผ่านการหมักแบบใช้น้ำตาลมีประสิทธิภาพสูงกว่ายอสดในทุกๆ ด้าน ยกเว้นความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่พบความแตกต่าง ซึ่งยังคงต้องมีการทำการทดลองต่อไปเพื่อให้ทราบสาเหตุที่แน่ชัดและเพื่อยืนยันผลการทดลองดังกล่าว

Abstract

This study was aimed to investigate the safety as well as health benefits of fresh and different type of fermented noni juices. Physical, chemical and microbiological properties were analyzed. The results showed that alcohol content (ethanol and methanol) increased after fermentation compared to fresh juice. However, the level was acceptable, lower than standard. Since sugar was added during fermentation, sugar content in fermented juice also higher in the fermented products with fructose and sucrose being perdominant. Surprisingly, sodium content was higher whereas potassium content was lower than that of fresh juice. It is important to emphasize that potassium content in fresh noni has shown adverse effect to human health.

Five indicator microorganisms according to The community standard (issued by Thai Industrial Standards Institute) were determined namely *Salmonella* sp., *Escherichia coli, Clostridium perfringens,* yeast and mold as well as lactic acid bacteria. The results showed that there were no contaminations of pathogenic bacteria in all fermented noni juices obtaining from both pure and natural culture fermentation. However, small number of spoilage microorganisms i.e. yeast and mold and lactic acid bacteria were noted in some fermented samples. Chemical property determination indicated that lactic acid content increased after fermentation and there was no significant difference between pure and natural culture. Similar effect was also shown when total polyphenol content was evaluated where the amount was double of that found in fresh juice. This was in agreement with the higher antioxidant capacity expressed as FRAP value. However, vitamin C content declined after fermentation as expected.

Antimicrobial ability of noni samples was assessed employing five important bacterial namely *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Enterococcus feacalis, Escherichia coli and Klebsiella pneumonia*. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined. The results illustrated that fresh and fermented (pure and natural culture) noni juices inhibited all type of microorganisms studied where *E. coli* and *K. pneumonia* were more resistant to noni juices. It is surprising that fermented noni obtaining from sugar added recipe had a stronger effect compared to non-sugar fermentation. MIC value at 31.25 μL/mL was observed in all samples except fresh and non-sugar fermented products where the MIC values were 62.50 and 250 μL/mL respectively. It is important to note that the effect of

fermentation time (6 and 12 months) was spared. MBC and MIC values were comparable except for fresh noni juice that showed no bactericidal effect at MBC concentration of 250 μL/mL.

Ames test, employing *Salmonella typhimurium* TA98 as a test bacteria, revealed that all type of noni juices had no mutagenicity effects, however, an *in vivo* study should be conducted to confirm the *in vitro* results. The effects of noni juices on Huh-7 cell cytotoxicity were also investigated. Noni juices, both fresh and sugar added-fermented products, inhibited proliferation of Huh-7 cell lines whereas non-sugar fermentation showed no positive effect.

In conclusion, fermented and pasteurized fresh noni juice were safe for consumption in terms of chemical and microbiological properties. When the health benefit was considered, superior quality was noted in sugar added-fermented noni juice samples. However, cytotoxicity effects of fresh and fermented noni juice was not different. Further studies are carried out to ratify the preliminary results.

สารบัญ

สารบัญตาราง

หน้า

สารบัญภาพ

บทที่ 1 บทนำ

เป็นที่ทราบกันดีว่ายอเป็นพืชพื้นบ้านของไทย มีการใช้ใบและผลยอเพื่อป้องกันและรักษาโรคต่างๆมาแต่อดีต มีรายงานว่าสมบัติทางยาเหล่านี้เป็นผลมาจากสารเคมีที่พบในผลยอสด เช่น สารโปรซีโรนีน สารแอนทราควิโนน และสารสโคโปเลติน (Akihisa, 2007; Wang et al., 2002a) การรับประทานผลยอทำได้ในรูปของการดื่มน้ำยอสด ซึ่งอาจมีการผสมน้ำผลไม้ชนิดอื่น เช่น น้ำสับปะรดหรือน้ำแอปเปิ้ล หรืออาจมีการผสมน้ำผึ้ง เพื่อลดกลิ่นฉุนของลูกยอและเพิ่มรสชาติให้ดื่มได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังมีชนิดที่มีการใช้ภูมิปัญญาท้องถิ่นร่วมด้วย ได้แก่ การหมักผลยอเพื่อให้กลิ่นฉุนของผลยอลดลง ซึ่งกระบวนการหมักนี้อาจนำไปสู่ความเป็นพิษของน้ำลูกยออันเนื่องมาจากหลายสาเหตุ เช่น สารเมทานอลที่สร้างขึ้นระหว่างการหมักหรือสารพิษต่างๆ ที่อาจสร้างโดยเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่พึงประสงค์ ซึ่งเป็นสาเหตุให้การผลิตน้ำลูกยอหมักในประเทศไทยไม่ได้รับการจดทะเบียนอาหารกับกระทรวงสาธารณสุข และเป็นอุปสรรคต่อการเพิ่มศักยภาพของผู้ประกอบการในการจำหน่ายทั้งในและต่างประเทศ และนอกจากนี้ยังไม่มีการทดลองเพื่อเปรียบเทียบประโยชน์ของน้ำหมักเหล่านี้กับน้ำลูกยอสดว่าแตกต่างกันหรือไม่ อย่างไร

กระบวนการหมักยอโดยทั่วไปเป็นกระบวนการหมักเพื่อสร้างกรดแลคติก ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีความเป็นกรดสูง โดยหากการหมักเกิดขึ้นโดยสมบูรณ์ ผลิตภัณฑ์ยอหมักจะมีค่าความเป็นกรด-ด่าง หรือ พีเอช ต่ำกว่า 3.5 ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคไม่สามารถเจริญเติบโตได้ อย่างไรก็ตามเพื่อให้เกิดการหมักที่สมบูรณ์โดยให้มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เท่านั้น สามารถควบคุมได้หลากหลายวิธี อาทิ การควบคุมปริมาณอากาศและการใช้เชื้อบริสุทธิ์ สำหรับภูมิปัญญาชาวบ้านที่มีมาแต่ดั้งเดิมมักควบคุมโดยการกำจัดอากาศออกจากถังหมัก ซึ่งไม่สามารถมั่นใจได้ว่าการเจริญของเชื้ออื่นๆจะถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ ดังนั้นการใช้เชื้อบริสุทธิ์จึงเป็นทางเลือกที่ปลอดภัยกว่า แต่อาจมีความยุ่งยากเชิงกระบวนการแก่ผู้ประกอบการรายย่อยที่ผลิตน้ำลูกยอหมักในระดับครัวเรือน

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการเปรียบเทียบความเป็นพิษและประโยชน์ต่อสุขภาพของน้ำลูกยอในแง่ของความสามารถในการต้านมะเร็งของผลิตภัณฑ์น้ำลูกยอชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำลูกยอสดผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ และน้ำลูกยอหมักแบบธรรมชาติและแบบใช้เชื้อบริสุทธิ์ โดยการศึกษาแบ่งออกเป็นสองระยะ ระยะที่ 1 (ปีงบประมาณ พ.ศ. 2557) เป็นการศึกษาความเป็นพิษ องค์ประกอบพื้นฐานทางเคมีรวมทั้งปริมาณสารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการต้านมะเร็ง ความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ ความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และระยะที่ 2 (ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558) เป็นการศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนทางชีวภาพต่างๆและผลต่อ cell cycle และ apoptosis ในเซลล์มะเร็งตับ Huh-7

ทั้งนี้ผู้วิจัยคาดหวังว่าการหมักจะสามารถเพิ่มปริมาณสารสำคัญต่างๆในผลิตภัณฑ์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำลูกยอสด เนื่องจากมีการย่อยสลายเซลของผลยอและนำไปสู่การปลดปล่อยสารสำคัญออกมาในปริมาณสูงขึ้น ทำให้มีประโยชน์ต่อสุขภาพสูงกว่า นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกระบวนการหมักระหว่างการหมักแบบธรรมชาติและแบบเชื้อบริสุทธิ์ การใช้เชื้อบริสุทธิ์มีแนวโน้มที่จะมีประสิทธิภาพในการหมักสูงกว่าและทำให้สารสำคัญต่างๆที่มีในผลยอถูกสกัดออกมาในปริมาณมากกว่า ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะมีประโยชน์ต่อผู้ผลิตน้ำลูกยอ โดยสามารถนำข้อมูลไปใช้พัฒนาการผลิตน้ำลูกยอที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค และมีประโยชน์ต่อผู้บริโภคในแง่ที่สามารถสร้างความมั่นใจเมื่อต้องการรับประทานน้ำลูกยอเพื่อสุขภาพแต่อาจไม่มั่นใจในสมบัติทางยาและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์

บทที่ 2
แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ยอ : ถิ่นกำเนิดและสถานการณ์ปัจจุบัน

ยอ หรือโนนิ เป็นพืชในตระกูล *Morinda citrifolia* มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศอินโดนีเซีย) ปาปัวนิวกีนี และออสเตรเลีย ในบรรดาพืชสมุนไพรทั้งหลายของชาวโพลีนีเซีย ลูกยอได้รับการยอมรับสูงสุดมานานนับพันปี ด้วยความเชื่อดังกล่าวจึงมีผู้บริโภคแพร่หลายมากขึ้น อย่างไรก็ตามการผลิตน้ำลูกยอเป็นการผลิตในระดับครัวเรือนจนกระทั่งปี 1990 จึงเริ่มมีการผลิตในระดับการค้า และในปี 2001 Complementary Medicines Evaluation Committee of Australia'a Therapeutic Goods Administration (TGA) แนะนำว่าน้ำลูกยอเหมาะสมต่อการบริโภคเพื่อประโยชน์ในการรักษาโรค แต่ยังไม่พบหลักฐานงานวิจัยที่สนับสนุนความเชื่อที่ว่าน้ำลูกยอช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ในปีต่อมาน้ำลูกยอได้รับการยอมรับโดยสหภาพยุโรป (European Commission, Scientific Committee for food, 2002) ในประเทศสหรัฐอเมริกา U.S. Food and Drug Authority ยังไม่ประเมินคุณสมบัติของน้ำลูกยอแต่อย่างใด แต่มีการประกาศเตือนผู้บริโภคเกี่ยวกับความน่าเชื่อถือของการกล่าวอ้างสรรพคุณของผู้ผลิต สำหรับประเทศไทย มีการปลูกและผลิตน้ำลูกยอหมักในระดับชุมชนและอุตสาหกรรมขนาดเล็กอย่างแพร่หลาย แต่การจำหน่ายยังอยู่ในกลุ่มผู้บริโภคที่จำกัด เนื่องจากไม่สามารถประชาสัมพันธ์สินค้าได้อย่างเปิดเผย

2.2 การผลิตและจำหน่ายน้ำลูกยอในประเทศไทย

ชนิดของน้ำลูกยอ

การผลิตน้ำลูกยอในปัจจุบันมี 2 แบบ ได้แก่น้ำลูกยอพาสเจอไรซ์และน้ำลูกยอหมัก กระทั่งปัจจุบันยังไม่มีผู้ศึกษากลไกของกระบวนการหมักว่าเป็นขั้นตอนที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารสำคัญในน้ำลูกยอหรือไม่ และยังไม่มีผู้ผลิตรายใดใช้เชื้อบริสุทธิ์ในการหมัก จึงยังไม่มีมาตรฐานการหมักในระดับโรงงานให้แก่ผู้ประกอบการ ทำให้ทั้งผู้บริโภคและหน่วยงานภาครัฐที่เกี่ยวข้องขาดความมั่นใจในความปลอดภัยของตัวผลิตภัณฑ์ อีกทั้งการใช้เชื้อธรรมชาติไม่สามารถควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้มีความสม่ำเสมอได้ทุกครั้ง เป็นอุปสรรคต่อการขยายตลาดของผู้ประกอบการ

ระหว่างการหมักน้ำลูกยอ น้ำตาลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติก และทำให้ค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้นและ pH ลดลงไปเป็น 3.5 หรือต่ำกว่า และอาจมีการสร้างแอลกอออล์และสารระเหยต่างๆ ร่วมด้วย (ASTV ผู้จัดการออนไลน์, 2554) ภายหลังการหมักน้ำลูกยอจะเปลี่ยนสี โดยเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นสีของน้ำลูกยอจะคล้ำมากขึ้น (มีสีน้ำตาลจนถึงดำ) เนื้อลูกยอจะถูกย่อยสลายกลายเป็นน้ำ และรสชาติของน้ำลูกยอหมักจะมีความกลมกล่อมมากขึ้น ความแรงของกลิ่นและรสจะลดลงคล้ายกับการหมักไวน์ และเนื่องจากความเป็นกรดสูงของน้ำลูกยอหมัก จึงทำให้การพาสเจอร์ไรซ์เพื่อทำลายเชื้อโรคไม่มีความจำเป็นมากนัก หลังจากการหมักซึ่งโดยเฉลี่ยใช้เวลาประมาณ 6 เดือน น้ำลูกยอจะถูกนำมาฆ่าเชื้อด้วยความร้อนและบรรจุขวดเพื่อจำหน่ายต่อไป

สำหรับการแปรรูปน้ำลูกยอพาสเจอร์ไรซ์ เป็นการใช้ความร้อนในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ทั้งชนิดที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียและที่ก่อให้เกิดโรค และยังทำลายเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาต่างๆอีกด้วย กระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ถือว่าเป็นกระบวนการที่ไม่ใช้ความร้อนสูง กล่าวคือ อุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส ซึ่งที่ pH ต่ำกว่า 4.5 อุณหภูมินี้สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งสองประเภทข้างต้น ผลิตภัณฑ์พาสเจอไรซ์ที่ได้สามารถเก็บรักษาได้นานหลายเดือน นอกจากนี้การใช้กระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ยังลดการเปลี่ยนแปลงด้านประสาทสัมผัสและโภชนาการอันเนื่องมาจากความร้อนสูงได้ด้วย

จากข้อมูลข้างต้น กระบวนการที่แตกต่างกันมีผลอย่างมากต่อคุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของผลิตภัณฑ์ ซึ่งการเปรียบเทียบชนิดและปริมาณของสารสำคัญ รวมไปถึงความสามารถทางชีวภาพของน้ำลูกยอที่หมักและไม่หมักจึงมีความสำคัญอย่างมาก

2.3 คุณสมบัติทางยาของน้ำลูกยอ

น้ำลูกยอถูกใช้ในการรักษาโรคต่างๆมานานนับพันปี ตัวอย่างของโรคได้แก่ โรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น โรคท้องร่วง พยาธิ ท้องอืดและท้องเฟ้อ เป็นต้น นอกจากนี้ยังเชื่อว่าสามารถรักษาโรคที่เกิดจากความผิดปกติของระบบภายในร่างกายได้ เช่น โรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง ปวดศีรษะ โรคไต เนื้องอก การติดเชื้อของตา ปาก คอ รักษาอาการกระดูกหัก ไอ ปวดประจำเดือน และหอบหืด

องค์ประกอบทางเคมีและสารพฤษเคมีที่สำคัญในผลยอ

น้ำลูกยอสดโดยทั่วไปมีรสชาติเปรี้ยวและมีปริมาณน้ำตาลที่ละลายได้อยู่ในช่วง 10-25% ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียเป็นประเภทเชื้อยีสต์และราที่ปะปนมากับผิวของ

ผลยอสด องค์ประกอบทางเคมีโดยทั่วไปของผลยอสดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำลูกยอแสดงในตารางที่ 3

สารสำคัญที่ทำหน้าที่ป้องกันโรคต่างๆในผลยอสด ได้แก่ phenolic compound (flavonoid, anthraquinones), polysaccharides (6-D-glucopyranose pentaacetate) และ alkaloids ซึ่งสาร alkaloid ที่สำคัญ ได้แก่ xeronine ซึ่งอยู่ในผลยอในรูปของ proxeronine และถูกเปลี่ยนเป็นสาร xeronine โดยเอนไซม์ที่มีอยู่ในผลยอเอง สารนี้ทำหน้าที่สำคัญในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์และโปรตีน จึงช่วยให้สารอาหารต่างๆที่คนบริโภคเข้าไปถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าผลยอประกอบด้วยกรดอะมิโนและวิตามิน เช่น วิตามินซี และวิตามินเอ (Levand et al. (1979); Farine et al. (1996); Peerzada et al. (1990)) และสารอื่นๆ เช่น damnacanthal ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม anthraquinone ที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับความสามารถในการต่อต้านมะเร็งของผลยอ (Solomon, 1999) เป็นต้น

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของผลยอสดและน้ำลูกยอ

Characteristics	Noni fruit	Noni juice
pH-value	3.72	3.4-3.6
Dry matter	9.8%	10-11%
Total soluble solid (Brix)	8	-
Protein content	2.5%	0.2-0.5%
Lipid	0.15%	0.1-0.2%
Glucose	11.9%	3.0-4.0%
Fructose	8.2%	3.0-4.0%
Potassium	3,900 mg/l	30-150 mg/l
Sodium	214 mg/l	15-40 mg/l
Magnesium	14 mg/l	3-12 mg/l
Calcium	28 mg/l	20-25 mg/l
Vitamin C	-	3-25 mg/l

(ที่มา : ดัดแปลงจาก Chan-Blanco et al., 2006)

การใช้น้ำลูกยอในปัจจุบัน

มีการสกัดน้ำลูกยอจำหน่ายแก่ผู้บริโภคอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจากผู้บริโภคเชื่อว่ามีฤทธิ์ในการรักษาโรคเกี่ยวกับระบบย่อยอาหาร ลำไส้ ระบบทางเดินหายใจ และเพิ่มภูมิคุ้มกันต่อร่างกาย ผลิตภัณฑ์น้ำลูกยอนี้ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายทั้งในระดับชุมชน ระดับประเทศและต่างประเทศ ผู้ผลิตน้ำลูกยอรายใหญ่ของโลก ได้แก่ ฮาวาย ตาฮิติและฟีจิ

งานวิจัยในยุคเริ่มต้นพิสูจน์ว่าผลยอสดมีความสามารถในการยังยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญ เช่น *Stapphylococcus aureus, Psuedomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Escherichia coli* และ *Helicobacter pyroli* รวมถึง Salmonella และ Shigella นักวิจัยได้รายงานว่าสารที่ทำหน้าที่ดังกล่าวได้แก่สารประกอบฟีนอลที่มีปริมาณสูงในผลยอ (Locher et al., 1995) สำหรับความสามารถของผลยอสดในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน Mohd และคณะ (2002) รายงานว่าเมื่อทดสอบด้วยวิธี Ferric thiocyanate method (FTC) และ Thiobarbituric acid (TBA) สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้ นอกจากนี้ยังป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมันโดยมีประสิทธิภาพเท่าเทียมกับ α-tocopherol และ butylated hydroxytoluene (BHT) เมื่อทดสอบความสามารถในการต่อต้านการเกิดอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง โดยวิธี Tetrazolium nitroblue (TNB) ของน้ำลูกยอสดพบว่าสามารถป้องกันเซลล์จากการเกิดออกซิเดชันได้ โดยมีประสิทธภาพสูงกว่าวิตามินซีถึง 2.8 เท่า (Wang and Su, 2001)

สำหรับความสามารถในการต่อต้านมะเร็งของผลยอที่ผ่านมา มีรายงานว่าสารสกัดจากผลยอด้วยเอธานอลสามารถยับยั้งเนื้องอกใน Lewis lung carcinoma ซึ่งเป็นผลมาจากสารโพลีแซคคาไรด์หลายชนิด ได้แก่ glucuronic acid, galactose, arabinose และ rhamnose ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง T-cell ได้ (Hirazumi et al., 1996) น้ำลูกยอพาสเจอร์ไรซ์ยังสามารถยับยั้งการเกิด DNA-adduct ในหนูที่ได้รับน้ำลูกยอ 10% ในน้ำดื่มเป็นเวลา 1 สัปดาห์ และประสิทธิภาพการยับยั้งนี้ขึ้นอยู่กับเพศและอวัยวะของหนู โดย DNA-adduct ลดลง 30% ในหัวใจ 41% ในปอด 42% ในตับ และ 80% ในไต (Wang and Su, 2001)

นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับความสามารถในการป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด ที่เกิดจากการออกซิเดชันของไขมันชนิด Low density lipoprotein (LDL) (Kamiya et al., 2004) และน้ำลูกยอยังมีฤทธิ์ในการระงับความเจ็บปวด เมื่อให้น้ำลูกยอ 10-20% แก่หนูทดลองพบว่าสามารถยับยั้งความเจ็บปวดได้ถึง 162 และ 212% ตามลำดับ (Wang et al.., 2002b)

จากการรวบรวมข้อมูลข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า แม้ว่าในความเป็นจริงน้ำลูกยอจะถูกใช้เพื่อประโยชน์ทางยามานานและเป็นที่สนใจของนักวิทยาศาสตร์มากว่า 50 ปี แต่ผลงานวิจัยที่มีการตีพิมพ์เพื่อเผยแพร่ยังมีอยู่น้อยมาก จากการสืบค้นข้อมูลจะเห็นได้ว่างานวิจัยส่วนใหญ่เป็นการ

ทดสอบคุณสมบัติของผลยอสดหรือน้ำลูกยอสดเท่านั้น ทำให้การศึกษาข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับประโยชน์ของน้ำลูกยอหมักเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 กระบวนการผลิตน้ำลูกยอ

น้ำลูกยอพาสเจอร์ไรซ์

ส่วนประกอบ

1. ผลยอที่แก่จัด 100%

<u>ขั้นตอน</u>

1. ล้างผลยอด้วยน้ำสะอาด
2. หั่นผลยอเป็นชิ้นเล็กๆ
3. ปั่นให้ละเอียด แล้วกรองเพื่อแยกกากและน้ำ
4. พาสเจอไรซ์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
5. เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ระหว่างรอการวิเคราะห์

น้ำลูกยอหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์

ส่วนประกอบ

1. ผลยอที่แก่จัด 60%
2. น้ำอ้อยป่น 20%
3. น้ำสะอาด 20%
4. หัวเชื้อบริสุทธิ์ 10% ของส่วนผสมทั้งหมด

<u>ขั้นตอน</u>

1. ล้างผลยอด้วยน้ำสะอาด
2. ละลายน้ำอ้อยป่น 1 กิโลกรัม กับน้ำ 1 กิโลกรัม ในภาชนะ
3. ต้มส่วนผสมเพื่อฆ่าเชื้อ จนเดือด นาน 5 นาที แล้วปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส
4. เติมผลยอที่ถูกหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ
5. ต้มต่อไปให้มีอุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
6. เทใส่ถังหมัก ปิดฝาให้สนิท
7. นำถังหมักแช่ลงในถังที่มีน้ำแข็งทันที (cool shock)

8. รอให้เย็นแล้วยกออกจากถังน้ำแข็ง
9. เติมหัวเชื้อบริสุทธิ์ ปริมาณ 500 ซีซี
10. หมักไว้นาน 6 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง โดยควรดูสภาพของน้ำหมักเป็นระยะๆ และคลายฝาถังหมักทุกวันในช่วง 15 วันแรกของการหมักเพื่อทำการระบายก๊าซออก
11. นำผลยอหมักมาสกัดด้วยน้ำร้อยละ 15 ของน้ำหนักยอหมัก กรองเอาส่วนใสและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ: กรณีที่ไม่เติมน้ำตาล จะใช้วิธีการเดียวกันแต่เพิ่มผลยอมาทดแทนสัดส่วนของน้ำตาล

การเตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์

ส่วนประกอบ

1.	ผลยอที่แก่จัด	70%
2.	น้ำอ้อยป่น	10%
3.	น้ำสะอาด	20%
4.	ต้นเชื้อบริสุทธิ์	10% ของส่วนผสมทั้งหมด

<u>ขั้นตอน</u>

1. ล้างผลยอด้วยน้ำสะอาด
2. ละลายน้ำอ้อยป่น 50 กรัม กับน้ำ 100 กรัม ในภาชนะ
3. ต้มส่วนผสมจนเดือดเพื่อฆ่าเชื้อ นาน 5 นาที แล้วปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสแล้วเติมผลยอที่ถูกหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ
4. ต้มต่อไปให้มีอุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
5. เทใส่ถังหมัก ปิดฝาให้สนิท
6. นำถังหมักแช่ลงในถังที่มีน้ำแข็งทันที (cool shock)
7. รอให้เย็นแล้วยกออกจากถังน้ำแข็ง ทิ้งไว้ให้เย็น
8. เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์
9. หมักไว้นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
10. นำหัวเชื้อบริสุทธิ์ไปใช้ในการผลิตน้ำลูกยอหมักทันที

น้ำลูกยอหมักด้วยเชื้อธรรมชาติ

ส่วนประกอบและขั้นตอนคล้ายกับการหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ ยกเว้นไม่มีการเติมหัวเชื้อบริสุทธิ์ ดังนี้

ส่วนประกอบ

1. ผลยอที่แก่จัด	60%
2. น้ำอ้อยป่น	20%
3. น้ำสะอาด	20%

<u>ขั้นตอน</u>

1. ล้างผลยอด้วยน้ำสะอาด
2. ละลายน้ำอ้อยป่น 1 กิโลกรัม กับน้ำ 1 กิโลกรัม ในภาชนะแล้วเติมผลยอที่ถูกหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ
3. บรรจุในถังหมักที่ผ่านการลวกด้วยน้ำเดือด
4. หมักไว้นาน 6 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง โดยควรดูสภาพของน้ำหมักเป็นระยะๆ และคลายฝาถังหมักทุกวันในช่วง 15 วันแรกของการหมักเพื่อทำการระบายก๊าซออก
5. นำผลยอหมักมาสกัดด้วยน้ำร้อยละ 15 ของน้ำหนักยอหมัก และเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ: กรณีที่ไม่เติมน้ำตาล จะใช้วิธีการเดียวกันแต่เพิ่มผลยอมาทดแทนสัดส่วนของน้ำตาล

3.2 การวิเคราะห์คุณภาพของน้ำลูกยอ

วิเคราะห์คุณภาพของน้ำลูกยอในด้านต่างๆตามมาตรฐานน้ำหมักชีวภาพจากพืช (มผช. 481/2547) ได้แก่ ปริมาณเอทิลแอลกอฮอล์ เมทิลแอลกอฮอล์ ความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (AOAC, 2000) การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ ซาลโมเนลลา <u>สตาฟิโลค็อกคัสออเรียส</u> <u>คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์</u> <u>เอสเชอริเชีย โคไล</u> และ ยีสต์และรา (BAM, 2001) ปริมาณกรด (titratable acidity) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำ (hand refractometer) ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Hot air oven) ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (AOAC, 2000) กลูโคสและฟรุคโตส (AOAC, 2000) โพแทสเซียม โซเดียม และแมกนีเซีม (ICP-MS/OES)

3.3 วิเคราะห์ปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมด (total polyphenol content) ปริมาณฟลาโวนอยด์และไวตามินซี

Total polyphenol content

ปริมาณสารฟีนอลิคทั้งหมดในน้ำลูกยอแต่ละชนิดจะถูกวัดด้วยวิธี colorimetric method โดยใช้ Folin-Ciocalteu reagent ตามวิธีของ Slinkard and Singleton (1977) ดังนี้ ผสมตัวอย่างน้ำลูกยอ 20 µl กับ น้ำกลั่น 1.58 ml จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 µl และ สารละลายอิ่มตัว Na_2CO_3 (20%) ปริมาตร 300 µl บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm ด้วย UV-vis spectrophotometer สารละลายมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ gallic acid รายงานผลในรูป mg gallic acid/ ml ตัวอย่าง

Flavonoid content

วัดปริมาณ flavonoid ด้วยวิธี ammonium chloride colorimetric assay โดยเติมตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน catechin (ความเข้มข้น 40-100 mg/l) ปริมาตร 1 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 4 ml จากนั้นเติม $NaNO_2$ ความเข้มข้น 5% ปริมาตร 0.3 ml ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติมสารละลาย 10% $AlCl_3$ ปริมาตร 0.3 ml นาทีที่ 6 เติมสารลลาย 1 M NaOH ปริมาตร 2 ml แล้วปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดให้เป็น 10 ml ด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 nm เทียบกับ blank รายงานปริมาณ flavonoid ในรูป mg catechin equivalents (CE)/100 g ตัวอย่าง

Vitamin C (ascorbic acid)

วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีด้วยวิธี Dichloroindophenol titrimetric methods (AOAC, 2000) โดยเติม 0.3 ml ตัวอย่างน้ำลูกยอลงใน 20 ml สารละลายกรด acetic acid (3%) และ metaphosphoric acid (8%) แล้วไตเตรทด้วย 0.025% 2,6-dichloroindophenol จนกระทั่งเกิดสีชมพูเมื่อถึงจุดยุติ สารละลายมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ ascorbic acid รายงานผลในรูปของ mg ascorbic acid/ ml น้ำลูกยอ

3.4 ทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์

ทดสอบ Minimal inhibitory concentration (MIC) และ Minimal bactericidal concentration (MBC) ของน้ำลูกยอ ต่อเชื้อต่างๆได้แก่ *Stapphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Enterococcos faecalis* และ *Klebsella pneumonia* ดังนี้

การเตรียมน้ำลูกยอ

กรองน้ำลูกยอด้วย Nalgene filter ขนาด 0.45 μM จากนั้นเติม double-strength trypticase soy broth (TSB) ในปริมาณที่เท่ากัน เจือจางครั้งละสองเท่าด้วย single-strength TS broth แล้วเติมตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 180 μl ลงใน 96-well microplates.

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบข้ามคืมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TS agar จากนั้นเขี่ยเชื้อที่ได้จากโคโลนีมาผสมกับน้ำเกลือจนมีความขุ่นเท่ากับ Mcfarland standard 0.5 ใช้ McFarland standard เจือจาง 1:100 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นต่อไป

การวิเคราะห์

เติมเชื้อตั้งต้นที่เพิ่งเตรียมข้ามคืนปริมาตร 20 μl ลงใน 96-well plate ที่มีน้ำลูกยอเจือจางอยู่ 180 μl ในแต่ละ well นี้จะมีเชื้อจุลินทรีย์อยู่ 10^4-10^5/ml บ่มที่อุณหภูมิ 35^{0}C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง ภายหลังการบ่ม พิจารณาค่า MIC จากความเข้มข้นสุดท้ายที่ตัวอย่างใน well ยังคงใสอยู่ ส่วน MBC คือ ความเข้มข้นสุดท้ายที่เชื้อจุลินทรีย์ถูกทำลาย 99.9% ของปริมาณเชื้อเริ่มต้น ซึ่งทดสอบได้จากการนำตัวอย่างใน well ที่คาดว่าจะเป็น MBC มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5 การเตรียมเซลล์มะเร็งตับ (Human Hepatocarcinoma cell line, Huh-7)

เพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture technique) ในห้องปฏิบัติการ โดยมีวิธีการเตรียมเซลล์ Human hepatocarcinoma cell line ดังนี้ นำเซลล์มะเร็งตับ (Huh-7 cells) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) ที่มีซีรัม 10% (10% Fetal calf serum, FCS), 1% กรดอมิโน (Non-essential amino acid, NEAA), 100 Unit/ml เพนนิซิลินและ 100 Unit/mL สเตรปโตมัยซิน และ L-glutamine จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รอจนมีเซลล์แบ่งตัวออกมาประมาณ 80% ของภาชนะเลี้ยงเซลล์ จึงทำการแยกเซลล์ลงขวดเลี้ยงเซลล์ใหม่โดยใช้ทริปซิน ส่วนหนึ่งนำไปศึกษา

ทดลอง อีกส่วนหนึ่งจะเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวเพื่อรอการใช้ในครั้งต่อไปโดยจะใช้ไปจนถึง Passage ที่ 20 เท่านั้น เนื่องจากหลังจากนั้นเซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

3.6 การทดสอบความเป็นพิษของน้ำลูกยอต่อเซลล์มะเร็งตับ

นำเซลล์มะเร็งตับไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่มีน้ำลูกยอความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบ จากนั้นทดสอบโดยวิธี MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay ซึ่งเป็นการวัดการทางานของเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase จากเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งผลที่ได้จะแสดงให้เห็นว่าน้ำลูกยอก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์หรือไม่

3.7 การศึกษาความสามารถในการก่อกลายพันธุ์ของน้ำลูกยอชนิดต่างๆ

วิธีการทดสอบด้วยเทคนิค Ames test เป็นการทดสอบการก่อการกลายพันธุ์ของตัวอย่างอาหารในเชื้อแบคทีเรียที่ถูกเปลี่ยนแปลงยีนไม่ให้สามารถเพิ่มจำนวนได้ในสภาวะปกติเนื่องจากไม่สามารถสร้างกรดอะมิโนจำเป็น histidine ได้ แต่หากเชื้อชนิดนี้ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีสารก่อกลายพันธุ์หรือก่อมะเร็ง ยีนที่ควบคุมการสร้าง histidine นี้จะถูกกลายพันธุ์ให้สามารถสร้างกรดอะมิโนได้อีกครั้งและทำให้เชื้อแบคทีเรียเพิ่มจำนวนมากขึ้น โดยหากสารเคมีในตัวอย่างอาหารเป็น procarcinogen จะถูกเปลี่ยนไปเป็น carcinogen โดยอาศัยเอนไซม์ในตับที่เรียกว่า microsomal supernatant (S9) โดยแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ ได้แก่ *Salmonella typhimurium* TA98

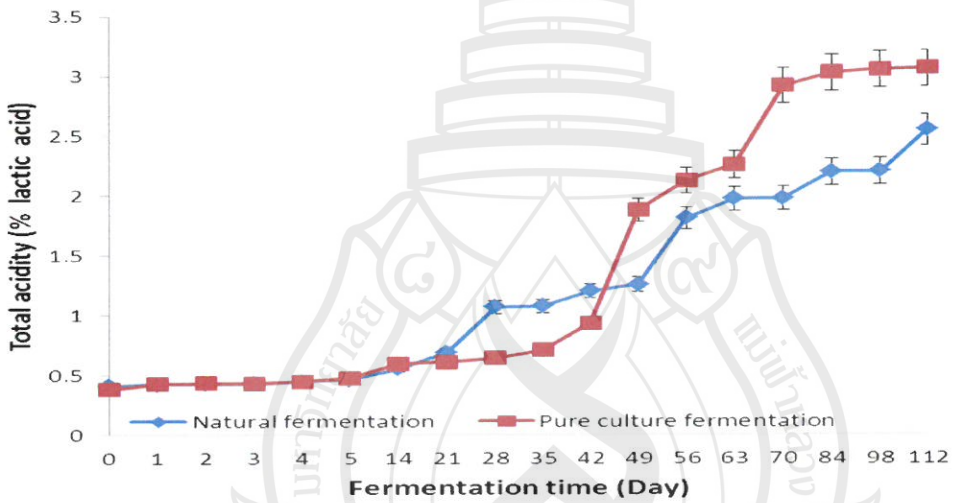
ในการทดลองครั้งนี้จะทดสอบการก่อกลายพันธุ์ของตัวอย่างน้ำลูกยอ 2 ชนิด ได้แก่ น้ำลูกยอสด และน้ำลูกยอหมักด้วยเชื้อตามธรรมชาติ ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-100 μL/plate) และมีสารก่อกลายพันธุ์ 2 ชนิดเป็น positive control ได้แก่ 4 -nitro-o-phenylenediamine และ 2-Aminoanthracene ในสภาวะที่ไม่มีและมี S9 ตามลำดับ หากน้ำลูกยอมีความเป็นพิษและก่อให้เกิดกลายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย จะพบว่าจำนวนโคโลนีของตัวอย่างจะต้องมีมากกว่าในเพลทควบคุม (ไม่มีตัวอย่างและไม่มีสารก่อกลายพันธุ์) อย่างน้อย 2 เท่า และจะถือว่าตัวอย่างนั้นมีโอกาสก่อให้เกิดมะเร็งได้ Ames (1975)

บทที่ 4
ผลการวิจัย

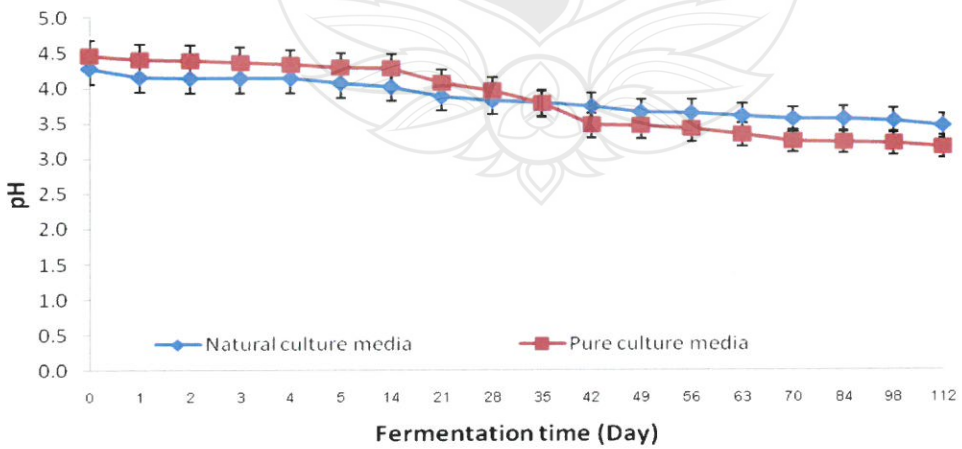
4.1 การเตรียมน้ำลูกยอหมัก

ผู้วิจัยได้ทำการเตรียมน้ำลูกยอหมัก 4 ชนิด ได้แก่ น้ำลูกยอหมักแบบใช้และไม่ใช้เชื้อบริสุทธิ์ (มีการใช้และไม่มีการใช้น้ำตาลในสูตร) ตามกระบวนการที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น (ข้อ 3.1 และภาคผนวก ก.) สำหรับกระบวนการหมักโดยเชื้อบริสุทธิ์ ในการทดลองครั้งนี้ใช้เชื้อ TISTR 1340 *Lactobacillus casei* จากคลังเก็บรักษาพันธุ์จุลินทรีย์ วว. (TISTR Culture Collections) ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ซึ่งเชื้อชนิดดังกล่าวอ้างอิงมาจากผลการวิจัยของกลุ่มวิจัยน้ำหมักชีวภาพ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และทำการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงสมบัติของน้ำลูกยอระหว่างการหมักในช่วงสามเดือนแรก ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.1 – 4.2 พบว่าการหมักทั้งสองแบบ ได้แก่ การหมักแบบธรรมชาติ (ไม่มีการใช้เชื้อบริสุทธิ์) และการหมักแบบใช้เชื้อบริสุทธิ์ ทำให้ปริมาณกรดของน้ำลูกยอมีค่าสูงขึ้น โดยน้ำลูกยอที่หมักโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์มีปริมาณกรดสูงกว่า (0.5-3.0% lactic acid) เมื่อเปรียบเทียบกับแบบธรรมชาติ (0.5-2.5 % lactic acid) (รูปที่ 4.1) ในขณะเดียวกันค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าลดลงระหว่างการหมัก (รูปที่ 4.2) โดยเมื่อหมักเป็นเวลา 3 เดือนค่าพีเอชของน้ำหมักธรรมชาติมีค่าเป็น 3.5 ขณะที่เชื้อบริสุทธิ์มีค่าต่ำกว่าเป็น 3.0 นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมดพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้น โดยเชื้อบริสุทธิ์มีค่าสูงกว่าเล็กน้อยและส่งผลให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เมื่อวัดโดยใช้ FRAP assay ของการหมักโดยเชื้อบริสุทธิ์มีค่าสูงกว่า ส่วนความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อวัดด้วย DPPH assay พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก (ไม่แสดงข้อมูล) อย่างไรก็ตามค่าต่างๆดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำลูกยอสด พบว่าน้ำลูกยอสดมีปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าน้ำหมักเมื่อเริ่มหมักในวันที่ 0 แต่เมื่อหมักนานขึ้นเป็นเวลา 3 เดือน ค่าต่างๆมีค่าสูงขึ้นจนกระทั่งเทียบเท่ากับน้ำลูกยอสด (ไม่แสดงข้อมูล) การที่สมบัติทางเคมีของน้ำลูกยอหมักวันที่ 0 มีค่าต่ำกว่าน้ำลูกยอสดนั้นอาจมีสาเหตุมาจากในกระบวนการหมักมีการเติมส่วนผสมอื่นๆ เพื่อเป็นแหล่งพลังงานและเพื่อเพิ่มรสชาติของน้ำหมัก ได้แก่ น้ำตาลทรายแดงร้อยละ 20 และน้ำสะอาดร้อยละ 20 ทำให้มีปริมาณเนื้อลูกยอเพียงร้อยละ 60 แต่อย่างไรก็ตามระหว่างการหมักสมบัติดังกล่าวของน้ำลูกยอกลับมีค่าสูงขึ้น ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น

จากผลการทดลองเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรด สารสำคัญและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระระหว่างการหมัก โดยสมบัติเหล่านี้มีค่าสูงขึ้นตามระยะเวลาการหมัก และเชื้อบริสุทธิ์มีแนวโน้มว่าจะให้น้ำลูกยอหมักที่มีคุณประโยชน์สูงกว่า อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปผู้ผลิตจะหมักน้ำลูกยอเป็นเวลาอย่างน้อย 12 เดือน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการหมักน้ำลูกยอเป็นระยะเวลา 6 เดือน เนื่องจากระยะเวลามีจำกัด โดยทำการหมักในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2556- พฤษภาคม พ.ศ. 2557 นอกจากนี้ได้เพิ่มตัวอย่างควบคุมที่มีการหมักนาน 12 เดือน (ทั้งแบบที่มีการใช้เชื้อบริสุทธิ์และหมักโดยเชื้อธรรมชาติ) โดยตัวอย่างดังกล่าวผลิตโดยผู้วิจัยชุดเดียวกันนี้ เพียงแต่ใช้ผลยอที่มาจากคนละฤดูกาล



รูปที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดของน้ำลูกยอระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา 3 เดือน



รูปที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำลูกยอระหว่างการหมักเป็นระยะเวลา3 เดือน

4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบและคุณภาพทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยาของน้ำลูกยอ

ภายหลังการหมักเป็นเวลา 6 เดือน ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบและคุณภาพของผลิตภัณฑ์น้ำลูกยอทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยา เปรียบเทียบตัวอย่าง 7 ตัวอย่าง ได้แก่ FJ = น้ำลูกยอสด FN 12 =น้ำลูกยอหมักด้วยเชื้อตามธรรมชาติเป็นระยะเวลา 12 เดือน FP 12 = น้ำลูกยอหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์เป็นระยะเวลา 12 เดือน FPS 6 = น้ำลูกยอหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์เป็นระยะเวลา 6 เดือน (แบบเติมน้ำตาล) FPNS 6 = น้ำลูกยอหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์เป็นระยะเวลา 6 เดือน (แบบไม่มีการเติมน้ำตาล) FNS 6 = น้ำลูกยอหมักด้วยเชื้อธรรมชาติเป็นระยะเวลา 6 เดือน (แบบเติมน้ำตาล) FNNS 6 = น้ำลูกยอหมักด้วยเชื้อธรรมชาติเป็นระยะเวลา 6 เดือน (แบบไม่มีการเติมน้ำตาล) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำลูกยอชนิดต่างๆ

องค์ประกอบทางเคมี	FJ	FNS 6	FPS 6	ค่าอ้างอิงน้ำลูกยอสด (Chan-Blanco et al., 2006)	วิธีการอ้างอิง
Ethanol (%v/v)	0.04	0.39	0.48		GC/MS
Methamol (mg/L)	4.98	6.47	6.88		GC/MS
Protein (g/ 100g)	0.47	0.52	0.61	0.2-0.5	AOAC (2012)
Total sugar (g/ 100g)	2.32	12.39	12.77		Compendium of method for food analysis (2003)
Fructose (g/ 100g)	0.74	8.67	8.84	3.00-4.00	
Glucose (g/ 100g)	1.59	3.72	3.93	3.00-4.00	
Maltose (g/ 100g)	ND	ND	ND		
Sucrose (g/ 100g)	ND	ND	ND		
Lactose (g/ 100g)	ND	ND	ND		
Magnesium (mg/ 100g)	9.50	22.26	21.08		AOAC (2005)
Potassium (mg/ 100g)	298.6	281.5	275.1	300-1500	AOAC (2005)
Sodium (mg/ 100g)	4.98	8.16	7.83	15-40	AOAC (2005)

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำลูกยอสด และน้ำลูกยอที่หมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์และเชื้อธรรมชาติมีความแตกต่างกันเล็กน้อย โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการหมักและไม่หมัก พบว่า เมื่อหมักน้ำลูกยอแล้วจะทำให้ปริมาณแอลกอฮอล์ (ethanol และ methanol) มีค่าสูงขึ้น อย่างไรก็ตามค่าดังกล่าวอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนของน้ำหมักพืช ซึ่งกำหนดให้ปริมาณเอทิลแอลกอฮอล์น้อยกว่าร้อยละ 3 ส่วนเมทิลแอลกอฮอล์ต้องมีปริมาณน้อยกว่า 240 mg/L ทั้งนี้เชื้อบริสุทธิ์มีค่าไม่แตกต่างจากเชื้อตามธรรมชาติ ปริมาณโปรตีนสูงขึ้นเล็กน้อย แต่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงขึ้นอย่างมาก เนื่องจากในกระบวนการหมักมีการเติมน้ำตาลซูโครส ซึ่งภายหลังการหมักพบน้ำตาลชนิดกลูโคสและฟรุกโตส ส่วนน้ำตาลมอลโตส ซูโครส และแลกโตส ไม่สามารถตรวจพบในตัวอย่างทุกตัวอย่าง แมกนีเซียมและโซเดียมเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ขณะที่โพแทสเซียมมีค่าลดลง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองดังกล่าวกับงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.2 สมบัติทางจุลชีววิทยาของน้ำลูกยอ

ชนิดน้ำลูกยอ	ยีสต์และรา (cfu/mL)	*E. coli* (cfu/mL)	*Cl. Perfringens* (cfu/mL)	*S. aureus* (cfu/mL)	*Salmonella* sp. (cfu/mL)	Lactic acid bacteria (cfu/mL)
FJ	0	0	ND	ND	ND	0
FP 12	0	0	ND	ND	ND	0
FN 12	0	0	ND	ND	ND	0
FPS 6	26	0	ND	ND	ND	0
FPNS 6	4	0	ND	ND	ND	34
FNS 6	31	0	ND	ND	ND	0
FNNS 6	1	0	ND	ND	ND	49

หมายเหตุ *E. coli* = *Escherichia coli*

Cl. Perfringens = *Clostridium perfringens*

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

ND = ตรวจไม่พบ

กระบวนการหมักผลยอของแต่ละประเทศหรือในแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกัน และไม่มีมาตรฐานการหมัก ทำให้ไม่ทราบแน่ชัดว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องประกอบด้วยเชื้อชนิดใดบ้าง

และมีการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักอย่างไร (Nelson และคณะ 2006) และแม้ว่าสมบัติทางเคมีของน้ำลูกยอหมักจะแสดงว่าผลิตภัณฑ์หมักมีความเป็นกรดสูงหรือมีพีเอชน้อยกว่า 3.5 ซึ่งเป็นช่วงที่จุลินทรีย์ก่อโรคไม่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างแน่นอน แต่เพื่อให้มั่นใจในความปลอดภัยทางจุลินทรีย์ของตัวอย่างน้ำลูกยอ ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ 6 ชนิด ตามกำหนดของมาตรฐานผลิตภัณฑ์พืชหมัก ได้แก่ ยีสต์และรา *Escherichia coli* *Clostridium perfringens* แบคทีเรียสร้างกรดแลคติก และ *Salmonella* sp. พบว่าน้ำลูกยอสดผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอไรซ์ (80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที) ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิด อย่างไรก็ตามในตัวอย่างที่ผ่านการหมัก (ไม่ผ่านการพาสเจอไรซ์) ไม่พบเชื้อก่อโรค แต่พบยีสต์และรา ซึ่งปริมาณเชื้อดังกล่าวยังต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้ จึงนับว่ามีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และพบแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกเล็กน้อยในตัวอย่างที่หมักโดยไม่มีการเติมน้ำตาลเท่านั้น ทั้งนี้อาจเกิดจากในตัวอย่างดังกล่าวมีค่าความเป็นกรดต่ำกว่าตัวอย่างอื่น (ตารางที่ 4.2) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากปฏิกิริยาการหมักเพื่อสร้างกรดแลคติกเกิดได้ช้าเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรที่มีน้ำตาล เชื้อจึงยังคงรอดชีวิตมากกว่า งานวิจัยที่ผ่านมารายงานการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกชนิด probiotic bacteria 3 ชนิด ได้แก่ *L. casei*, *L. plantarum* และ *bifidobacteria* ซึ่งผลการทดลองพบว่าเชื้อทั้งสามชนิดเจริญเติบโตได้ดีจนมีปริมาณ 10^9 colony/ml ภายหลังการหมัก 48 ชั่วโมง แต่ภายหลังการหมัก 3 สัปดาห์ไม่พบเชื้อ *L. casei* ในน้ำลูกยอ ส่วนเชื้อชนิดอื่นๆ มีปริมาณลดลง (Wang และคณะ 2009)

ตารางที่ 4.3 สมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำลูกยอชนิดต่างๆ

ตัวอย่าง	ปริมาณของแข็ง (%)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดแลคติก (%)
FJ	5.53 ± 0.12^{c}	4.37 ± 0.03^{a}	0.70 ± 0.06^{b}
FP 12	12.60 ± 0.92^{ab}	3.09 ± 0.01^{c}	2.03 ± 0.1^{a}
FN 12	14.86 ± 0.99^{a}	3.07 ± 0.07^{c}	3.04 ± 0.25^{a}
FPS 6	15.40 ± 2.25^{a}	2.98 ± 0.02^{d}	2.55 ± 0.42^{a}
FPNS 6	2.07 ± 0.31^{c}	3.51 ± 0.00^{b}	0.97 ± 1.26^{b}
FNS 6	14.87 ± 2.60^{a}	2.99 ± 0.02^{d}	2.73 ± 0.4^{a}
FNNS 6	3.90 ± 0.42^{ab}	3.53 ± 0.00^{b}	0.95 ± 0.39^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

สมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำลูกยอเปลี่ยนแปลงไปภายหลังการหมัก ดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าน้ำลูกยอสด และสภาวะการหมักที่มีและไม่มีการใช้น้ำตาลมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยปริมาณของแข็ง และปริมาณกรดแลคติกมีค่าเพิ่มขึ้นภายหลังการหมัก ส่วนความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีค่าลดลง และในสภาวะที่หมักโดยใช้น้ำตาลจะทำให้ปริมาณกรดและของแข็งสูงขึ้น ขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง (ปกติลดลงเหลือ 3.5 , Nelson และคณะ, 2006) ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้เชื้อบริสุทธิ์และการหมักด้วยเชื้อธรรมชาติ พบว่าค่าต่างๆ ข้างต้นไม่แตกต่างกัน การหมักน้ำลูกยอโดยปกติเป็นการสร้างกรดสองชนิดโดยเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ กรดแลคติกและกรออะซิติก ซึ่งจะมีการสร้างแอลกอฮอล์เพียงเล็กน้อยหรือไม่สร้างเลย อย่างไรก็ตามภายหลังการหมัก การปนเปื้อนระหว่างกระบวนการจากยีสต์และรา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราที่สามารถสร้างสารพิษ สามารถเกิดขึ้นได้ (Nelson และคณะ, 2006) จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ผู้ผลิตจะต้องมีความระมัดระวัง และควรผลิตภายใต้แนวทางการผลิตอาหารตามหลักเกณฑ์วิธีการที่ดี (Good Manufacturing Practice, GMP) ดังนั้นเพื่อทดสอบความเป็นพิษที่อาจเกิดจากสารพิษจากเชื้อราหรือองค์ประกอบทางเคมีในผลิตภัณฑ์น้ำลูกยอสดและน้ำลูกยอหมักด้วยเชื้อธรรมชาติ (ซึ่งเป็นวิธีการที่ผู้ผลิตในประเทศไทยใช้กัน) ในงานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบความสามารถในการก่อกลายพันธุ์ในเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารโพลีฟีนอลและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำลูกยอ

ตัวอย่าง	ปริมาณสารโพลีฟีนอล (mgGAE/100 mL)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (μg CE/mL)	FRAP (μmole Ferrous sulfate/mL)	DPPH (μmole Trolox/mL)	ปริมาณวิตามินซี (mg/100 mL)
FJ	79.68 ±21.74^{c}	5.16±0.53^{c}	112.39 ± 25.98^{cd}	72.77 ± 0.15^{d}	43.24 ± 0.00^{b}
FP 12	133.30 ± 11.67^{b}	22.48±1.31^{a}	146.36 ± 12.99^{bc}	73.46 ± 0.03^{abc}	36.58 ± 2.36^{c}
FN 12	133.38 ± 9.87^{b}	21.31±1.96^{a}	125.51 ± 10.49^{c}	73.75 ± 0.07^{a}	34.08 ± 5.63^{c}
FPS 6	174.30 ± 19.40^{a}	21.26±2.30^{a}	193.12 ± 17.59^{a}	73.60 ± 0.10^{abc}	40.74 ± 1.97^{a}
FPNS 6	78.72 ± 7.44^{c}	14.34±2.61^{b}	81.63 ± 15.08^{d}	73.30 ± 0.26^{c}	36.85 ± 1.14^{c}
FNS 6	155.13 ± 8.66^{ab}	22.74±1.30^{a}	165.04 ± 11.90^{ab}	73.69 ± 0.08^{ab}	25.47 ± 0.86^{d}
FNNS 6	94.18 ± 19.27^{c}	8.18±1.16^{c}	119.46 ± 25.36^{c}	73.38 ± 0.20^{bc}	39.35 ± 0.86^{bc}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ns หมายถึง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

GAE หมายถึง Gallic acid equivalent, CE หมายถึง Catechin equivalent

ตารางที่ 4.5 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำลูกยอ

น้ำลูกยอ	Scopoletin (mg/kg)	Damnacanthal (mg/kg)	วิธีทดสอบ
FJ	54.49	67.20	HPLC-DAD/MSD
FPS 6	53.41	68.17	
FPNS 6	44.31	48.11	
FNS 6	44.67	61.42	
FNNS 6	38.82	55.32	

เมื่อพิจารณาปริมาณสารสำคัญและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (ตารางที่ 4.4) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบระหว่างน้ำลูกยอสดและน้ำลูกยอหมัก ปริมาณสารโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์ของน้ำลูกยอมีค่าสูงขึ้นภายหลังการหมักและพบในตัวอย่างที่มีการเติมน้ำตาลมากที่สุด ค่า DPPH value มีค่าใกล้เคียงกันแต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยน้ำลูกยอสดมีค่าต่ำที่สุด และค่าสูงที่สุดพบในตัวอย่างที่ผ่านการหมักแบบมีน้ำตาล ในขณะที่ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อวัดด้วยค่า FRAP ซึ่งเป็นการวัดความสามารถในการให้อิเล็คตรอนแก่สารอนุมูลอิสระเช่นเดียวกับการวัดค่า DPPH พบว่ามีค่าสูงขึ้นหลังการหมักเช่นกัน และเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับค่า DPPH ทั้งนี้สาเหตุอาจเกิดจากการที่เชื้อแบคทีเรียสร้างกรดสามารถย่อยสลายสารต่างๆภายในเซลล์ของผลยอ ทำให้สามารถปลดปล่อยสารโพลีฟีนอลอิสระออกมามากขึ้น Shori (2013) รายงานว่า *Lactobacillus* spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดที่สามารถสร้างเอนไซม์ proteolysis ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนในถั่วเหลือง ทำให้สามารถปลอดปล่อยสารโพลีฟีนอลที่จับกับโปรตีนออกมาจากเมล็ดถั่วได้สูงกว่าถั่วที่ไม่มีการหมัก ซึ่งในน้ำลูกยอสดปริมาณสารโพลีฟีนอลมีค่าเป็น 79.68 mgGAE/ 100 mL เทียบเคียงกับรายงานของ Bramorski และคณะ (2010) ขณะที่น้ำลูกยอหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์มีค่าใกล้เคียงกับตัวอย่างที่ใช้เชื้อธรรมชาติ ซึ่งมีค่าเป็น 174.30 และ 155.03 mgGAE/ 100 mL ตามลำดับ และในสูตรที่มีการเติมน้ำตาลมีค่าสูงกว่าไม่มีน้ำตาล ส่วนปริมาณวิตามินซีมีค่าลดลงหลังกระบวนการหมักตามความคาดหมาย ซึ่งปริมาณที่พบในน้ำลูกยอสดมีความสอดคล้องที่มีรายงานไว้โดย European Commission (2002) ซึ่งรายงานไว้เท่ากับ 3-25 mg/100 mL

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในยอมีหลายชนิด แต่สารสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านมะเร็งที่มีรายงานมากที่สุด ได้แก่ สารโพลีฟีนอล 2 ชนิด คือ scopoletin และ damnacanthal

(Solomon, 1999; Nualsanit et. al., 2013) ซึ่งสารชนิดหลังเป็นสารในกลุ่ม anthraquinone ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารทั้งสองชนิดนี้ในตัวอย่างน้ำลูกยอสด เพื่อเปรียบเทียบกับน้ำลูกยอหมักแบบต่างๆ ผลแสดงดังในตารางที่ 4.5 พบว่าในน้ำลูกยอสดมีปริมาณสารทั้งสองชนิดใกล้เคียงกับน้ำลูกยอหมักทุกชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง damnacanthal ซึ่งมีรายงานว่ากระบวนการแปรรูป เช่น การหมัก ไม่มีผลต่อปริมาณสารดังกล่าว (Bussmann et. al., 2013) ขณะที่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์และเชื้อธรรมชาติ ในเชื้อบริสุทธิ์จะมีปริมาณสารสำคัญสูงกว่าและในสภาวะที่มีน้ำตาลจะมีค่าสูงกว่าไม่มีน้ำตาล ซึ่งผลเป็นไปในทิศทางเดียวกับสมบัติทางเคมีอื่นๆในตารางที่ 4.4

4.3 การทดสอบความเป็นพิษของน้ำลูกยอต่อเซลล์มะเร็งตับและการทดสอบความสามารถในการก่อกลายพันธุ์

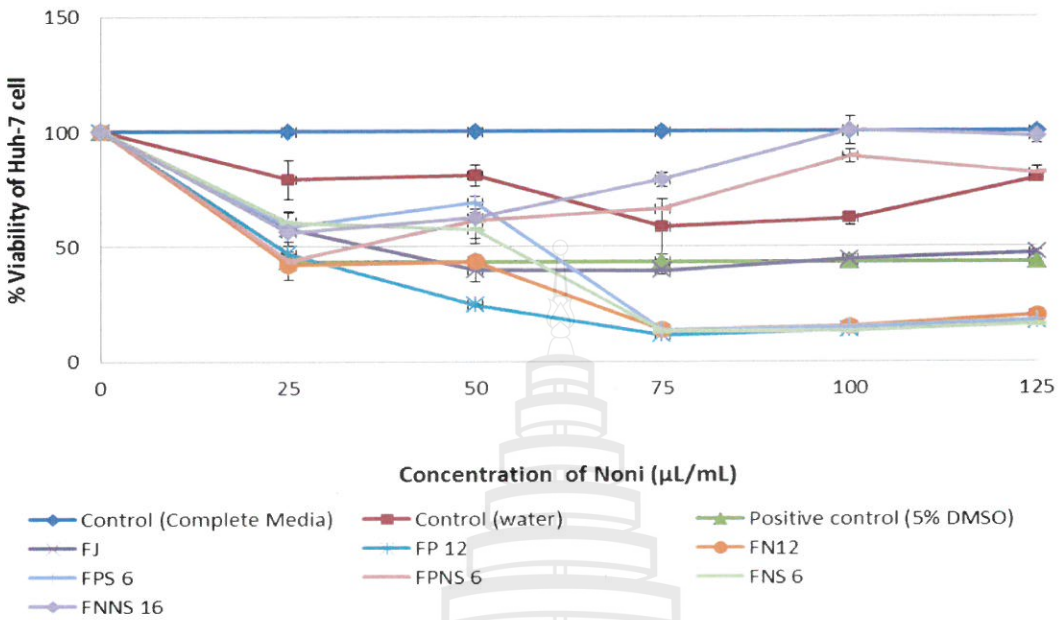
4.3.1 การทดสอบความเป็นพิษของน้ำลูกยอต่อเซลล์มะเร็งตับ

การทดลองในขั้นตอนนี้อาศัยการเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture technique) ในห้องปฏิบัติการ โดยขั้นตอนการเตรียมเซลล์ Human hepatocarcinoma cell line (Huh-7 cell) เป็นดังนี้ นำเซลล์มะเร็งตับ (Huh-7 cells) ที่มีเซลล์จำนวน 1x 10^6 เซลล์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) ที่มีซีรัม 10% (10% Fetal bovine serum, FBS) 1% กรดอะมิโน (Non-essential amino acid, NEAA) 100 Unit/mL เพนนิซิลิน และ 100 Unit/mL สเตรปโตมัยซิน จากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่สภาวะ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นประมาณ 80% ของภาชนะเลี้ยงเซลล์ แล้วทำการแยกเซลล์ลง 96 well plates โดยใช้ ทริปซินในการแยกเซลล์จากภาชนะ ทำการนับจำนวนเซลล์และเจือจางให้มีจำนวน 2 x 10^4 cell ต่อ 1 หลุม แล้วทำการเลี้ยงในอาหาร DMEM ที่มีปริมาตร 200 μL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำลูกยอชนิดต่างๆ ทั้งหมด 7 ชนิด ดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0 25 50 75 100 และ 125 μL/mL แล้วเลี้ยงเซลล์ต่ออีก 24 และ 48 ชั่วโมงโดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมสารทดสอบ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำกลั่นเป็นสารควบคุมที่เป็นลบ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 5% DMSO เป็นตัวควบคุมที่เป็นบวก เนื่องจากสาร DMSO มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อครบเวลาถ่ายน้ำลูกยอหมักชนิดต่างๆ ทิ้งไป แล้วเติมสาร MTT (Millipore) บ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ภายใต้ความมืด แล้วจึงนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Micro plate reader ที่ความยาวคลื่น 570 nm และ 630 nm ตามลำดับ แต่ละความเข้นข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ และมีการทดสอบรวมทั้งสิ้น 3 ครั้ง

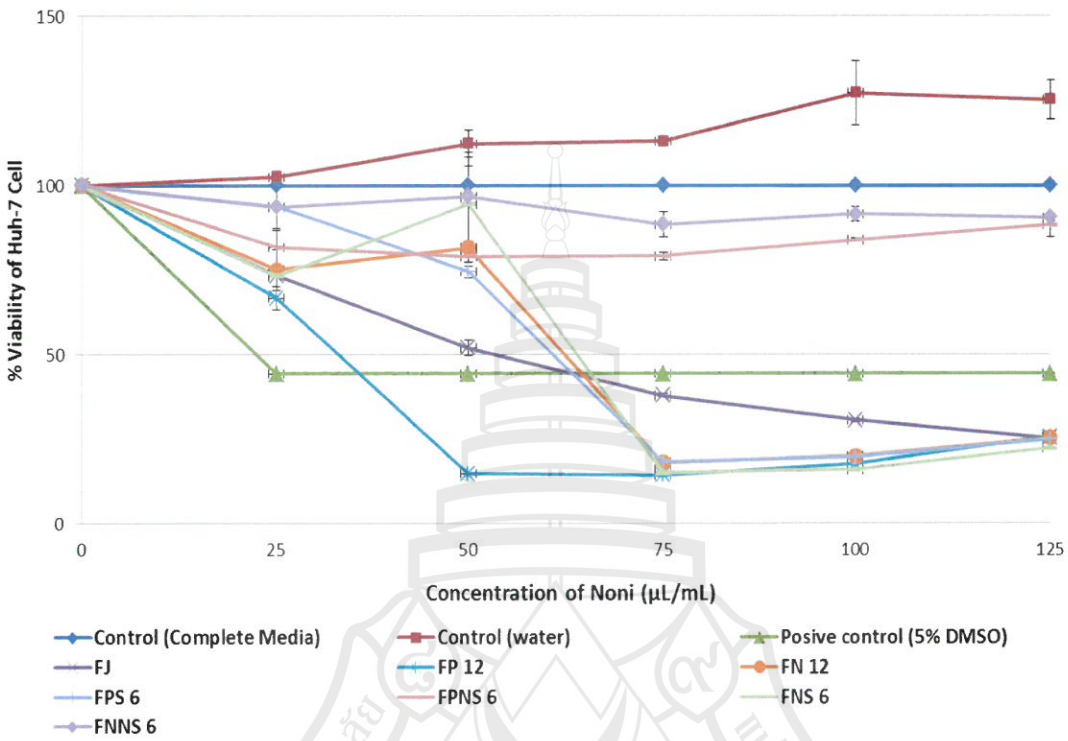
ผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับผลของความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (4.4) โดยพบว่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับด้วยน้ำลูกยอที่ความเข้มข้นระหว่าง 25-125 μL/mL เป็นเวลา 24 ชั่งโมง (รูปที่ 4.3) และ 48 ชั่วโมง (รูปที่ 4.4) และค่า IC50 (ตารางที่ 4.6) ของน้ำลูกยอที่หมัก 6 เดือน แบบมีน้ำตาลทั้งชนิดเชื้อบริสุทธิ์ (FPS 6))และเชื้อธรรมชาติ (FNS 6) มีค่าไม่แตกต่างจากน้ำลูกยอหมักด้วยเชื้อธรรมชาติเป็นเวลา 1 ปี (FN 12) และน้ำลูกยอสด โดยมีค่าเป็น 62.09 61.58 60.66 และ 57.14 μL/mL ตามลำดับ ส่วนน้ำลูกหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์เป็นเวลา 12 เดือนมีค่า IC50 ต่ำที่สุด ได้แก่ 36.52 μL/mL ซึ่งหมายความว่าน้ำลูกยอชนิด FN 12 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงสุด ซึ่งความเป็นพิษต่อเซลล์เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเซลล์ทั้งสองช่วงเวลา ได้แก่ 24 และ 48 ชั่วโมง

มีรายงานจากการทดลองที่ผ่านมา เกี่ยวกับความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ของ damnacanthal ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในน้ำลูกยอ พบว่า damnacanthal สามารถทำลายเซลล์ Hep G2 ได้ โดยค่า IC50 มีค่าเท่ากับ 4.2±0.2 μM (Garcı´a-Vilas และคณะ, 2015) ซึ่งมีความเป็นได้ว่าสาร damnacathal นี้เองที่ทำให้น้ำลูกยอทั้ง 5 ชนิดนี้มีความเป็นพิษ และเมื่อพิจารณาปริมาณสาร damnacanthal ในตัวอย่างพบว่า FJ FPS 6 และ FNS 6 มีค่าสูงกว่า FPNS 6 และ FNNS 6 (ตารางที่ 4.5) นอกจาก damnacathal แล้ว สารสำคัญในผลยอที่มีการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ได้แก่ rutin และ scopoletin อย่างไรก็ตามสารทั้งสองนี้มีความเป็นพิษต่ำกว่ามากเมื่อทดลองในเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) โดยค่า IC50 ของ rutin scopoletin และ damnacanthal มีค่าเป็น 600 416 และ 17.17 μg/mL ตามลำดับ ส่วนใน Hep G2 cell ค่า IC50 ของสารทั้งสามชนิดมีแนวโน้มเช่นเดียวกัน คือ 395 362.50 และ 23.63 μg/mL ตามลำดับ (Thani และคณะ, 2010) ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณของ scopoletin ในตัวอย่างน้ำลูกยอชนิดต่างๆ ซึ่งพบว่าน้ำลูกยอสดมีปริมาณสูงที่สุด ส่วนน้ำลูกยอหมักสูตรไม่มีการเติมน้ำตาลมีค่าต่ำที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับความเป็นพิษของตัวอย่างเหล่านี้

อย่างไรก็ตามรูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำลูกยอสูงขึ้น (125-750 μL/mL) พบว่าน้ำลูกยอทุกชนิดทำให้จำนวนเซลล์มะเร็งสูงขึ้น ซึ่งหมายความว่าการบริโภคน้ำลูกยอเกินขนาดอาจส่งเสริมการขยายตัวของเซลล์ ทั้งนี้ในการทดลองขั้นต่อไปจึงจำเป็นต้องศึกษาผลของน้ำลูกยอต่อเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ drug metabolism ทั้งความเข้มข้นในระดับต่ำและระดับสูงต่อไป



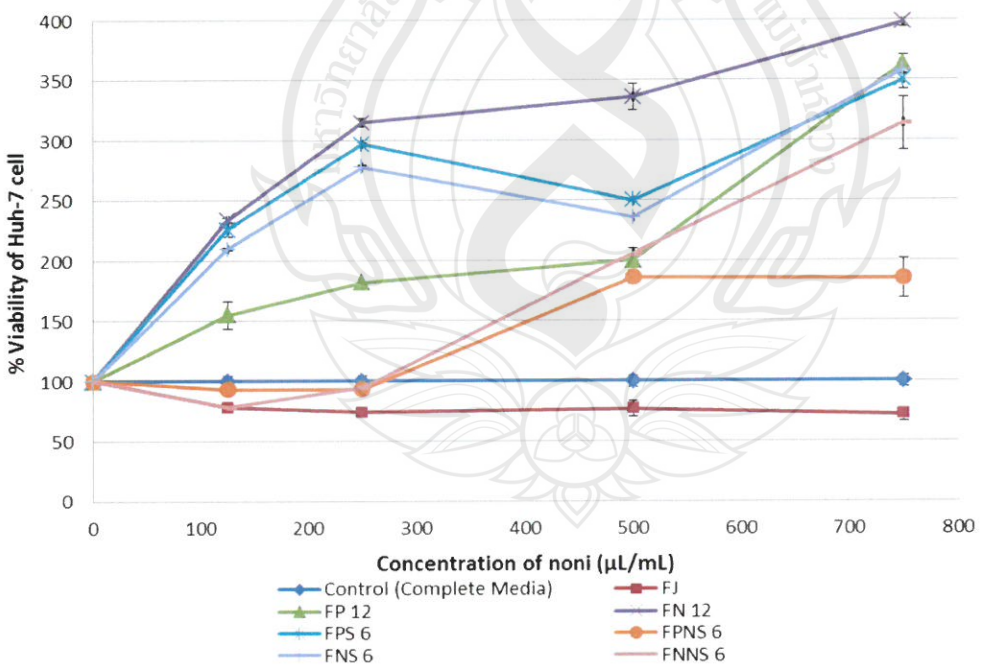
รูปที่ 4.3 ร้อยละการรอดชีวิตของ Huh-7 เซลล์ (% viability) เมื่อวิเคราะห์ด้วย MTT assay ภายหลังการเลี้ยงเซลล์ด้วยน้ำลูกยอชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นระหว่าง 25-125 µL/mL เป็นเวลา 24 ชม



รูปที่ 4.4 ร้อยละการรอดชีวิตของ Huh-7 เซลล์ (% viability) เมื่อวิเคราะห์ด้วย MTT assay ภายหลังการเลี้ยงเซลล์ด้วยน้ำลูกยอชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นระหว่าง 25-125 µL/mL เป็นเวลา 48 ชม

ตารางที่ 4.6 ค่า IC50 ของน้ำลูกยอชนิดต่างๆในเซลล์มะเร็งตับ Huh-7 ภายหลังการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

น้ำลูกยอ	IC50 (µL/mL)	Maximum inhibitory concentration (µL/mL)
FJ 5	57.14 ± 4.12	75.00
FP 12 4	36.52 ± 3.86	50.00
FN 12 1	60.66 ± 2.12	75.00
FPS 6 2	62.09 ± 1.30	75.00
FPNS 6 7	-	-
FNS 6 3	61.58 ± 2.87	75.00
FNNS 6 6	-	-



รูปที่ 4.5 ร้อยละการรอดชีวิตของ Huh-7 เซลล์ (% viability) เมื่อวิเคราะห์ด้วย MTT assay ภายหลังการเลี้ยงเซลล์ด้วยน้ำลูกยอที่ชนิดต่างๆที่ความเข้มข้นระหว่าง 125-750 µL/mL เป็นเวลา 48 ชม

4.3.2 การทดสอบการก่อกลายพันธุ์ของน้ำลูกยอ

เพื่อให้มั่นใจในความปลอดภัยของน้ำลูกยอในแง่ของการก่อกลายพันธุ์ ได้ทดสอบความสามารถในการก่อกลายพันธุ์ของน้ำลูกยอในเชื้อจุลินทรีย์ชนิด *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 โดยใช้เทคนิค Ames test โดยตัวอย่างของน้ำลูกยอที่ทำการศึกษา ได้คัดเลือกตัวอย่างที่มีกระบวนการผลิตสองแบบคือการหมักแบบเชื้อธรรมชาติที่เป็นกระบวนการผลิตโดยทั่วไปในประเทศไทย เปรียบเทียบกับน้ำลูกยอสด ผลการทดลองพบว่า น้ำลูกยอทั้งสองชนิดไม่มีการก่อกลายพันธุ์เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์กับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมน้ำลูกยอ ซึ่งสังเกตุได้จากปริมาณเชื้อ *S. typhimurium* ในตัวอย่างน้ำลูกยอสดทุกความเข้มข้น (25-100 μL/plate) ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีการเติมเอนไซม์ S9 ซึ่งเป็น co-factor ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสาร procarcinogen ไปเป็นสารก่อมะเร็งหรือ carcinogen ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมที่มีการเติมสารก่อกลายพันธุ์ ได้แก่ 4-nitro-o-phenylenediamine และ 2-Aminoanthracene มีปริมาณเชื้อสูงถึง 406 และ 589 histidine revertants/plate ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) จึงอาจกล่าวได้ว่าในการทดลองเบื้องต้นนี้น้ำลูกยอหมักด้วยเชื้อธรรมชาติไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อยีน หรือไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ของน้ำลูกยอสดและน้ำลูกยอหมักด้วยเทคนิค Ames test

ตัวอย่างน้ำลูกยอ	ปริมาณ histidine revertants/plate[1]	
	-S9*	+S9*
Spontaneous reversion rate**	78 ± 15[b]	70 ± 10[b]
น้ำลูกยอสดภายหลังการพาสเจอไรซ์ (μL)		
25	75 ± 7[b]	75 ± 12[b]
50	89 ± 3[b]	72 ± 16[b]
100	97 ± 11[b]	85 ± 10[b]
น้ำลูกยอหมักภายหลังการพาสเจอไรซ์ (μL)		
25	116 ± 33[b]	72 ± 10[b]
50	140 ± 27[b]	67 ± 12[b]
100	136 ± 8[b]	72 ± 4[b]
4-nitro-o-phenylenediamine	406 ± 36[a]	
2-Aminoanthracene		589 ± 152[a]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)

* Phenobarbital induced-S9 (Microsomal supernatant)

** จำนวนโคโลนีในเพลทที่ไม่มีการเติมน้ำลูกยอหรือสารก่อกลายพันธุ์

4.4 การทดสอบความสามารถในการต้านจุลินทรีย์

ทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในคน 5 ชนิด ได้แก่

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram positive)
2. *Bacillus subtilis* ATCC*6635*(Gram positive)
3. *Entrococcus faecalis* ATCC 51299(Gram positive)
4. *Escherichia coli* ATCC 25922(Gram negative)
5. *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603(Gram negative)

นำส่วนใสของตัวอย่างน้ำลูกยอภายหลังการปั่นเหวี่ยง มาทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ หรือ minimum inhibitory concentration (MIC) ด้วย

วิธี Microbroth dilution technique ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่า MIC ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* และ *K. pneumonia* มีค่าสูงกว่าแบคทีเรียแกรมลบตามความคาดหมาย เนื่องจากโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีความสามารถในการต่อต้านการซึมผ่านของสารได้สูงกว่า แต่อย่างไรก็ตามน้ำลูกยอทั้ง 7 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเหล่านี้ได้ทุกชนิด ซึ่งค่า MIC ของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกทั้งสามชนิดมีค่าเป็น 31.25 μL/mL ยกเว้นในน้ำลูกยอสด ที่ต้องใช้ความเข้มข้น 62.50 μL/mL จึงจะสามารถยับยั้ง *B. subtilis* ได้ครึ่งหนึ่ง และในตัวอย่างน้ำหมักที่ไม่มีการเติมน้ำตาล ค่า MIC มีค่าสูงถึง 250 μL/mL ส่วนในแบคทีเรียแกรมลบ MIC โดยส่วนใหญ่มีค่าเป็น 62.50 μL/mL ยกเว้น ในน้ำลูกยอสดและน้ำลูกยอที่หมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์และหมักเป็นเวลานาน 12 เดือน ที่มีค่า MIC ต่ำกว่า คือ 31.25 μL/mL และน้ำลูกยอหมักที่ไม่มีการเติน้ำตาล ซึ่งมีค่า MIC สูงถึง 250 μL/mL

จากนั้นนำความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC และที่ช่วงความเข้มข้นสูงกว่า มาทดสอบค่า minimum bactericidal concentration (MBC) โดยการ streak ตัวอย่างลงบนอาหาร TSA พบว่าน้ำลูกยอทุกชนิดมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทั้งห้าชนิด แต่ประสิทธิภาพแตกต่างกันไป (ตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.7) โดยตัวอย่างน้ำลูกยอที่มีการหมักโดยใช้น้ำตาลทั้งชนิดที่หมักแบบเชื้อธรรมชาติและเชื้อบริสุทธิ์มีค่า MBC เท่ากับ 31.25 μL/mL ส่วนตัวอย่างที่หมักแบบไม่มีน้ำตาลมีค่า MBC เท่ากับ 250 μL/mL หรือมีค่าเท่ากับค่า MIC ของมันนั่นเอง ยกเว้นน้ำลูกยอสดที่ค่า MBC มีค่าสูงกว่า MIC อย่างมาก (มีค่าเป็น 250 μL/mL และ 500 μL/mL ในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบตามลำดับ) โดยสรุปแล้วจะเห็นว่าประสิทธิภาพของน้ำลูกยอสดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) ไม่แตกต่างจากน้ำลูกยอหมัก แต่ความสามารถในการทำลาย (MBC) มีน้อยกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำลูกยอหมักมีฤทธิ์เป็น bactericidal ส่วนน้ำลูกยอสดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบบ dose dependent antimicrobial ส่วนเมื่อเปรียบเทียบกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน พบว่า การหมักแบบใช้เชื้อบริสุทธิ์และแบบธรรมชาติมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน แต่การหมักที่มีการเติมน้ำตาลจะให้ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่า ทั้งนี้เมื่อพิจารณาสมบัติทางเคมีของน้ำลูกยอเหล่านี้ พบว่า ตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์สูง เป็นตัวอย่างที่มีองค์ประกอบของสารโพลีฟีนอลสูงด้วยเช่นกัน (ตารางที่ 4.4) นอกจากนี้ตัวอย่างน้ำลูกยอหมักที่ไม่มีการเติมน้ำตาลมีประสิทธิภาพต่ำกว่ามาก จึงอาจกล่าวได้ว่านอกจากปริมาณสารโพลีฟีนอลแล้ว การยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียของน้ำลูกยอเป็นผลมาจากความเป็นกรด (ตารางที่ 4.3) ซึ่งมีรายงานผลการวิจัยโดย Glang และคณะ (2013) เมื่อเปรียบเทียบน้ำลูกยอที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลาย 1 M phosphate buffer pH 7.4 ให้น้ำลูกยอมีความเป็นกลาง กับน้ำลูกยอที่มีความเป็นกรดสูงตามปกติ ต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ที่พบในช่องปาก พบว่าน้ำลูกยอที่มีค่า

พีเอชเป็นกลาง ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้เลย อย่างไรก็ตามใรการทดลองที่มาการสกัดเฉพาะสารสำคัญมาทดสอบ ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *Staphylococcus aureus* พบว่าผงยอสกัดสามารถยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิดได้โดยมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อ *S. aureus* สูงกว่า แต่ในความเข้มข้นที่สูง ได้แก่ 10 mg/mL (Candida และคณะ 2014) ดังนั้นประสิทธิภาพของการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์น่าจะเป็นผลมาจากทั้งสองปัจจัย

โดยสรุปสำหรับแบคทีเรียแกรมบวก น้ำลูกยอส่วนใหญ่มีค่า MIC เท่ากับ MBC จึงจัดว่ามีฤทธิ์เป็น bactericidal ส่วนในแบคทีเรียแกรมลบ ค่า MIC สูงกว่าในแบคทีเรียแกรมบวก และสำหรับตัวอย่างที่มีค่า MIC เท่ากับ MBC จัดว่ามีฤทธิ์เป็น bactericidal เช่นกัน ส่วน น้ำลูกยอสดมีค่า MBC สูงกว่า MIC จึงมีฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบบ dose dependent antimicrobial คือ ที่ความเข้มขันสูงกว่าจะฆ่าเชื้อได้แต่ในความเข้มข้นต่ำกว่าจะมีฤทธิ์ยังยั้งเชื้อเท่านั้น

ตารางที่ 4.8 ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของน้ำลูกยอที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Minimum inhibitory concentration, MIC)

น้ำลูกยอ	ความเข้มข้น (**µL/mL**)				
	แบคทีเรียแกรมบวก			แบคทีเรียแกรมลบ	
	S. aureus	*B. subtilis*	*E. faecalis*	*E. coli*	*K. pneumoniae*
FJ	31.25	62.50	31.25	31.25	62.50
FP 12	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25
FN 12	31.25	31.25	31.25	62.50	62.50
FPS 6	31.25	31.25	31.25	62.50	31.25
FPNS 6	250	250	250	250	250
FNS 6	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25
FNNS 6	250	250	250	250	250

ตารางที่ 4.9 ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำลายหรือฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Minimum bactericidal concentration, MBC)

น้ำลูกยอ	ความเข้มข้น (µL/mL)				
	แบคทีเรียแกรมบวก			แบคทีเรียแกรมลบ	
	S. aureus	*B.subtilis*	*E. faecalis*	*E. coli*	*K. pneumoniae*
FJ	250	250	250	500	500
FP 12	31.25	31.25	62.50	31.25	62.50
FN 12	31.25	31.25	31.25	62.50	62.50
FPS 6	31.25	31.25	62.50	62.50	62.50
FPNS 6	250	250	250	250	250
FNS 6	31.25	31.25	31.25	62.50	62.50
FNNS 6	250	250	250	250	250

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

น้ำลูกยอที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ น้ำลูกยอสด น้ำลูกยอหมักด้วยกระบวนการแตกต่างกัน ได้แก่ การหมักแบบที่มีการใช้เชื้อบริสุทธิ์และการหมักแบบเชื้อธรรมชาติ โดยการหมักทั้งสองแบบสามารถแบ่งได้เป็นชนิดที่มีและไม่มีการใช้น้ำตาล และระยะเวลาหมักที่ 6 และ 12 เดือน

เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำลูกยอชนิดต่างๆ พบว่า ภายหลังการหมักมีปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น ในตัวอย่างที่มีการหมักแบบใช้น้ำตาล พบว่ามีปริมาณน้ำตาลสูงกว่าน้ำลูกยอสดเนื่องจากมีการเติมน้ำตาลในกระบวนการหมัก ปริมาณโซเดียมสูงขึ้นเล็กน้อย ส่วนโพแทสเซียมมีปริมาณลดลงเล็กน้อย สำหรับคุณภาพทางด้านเคมี พบว่าปริมาณกรดสูงขึ้นภายหลังการหมัก โดยไม่มีความแตกต่างกันมากนักระหว่างการใช้เชื้อบริสุทธิ์และเชื้อธรรมชาติ ซึ่งหมายความว่ากระบวนการหมักกรดแลคติกไม่แตกต่างกัน ปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมดในน้ำลูกยอหมักมีค่าเพิ่มขึ้นเกือบสองเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำลูกยอสด และมีผลทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อแสดงด้วยค่า FRAP สูงกว่าน้ำลูกยอสด นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าน้ำลูกยอหมักมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิดที่ศึกษา และมีค่า MIC ต่ำกว่าน้ำลูกยอสด ซึ่งตัวอย่างน้ำลูกยอเกือบทุกชนิดมีฤทธิ์เป็น bactericidal ยกเว้นน้ำลูกยอสด ซึ่งมีฤทธิ์เพียงยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เท่านั้น โดยมีผลในการยับยั้งและทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ สำหรับความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งนั้น น้ำลูกยอหมักชนิดที่มีการเติมน้ำตาลและน้ำลูกยอสดมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็งสูงที่สุด ส่วนน้ำลูกยอหมักที่ไม่มีการเติมน้ำตาลไม่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้เลย เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านมะเร็ง ได้แก่ damnacanthal และ scopoletin ของน้ำลูกยอหมักแบบมีการใช้น้ำตาลและน้ำลูกยอสด ทั้งชนิดใช้เชื้อบริสุทธิ์และเชื้อธรรมชาติ พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างจกน้ำลูกยอสดมากนัก แต่ปริมาณสารสำคัญสูงที่สุดพบในตัวอย่างที่ผ่านการหมักเป็นเวลานาน 12 เดือน

จากผลการวิจัยที่ได้พบว่า น้ำลูกยอหมักทั้งชนิดที่ใช้เชื้อบริสุทธิ์และเชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เนื่องจากไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรค ปริมาณเมทานอลต่ำกว่าค่ามารตรฐานที่กำหนดและไม่มีการก่อกลายพันธุ์ ส่วนประโยชน์ต่อสุขภาพใน

ด้านของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ พบว่าน้ำลูกยอหมักทั้งชนิดเชื้อบริสุทธิ์และเชื้อธรรมชาติมีประสิทธิภาพสูงกว่าน้ำลูกยอสด อย่างไรก็ตาม ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับกลับไม่แตกต่างกันระหว่างน้ำลูกยอสดและน้ำลูกยอหมัก ดังนั้นการทดลองในอนาคตควรขยายผลการศึกษาในสัตว์ทดลอง เพื่อยืนยันผลดังกล่าว และเพื่อศึกษาผลข้างเคียงของการบริโภคน้ำลูกยอ หากมีการรับประทานร่วมกับการรักษาด้วยยา และเพื่อให้ทราบกลไกการยังยั้งเซลล์มะเร็งต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ASTV ผู้จัดการออนไลน์. 2554. เภสัช มช.ช่วยไขข้อข้องใจ 5 ประการ ว่าด้วย "น้ำหมักชีวภาพ". สืบค้นจาก http://www.manager.co.th/Campus/ViewNews.aspx?NewsID=9530000016372 (1 ตุลาคม 2554)

Ames B., McCann J., Yamasaki E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Research 31, p. 347-364.

Akihisa, T., Matsumoto, K. , Tokuda, H., Yasukawa, K., Seino, K.-I., Nakamoto, K., Kuninaga, H., Suzuki, T. and Kimura, Y. 2007. Anti-inflammatory and Potential Cancer Chemopreventive Constituents of the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). *J. Nat. Prod.(70).* 754-757

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis OF THE Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.

BAM. 2001. Bacteriological Analytical Manual Online. Available http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm .

Bramorski, A., Cherem da Rosa, A., Marmentini, C. P., Torresani, J., Mezadri, T., Costa de Almeida Silva, A. 2010. Total polyphenol content and antioxidant activity of commercial Noni (Morinda citrifolia L.) juice and its components. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences (46): 651-656.

Burke,M.D. and Mayer,R.T. (1974). Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos* (2): 583-588.

Bussmann, R. W., Hennig, L., Giannis, A., Ortwein, J., Kutchan, T.M. and Feng, X. (2013). Anthraquinone Content in Noni (Morinda citrifolia L.) Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (2013): 5 pages.

Candida, T., Pereira de França, J., Lucilvânia Fonseca Chaves, A., Lopes, F A R., Gaiba, S., Kersul do Sacramento, C., Ferreira, M L. and Pereira de França L. 2014. Evaluation of antitumoral and antimicrobial activity of Morinda citrifolia L. grown in Southeast Brazil. Acta Cirúrgica Brasileira (29) (supl. 2): 10-14.

Chan-Blancoa, Y., Vaillantb, F., Perezb, M.A., Reynesc, M., Brillouetc, J.-M., Brat. (2006). The noni fruit (Morinda citrifolia L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. Journal of Food Composition and Analysis (19). 645–654.

Di Monte, D., Ross, D., Bellomo, G., Eklow, L., Orrenius, S. (1984). Alterations in intracellular thiol homeostasis during metabolism of menadione by isolated hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys* (235): 334-342.

Esterbauer, H. and Cheeseman K. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* (186): 407-412.

European Commission. Scientific Committee of Food. (2002). Opinion of the Scientific Committee on Food of Tahitian Nonis Juice. SCF/CS/DOS/18 ADD 2. Belgium

Farine, J. P., Legal, L., Moreteau, B., and Le Quere, J. L. (1996). Volatile components of ripe fruits of *Morinda citrifolia*and their effects on Drosophila. *Phytochemistry.* (41):433-438.

Garcı´a-Vilas J. A., Quesada, A.R. and Medina, M. A. 2015. Damnacanthal, a noni anthraquinone, inhibits c-Met and is a potent antitumor compound against Hep G2 human hepatocellular carcinoma cells. Scientific Reports.(5): 1-9.

Glang, J., Falk, W., and Westendorf, J. 2013. Effect of Morinda citrifolia L. fruit juice on ngivitis/periodontitis. Modern research in inflammation. 2(2): 21-27.Griffith, O. W.(1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* (106): 207-212.

Habig,W.H., Pabst,M.J., and Jakoby,W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* (249): 7130-713.

Hirazumi, A., Furusawa, E., Chou, S. C., and Hokama, Y. (1996). Immunomodulation contributes to the anticancer activity of morinda citrifolia (noni) fruit juice. *Proc West Pharmacol Soc* (39):7-9.

Kamiya, K., Tanaka, Y., Endang, H., Umar, M., and Satake, T. (2004). Chemical constituents of Morinda citrifolia fruits inhibit copper-induced low-density lipoprotein oxidation. *J Agric Food Chem* (52;19):5843-5848.

Levand, O. and Larson, H. O. (1979). Some chemical constituents of Morinda citrifolia. *Planta Med* (36;2):186-187.

Locher, C. P., Burch, M. T., Mower, H. F., Berestecky, J., Davis, H., Van Poel, B., Lasure, A., Vanden Berghe, D. A., and Vlietinck, A. J. (1995). Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* (49;1):23-32.

Lowry, O. H., Rosebrough N.J., Farr A. L., Randall R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* (193): 265-275.

Mohd Zin, Z., Abdul-Hamid, A., Osman, A. (2002). Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (Morinda citrifolia L.) root, fruit and leaf. Food Chemistry (78): 227–23.

Nualsanit, T., Rojanapanthu, P. Gritsanapan, W., Lee, S-H, Lawson, D. and Baeka, S. J. (2013). Damnacanthal, a Noni component, exhibits anti-tumorigenic activity in human colorectal cancer cells. J Nutr Biochem. 23(8); 915-923.

Nelson, S.C. and Elevitch, C.R. 2006. Noni: The Complete Guide for Consumers and Growers. Colorcraft Ltd., Hong Kong.Peerzada, N., Renaud, S., and Ryan, P. (1990). Vitamin C and elemental composition of some bushfruits. *J Plant Nutrition* (13):787-793.

Prochaska, H. J., & Santamaria, A. B. (1988). Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. Analytical Biochemistry (169): 328–336.

Prochaska, H. J., Santamaria, A. B., & Talalay, P. (1992). Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. The Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 89, 2394–2398.

Shori, A. B. (2013). Antioxidant activity and viability of lactic acid bacteria in soybean-yogurt made from cow and camel milk. Journal of Taibah University for Science (7):4 :202-208.

Slinkard, K. and Slingleton, L.V. (1997). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods . *Am. J. Enol. Vitic.* (28):49-55.

Solomon, N. (1999). The Noni Phenomenon. Direct Source Publishing, Utah.

Thani, W., Vallisuta, O., Siripong, P. and Ruangwises, N. 2010. Anti-proliferative and antioxidative activities of Thai noni/Yor (Morinda Citrofolia Linn.) leaf extract. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 41(2): 482-489.

Tieze F. (1969). Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissue. *Anal. Biochem.* (27): 502-522.

Wang, C.Y., Ng, C.C., Su, H., Tzeng, W.S., and Shyu, Y.T. 2009, Probiotic potential of noni juice fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. International Journal of Food Sciences and Nutrition (60) s6 : 98-106.

Wang, M. Y., West, J.B., Jensen, J.C., Nowicki, D., Chen, S., Palu, K.A. and Anerson, G. (2002a). *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacol Sin;* 23 (12): 1127-1141.

Wang, M. Y., Nowicki, D., and Anderson, G. (2002b). Protective effect of *Morinda citrifolia* on hepatic injury induced by a liver carcinogen. *93rd Annual Meeting, American Association for Cancer Research*, 6-10.

Wang, M.Y. and Su, C. (2001) Cancer preventive effect of Morinda citrifolia (Noni). *Ann NY Acad Sci* (952):161–168.

ภาคผนวก ก.

ก 1. กระบวนการผลิตน้ำลูกยอหมักแบบใช้เชื้อบริสุทธิ์

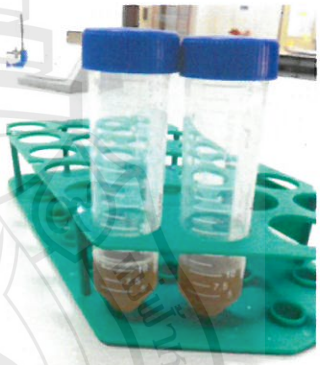
1. คัดผลยอที่แก่จัดปราศจากโรคและแมลง ล้างผลยอด้วยน้ำสะอาด

2. แช่ผลยอในน้ำเจือจางด่างทับทิม นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่าอีก 2 ครั้ง

3. หั่นผลยอเป็นชิ้นเล็กๆ

4. ต้มผลยอที่ถูกหั่นเป็นชิ้นเล็กๆกับน้ำอ้อยป่น และน้ำที่ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

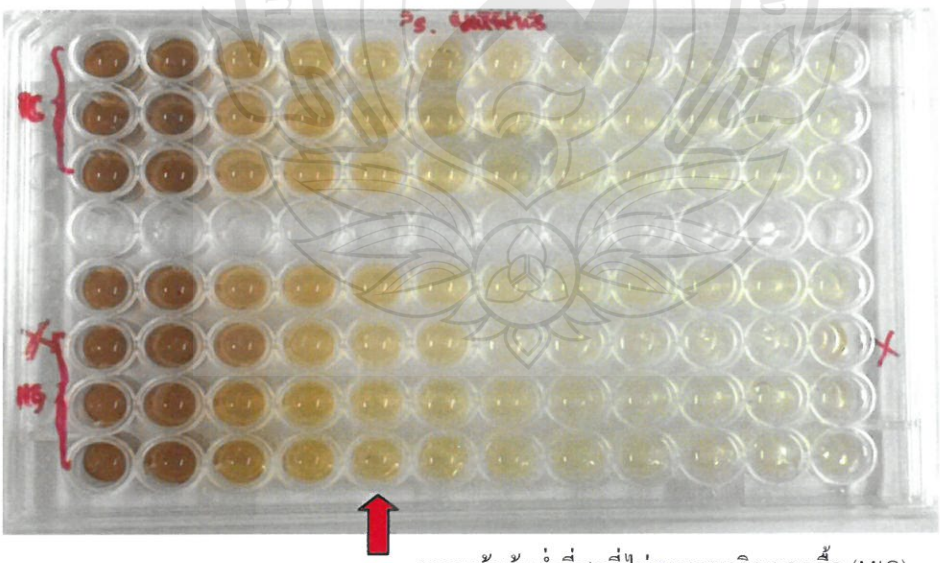
5. เทใส่ถังหมัก ปิดฝาให้สนิทแล้วทิ้งไว้ให้เย็น
6. เตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์



7. เติมหัวเชื้อบริสุทธิ์ แล้วหมักที่อุณหภูมิห้อง นาน 6 เดือน

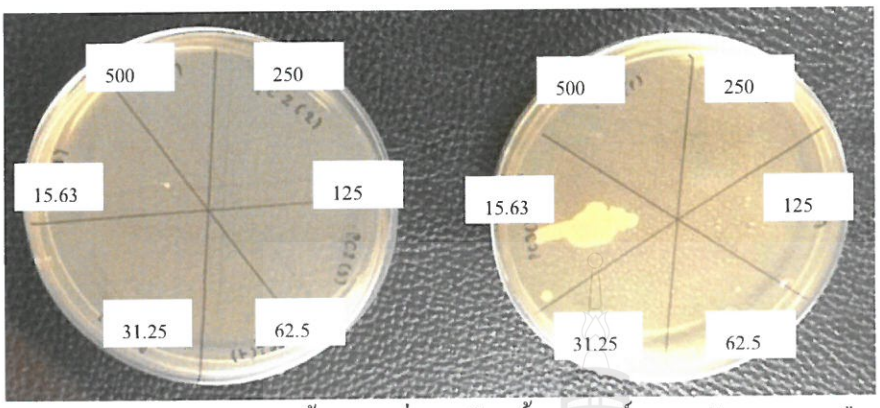
8. การเปลี่ยนแปลงของน้ำลูกยอหลังการหมักเป็นระยะเวลา 3 เดือน

500 250 125 62.5 31.25 15.63 7.81 3.90 1.95 0.975 0.49 0 μL/mL

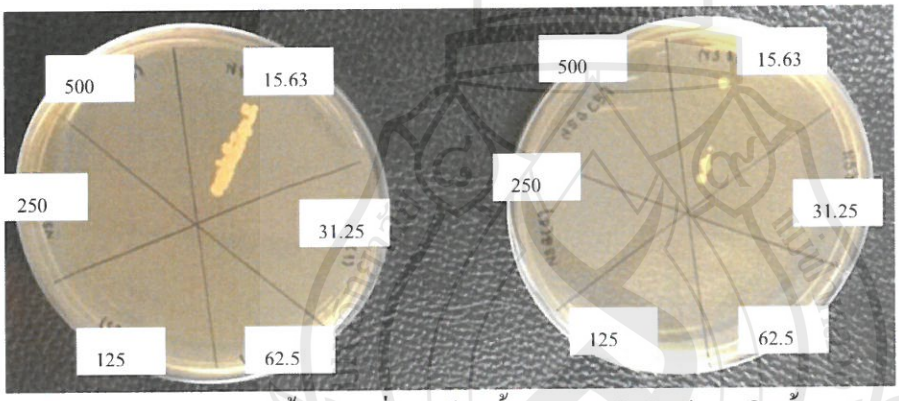


ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ (MIC)

ก 2. MIC ของน้ำลูกยอเมื่อทดสอบในเชื้อ *S. aureus*



ก 3. การศึกษา MBC ของน้ำลูกยอที่ผลิตด้วยเชื้อบริสุทธิ์และหมักนาน 12 เดือน (FP 12) ในเชื้อ *S. aureus*



ก 4. การศึกษา MBC ของน้ำลูกยอที่ผลิตด้วยเชื้อธรรมชาติชนิดมีการเติมน้ำตาลและหมักนาน 6 เดือน (FNS 6) ในเชื้อ *S. aureus*

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล นางสาว ณัฏยา คนซื่อ
   Miss Nattaya Konsue
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3400100966081
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
   สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร
   มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง 333 ม. 1 ต. ท่าสุด
   อ. เมือง จ. เชียงราย 57100
   หมายเลขโทรศัพท์ 053-91-6738 โทรสาร 053-91-6739
   E-mail knattaya@yahoo.com
5. ประวัติการศึกษา PhD. (Food Toxicology)
   University of Surrey (2010)
   วท.ม.(วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร)
   มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (2545)
   ปร.บ. (เทคโนโลยีอาหาร)
   มหาวิทยาลัยขอนแก่น (2541)

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture) การทดลองในสัตว์ทดลอง การเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของสารเคมี ความสามารถในการป้องกันมะเร็งของสารสกัดจากพืช

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

   7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย :

   - ผลของการดื่มชาเป็นระยะเวลาสั้นต่อกระบวนการก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง

- การเปลี่ยนแปลงฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ของสารก่อมะเร็งที่พบในอาหารโดยชาสกัด
- การศึกษากระบวนการแปรรูปชาสับปะรดที่เหมาะสม

7.2 งานวิจัยที่กำลังทำ :

ชื่อข้อเสนอการวิจัย	แหล่งทุน	สถานภาพในการทำวิจัย
ผลของการดื่มชาเป็นระยะเวลาสั้นต่อกระบวนการก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง	มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง	50%
การเปลี่ยนแปลงฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ของสารก่อมะเร็งที่พบในอาหารโดยชาสกัด	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ	40%
การพัฒนาเครื่องดื่มมะเขือเทศเข้มข้นเพื่อสุขภาพ	บริษัทบุญรอดบริวเวอรี จำกัด	40%
การศึกษากระบวนการแปรรูปชาสับปะรดที่เหมาะสม	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ	100%
Development of gluten free granola bar from colored rice	สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร	100%

การเผยแพร่ผลงาน

C. Ioannides and **N. Konsue** (2015) **A principal mechanism for the cancer chemopreventive activity of phenethyl isothiocyanate is modulation of carcinogen metabolism**. Drug metabolism reviews. Early online 1-18.

N. Konsue, S. Yimthiang and W. Kwanhian (2015) **Antibacterial activity of fresh and fermented Morinda citrifolia fruit juice.** 17th Food Innovation Asia Conference 2015: innovative ASEAN food research towards the world. Bangkok, Thailand. 18-19 June 2015: 472-477.

A. R. F. Ahmad, N. M. Noor and **N. Konsue** (2014) **Induction of epoxide hydrolase, glucuronosyl transferase and sulfotransferase by phenethyl isothiocyanate in male Wistar albino rats**. BioMed Research International. 391528.

T. Patthanawiboon and **N. Konsue** (2014) **Mutagenicity and/or Anti-mutagenicity of Noni and Noni Products by Ames test.** Proceedings of 18th World Congress on Clinical Nutrition 2014: Agriculture, Food and Nutrition for Health and Wellness, Ubon Ratchathani, Thailand: 1-6.

N. Konsue and C. Ioannides (2008) **Tissue differences in the modulation of rat cytochromes P450 and phase II conjugation systems by dietary doses of phenethyl isothiocyanate**. *Food Chem. Tox.* (46): 3677-3683.

N. Konsue, J. Kirkpatrick, N. Kuhnert, L. J. King and C. Ioannides (2009) **Repeated oral administration modulates the pharmacokinetic behavior of the chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate in rats**. *Mol. Nutr. Food Res.* (53): 1-7.

N. Konsue and C. Ioannides (2010) **Modulation of carcinogen-metabolising cytochromes P450 in human liver by the chemopreventive phytochemical phenethyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables**. *Toxicology* : in press.

C. Ioannides, N. Hanlon and N. Konsue (2010) **Isothiocyanates: A chemical class of potential nutraceuticals**. *The open Nutracueticals Journal* (3): 55-62.

N. Konsue and C. Ioannides (2010) **Phenethyl isocyanate is not the metabolite of phenethyl isothiocyanate responsible for mechanism-based inhibition of cytochrome P450**. *Arch Toxicol*: in press.

N. Konsue and C. Ioannides (2008) **Effect of phenethyl isothiocyanate (PEITC) on the urinary excretion of mutagens in rats treated with IQ (2-amino-3-methyl-3H-imidazo[4,5-*f*] quinoline).** The 45th Congress of the European Societies of Toxicology. *Toxicology Letters* (180), supplement1:S109.

N. Konsue and C. Ioannides (2008) **Influence of phenethyl isothiocyanate (PEITC) on carcinogen metabolising enzymes in human liver: Studies with precisioncut slices.** The 45th Congress of the European Societies of Toxicology. *Toxicology Letters* (180), supplement1:S109.

N. Konsue and C. Ioannides (2008) ***In vitro* study of the effect of PEITC on cytochrome P450 and phase II enzymes activity utilizing precision-cut liver slice** The 45th Congress of the European Societies of Toxicology. *Toxicology Letters* (180), supplement1:S109.

N. Konsue and C. Ioannides (2007) **Chemoprevention effect of phenethyl isothiocyanate.** Proceedings of the Annual Congress of The British Toxicology Society. Toxicology (240): 184-185.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ - ผู้ร่วมโครงการวิจัย
2. ชื่อ - นามสกุล นางสุภาภรณ์ ยิ้มเที่ยง
   Mrs Supaporn Yimtiang
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
   สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์
   มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
   หมายเลขโทรศัพท์ 075-67-2190 โทรสาร 0-7567-2106, 0-7538-4000 ต่อ 2106
   E-mail ksupapor@wu.ac.th
5. ประวัติการศึกษา PhD. (Industrial Toxicology)
   University of Surrey (2011)
   วท.ม. (พิษวิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล
   วท.บ. (สาธารณสุขศาสตร์)
   อาชีวอนามัยและความปลอดภัย
   มหาวิทยาลัยมหิดล
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   สารพิษในสิ่งแวดล้อมและอุตสาหกรรม กลไกการเกิดพิษระดับโมเลกุล

การเผยแพร่ผลงาน

ชีพสุมน วิบูลย์วรกุล มณฑล เลิศคณาวนิชกุล ปนัดดา พิบูลย์ สุภาวดี ศิลป์นรประสาธน์ สุภาภรณ์ ยิ้มเที่ยง. **การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และวิเคราะห์หาสารโลหะหนักในผลิตภัณฑ์**

สุขภาพชุมชน วารสารการส่งเสริมสุขภาพและอนามัยสิ่งแวดล้อม Volume 32 Number 3 Pages 96

Piyachaturawat P, Kongsawat S, Jariyawat S. **Inhibition on hepatobiliary excretion of methymercury by a choleretic phloracetophenone in rats.** FASEB JOURNAL, 2004: 18(4): A696-A697 Suppl. S MAR 23

S. Yimthaing, G. Gordon Gibson, Nick Plant, Kathryn E. Plant. **Transcription regulation of the nuclear import gene karyopherin alpha 3 through multiple VDAE and PPRE elements.** Toxicology, Volume 253, Issues 1-3, 20 November 2008, Pages 11-12

Kongsawat and Piyachaturawat P. **Modulation of hepatic excretion of methylmercury by Phloracetophenone in rat**, The 1st Environmental Science, Technology and Mangement Conference, Chulabhorn Research Institute, 2002:33

S.yimthaing, G. Gordon Gibson, Nick Plant, Kathryn E. Plant. **Regulation of KPNA gene.** British Toxicology Society, 2009:23

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว วิยดา กวานเหียน

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Wiyada Kwanhian

2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์หลักสูตรเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

3. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

   หลักสูตรเทคนิคการแพทย์ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ เลขที่ 222 ต.ไทยบุรี อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช 80160

   หมายเลขโทรศัพท์ 075-672139, 2104, 2105

   โทรสาร 075-672106

Email: kwiyada@wu.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ปี พ.ศ.	วุฒิการศึกษา	มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2536 – 2539	วทบ. (เทคนิคการแพทย์)	ม.ขอนแก่น
พ.ศ. 2543 - 2545	วทม. (จุลชีววิทยาทางการแพทย์)	ม.ขอนแก่น
พ.ศ. 2550 - 2555	ปรด.(จุลชีววิทยาทางการแพทย์)	ม.ขอนแก่น

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

Medical Virology, Infectious diseases

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

วิยดา กวานเหียน. **เครื่องจำแนกแบคทีเรียอัตโนมัติในระบบแมสสเปกโทรเมตรีชนิด MALDI-TOF**. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด. 2556; 25(2): 120-131.

Kwanhian W. Epidemiology of *Burkholderia pseudomallie* in Nakhon Si Thammarat and nearby area. Journal of the Medical Technologist Association of Thailand 2006; 34(3), 1667-74.

Kwanhian W., Lenze D., Alles J., Motsch N., Barth S., Doll C., et al. **MicroRNA-142 is mutated in about 20% of diffuse large B-cell lymphoma**, Cancer Medicine 2012; 1(2): 141–155

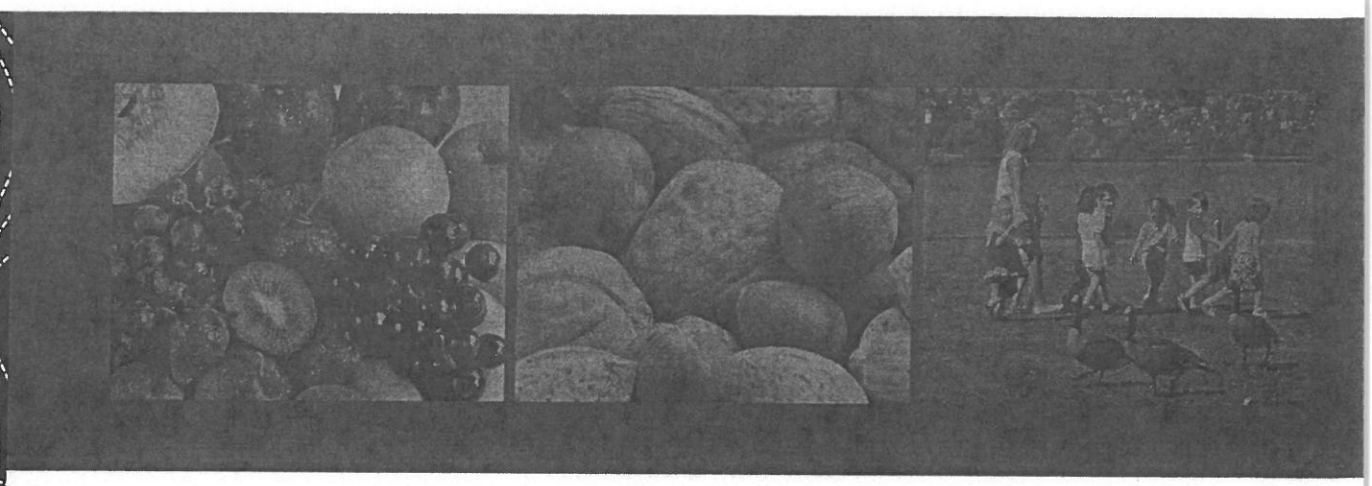
Kwanhian W., Aeanleng C., Kanjantho P., Panjakul Y. **Antibiotic susceptibility pattern of Extended Spectrum B- Lactamase producing bacteria**, 31th congress on Science and technology of Thailand, 2006.

Kwanhian W., Namwat W., Lulitanond V. **Bio-informatic prediction of herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript microRNA and their mRNA neurotransmitter targets**. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Helsinki, Finland, 16 - 19 May 2009

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

N. Konsue, S. Yimthiang and W. Kwanhian (2015) **Antibacterial activity of fresh and fermented Morinda citrifolia fruit juice.** 17th Food Innovation Asia Conference 2015: innovative ASEAN food research towards the world. Bangkok, Thailand. 18-19 June 2015: 472-477.

T. Patthanawiboon and **N. Konsue** (2014) **Mutagenicity and/or Anti-mutagenicity of Noni and Noni Products by Ames test.** Proceedings of 18th World Congress on Clinical Nutrition 2014: Agriculture, Food and Nutrition for Health and Wellness, Ubon Ratchathani, Thailand: 1-6.



18th World Congress on Clinical Nutrition (WCCN 2014)

การประชุมวิชาการระดับโลก ครั้งที่ ๑๘: โภชนาการคลินิค (๒๕๕๗)

Agriculture, Food and Nutrition for Health and Wellness

Proceedings

December 1-3, 2014
Sunee Grand Hotel & Convention Center
Ubon Ratchathani, Thailand

Ubon Ratchathani University
International College of Nutrition
Faculty of Medicine, Thammasat University
Center of Excellence in Applied Thai Traditional Medicine Research

CEATMR

TABLE OF CONTENTS

Mutagenicity and/or Anti-mutagenicity of Noni and Noni Products by Ames Test

Tanyong Phatthanawiboon[a] and Nattaya Konsue[a*]
[a] Food Technology Program, School of Agro-Industry, Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57100, Thailand
* Corresponding email: nattaya.kon@mfu.ac.th

ABSTRACT

Noni (*Morinda citrifolia* L., Rubiaceae) has been used as a folk medicine for decades. Despite being consumed mostly in Thailand as a fermented juice there is no evidence showing that fermentation can enhance therapeutic effect of Noni when compare to fresh juice. In this study, fresh and fermented noni juice were prepared in our laboratory and analyzed for their total phenolic content. Consequently, the mutagenicity and/or anti-mutagenicity effects were evaluated by Ames test, employing bacteria *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 strains, with and without S9 activation system. Preliminary study showed that both bacteria strains TA98 and TA100 demonstrated suitable characteristics for Ames test as determined by histidine requirement, rfa mutation and R-factor. However, only TA98 was chosen for further study due to its superior viability. Study of mutagenicity and/or anti-mutagenicity of samples were conducted using 4-nitro-o-phenylenediamine (NPD) and 2-aminoanthracene (2AA) as positive controls in the absence and presence of S9 respectively. No toxicity was evident in both fresh and fermented noni juice as indicated by comparable number of histidine revertants per plate being 70, 75 and 72 histidine revertants per plate in control, fresh and fermented juice respectively. The second study revealed that fresh and fermented noni juice inhibited the histidine revertants per plate in a dose dependent manner (with and without S9) when compare with positive controls. This can be concluded that fresh noni juice and fermented noni juice have similar mutagenicity inhibition effect. It is believed to be due to an equal value of total phenolic content presented in both samples being 46.83 and 45.05 mg GAE/ml for fresh and fermented juice respectively. Nevertheless, actual bioactive compounds that responsible for these findings should be further studied.

Keywords: Ames test, Mutagenicity, Noni, Fermentation

INTRODUCTION

Morinda citrifolia, commonly known as noni, is a widely distributed tropical tree. It grows on the islands of the South Pacific, Southeast Asia, Central America, Indian subcontinent, and in the Caribbean. The fruit and leafs of this tree have a history of using for food and health promotion (West et al., 2011). Noni products are marketed as botanical dietary supplements for health benefits. Noni contains many phytochemicals including anthraquinones, flavonoid, polysaccharide, glycoside, iridoids, lignans, and triterpenoids. Compounds such as scopoletin, rutin, ursolic acid, β-sitosterol, asperuloside, and

damnacanthal are considered as key compounds of noni fruits (Chan-Blanco et al., 2006). Previously, *in vitro* and *in vivo* studies reported that fresh noni juice, extracts, or isolated biological compounds rendered health benefits in terms of scavenging of free radicals, anti-mutagenicity, anti-carcinoma activity, anti-clastogenic activity, inhibition of low-density-lipoprotein oxidation, anti-inflammatory activity, blood purification, stimulation of the immune system, regulation of cell function, and regulation of cholesterols (Yang et al., 2007). Indeed, a decade ago, the European Union has given noni juice the status of 'novel food' (SCF, 2002). Noni juice is now used in Europe as a nutraceutical to treat chronic conditions such as arthritis, cancer, cardiovascular disease and diabetes. However, despite being consumed mostly in Thailand as a fermented juice there is no evidence showing that fermentation can enhance therapeutic effect of noni compared to the fresh juice.

Mutation is an important factor for carcinogenesis. Preventing the biotransformation of pro-carcinogens to form ultimate carcinogen occurring in the present of S9 metabolic activation can decrease the rate of mutation. Ames test is one of the model methods developed to investigate mutagenicity modulation. Using of the Ames test is based on the assumption that any substance being mutagenic for the bacteria, *Salmonella typhimurium*, may also turn out to be a carcinogen. The *Salmonella* is specifically induced mutagenesis to be unable to synthesize amino acid and, therefore, limit its growth. However, the gene will gain its function in the presence of pro-carcinogen, thus a number of revertant colonies per plate is enormously increased. Besides, anti-mutagenicity of test compounds can be described if those numbers of colonies is decreased by using of carcinogen as a positive control (Mortelmans and Zeiger, 2000). The S9 fraction contains both cytochrome P450 and phase II enzymes. This has been used for Ames test to determine the chemical substances required for metabolic activation.

The objectives of this study were to determine total phenolic content as well as the mutagenicity and/or anti-mutagenicity of noni products by Ames test. 4-nitro-o-phenylenediamine (NPD) and 2-aminoanthracene (2AA) were used as positive controls in the absence and presence of S9 metabolic activation, respectively.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Folin–Ciocalteu reagent was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP+) was purchased from Tokyo chemical industry (Japan). Glucose-6-phosphate was obtained from Calbiochem (Canada). 2-aminoanthacene and 4-nitro-o-phenylenediamine were obtained from Sigma Aldrich and phenobarbital-induced S9 was a gift from Prof. Costas Ioannides, University of Surry, UK.

Preparation of sample

Ripen noni fruits were collected from Chiang Rai, Thailand. Fermented juice was produced by a local producer in Chiang Rai. In brief, fully ripe fruits were washed, chopped and mixed with brown sugar (10%). The mixture was transferred to a cleaned container and left at room temperature for 12 months fermentation. Fresh juice was prepared by employing hydraulic

press extraction prior to filtration. Both fresh and fermented noni juices were pasteurized at 80°C for 3 min before future analysis.

Determination of total phenolic content

The total phenolic content in each sample was determined by spectrophotometer according to Folin-Ciocalteu procedure (Vu et al., 2012). The total phenolic content of sample was expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) per ml of sample.

Ames test

Mutagenicity testing was carried out according to the method described by Maron and Ames (1983). To a 2 ml top agar containing histidine and biotin, 100 µl of histidine dependent bacteria, 100 µl of noni juice and 500 µl of S9 activation system or phosphate buffer saline (PBS) were added. The mixture was then gently mixed and poured on glucose minimal (GM) agar plate (Bottom agar). Once the top agar was solidified, the plates were incubated in a 37°C incubator for 48 hr at which the time of the histidine revertants colonies were counted. Anti-mutagenicity testing was similarly conducted but both positive control and noni juice were added on a top agar. In the presence of S9 activation system, 2-aminoanthacene (2AA) was used as positive control, whereas 4-nitro-o-phenylenediamine (NPD) was employed in the absence of S9.

RESULTS AND DISCUSSION

Determination of total phenolic content

Total phenolic content of decreased significantly after pasteurization process for both fresh and fermented noni juice (Table 1). The result agreed with George and colleagues (2011) who reported that total phenolic content in tomato juice majorly declined after pasteurization. However, fermentation and non-fermentation process did not significantly affect total phenolic content. It can be found hat pasteurized fresh noni juice contained 23.80 mg GAE/ml, whereas pasteurized fermented noni juice was 19.85 mg GAE/ml. The result contradicted with previous report by Lai et al. (2013) whom found that phenolic content in soymilk was decreased offer fermentation process. It was believed that β-glucosidase generated from starter culture was responsible for increasing of phenolic content during fermentation. Nonetheless, fermentation of noni juice is majorly involved with *Lactobacillus casei* whereas soy bean fermentation was a simultaneous action of *Streptococcus thermophiles* and *Bifidobacterium infantis*.

Table 1 Total phenolic content in noni samples

Sample	Total phenolic content (mg GAE*/ml)
Fresh noni juice	46.83 ± 24.88^{a}
Pasteurized noni juice	23.80 ± 0.11^{b}
Fermented noni juice	45.05 ± 1.26^{a}
Pasteurized fermented noni juice	19.85 ± 1.01^{b}

Means with different lowercase superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$)
* Gallic acid equivalent

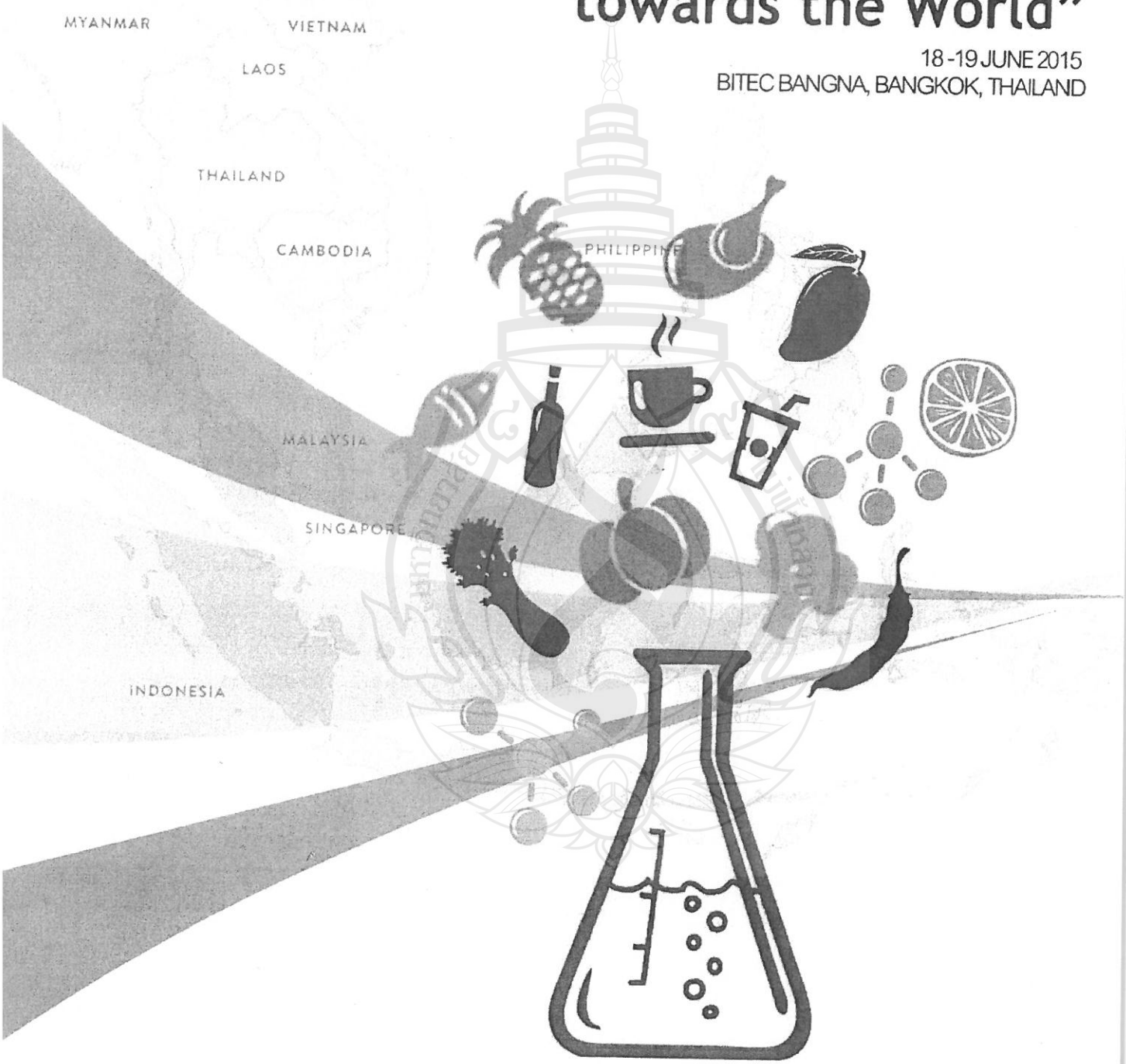
PROCEEDINGS:

FIAC2015

FOOD INNOVATION ASIA CONFERENCE 2015

"Innovative ASEAN Food Research towards the World"

18 -19 JUNE 2015
BITEC BANGNA, BANGKOK, THAILAND



Antibacterial Activity of Fresh and Fermented *Morinda citrifolia* Fruit Juice

Nattaya Konsue[1], Supaporn Yimthiang[2] and Wiyada Kwanhian[2*]

[1]*School of Agro-Industry, Mae Fah Luang University,*
Muang district, Chiang Rai, 57100, Thailand
Tel.:+6653916738, E-mail:nattaya.kon@mfu.ac.th

[2]*School of Allied Health Sciences and Public Health,*
Walailak University, Thasala district, Nakhon si Thammarat, 80160, Thailand
Tel.:+6676672104, E-mail: ksupapor@wu.ac.th

[2*]*School of Allied Health Sciences and Public Health,*
Walailak University, Thasala district, Nakhon si Thammarat, 80160, Thailand
Tel.:+6676672104, E-mail: kwiyada@wu.ac.th

**Corresponding author. E-mail: kwiyada@wu.ac.th*

ABSTRACT: *Morinda citrifolia* (Noni) is widely used in traditional Asian medicine for decades. Noni fruit juice has been reported for its various functional effects including antibacterial activity. However, previous reports was mainly emphasized on fresh noni juice whereas the effect of fermented juice has not yet well established. Uncontrolled fermentation conditions such as natural microbial and fermentation time especially in house and small factory production are of important for health benefit and safety of consumers. The objective of this study was to evaluate antibacterial effect of 7 noni juices that produced by different processes namely fresh noni juice (FJ), 1 year fermented by pure and natural microbe with sugar (FP 12 and FN 12), 6 months fermented by pure and natural microbe with sugar (FPS 6 and FNS 6), and 6 months fermented by pure and natural microbe without sugar (FPNS 6 and FNNS 6). Five bacterial were employed: *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Enterococcus feacalis, Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Antibacterial ability was assessed by minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). MIC concentrations of FJ, FP 12, FN 12, FPS 6, and FNS 6 were in a range of 31.25-62.5 µl/ml. Moreover, it was found that MBC of FJ was as high as 250-500 µl/ml which implies that FJ can only inhibit bacteria by bacteriostatic effect of active compound, not killing. Whereas MBC of fermented noni juice by natural and pure microbial with sugar (FP 12, FN 12, FPS 6 and FNS 6) were 31.25-62.5 µl/ml, similar to their MIC values. This infers that these noni juices have bactericidal activity. On the other hand, when fermented noni juices produced by either natural or pure microbial but without sugar (FPNS 6 and FNNS 6) were considered, MIC and MBC concentrations were similarly high at 250 µl/ml. Though, their high MIC concentration showed low antibacterial activity but killing effect also observed. This is the first report of antibacterial activity of different processes of noni juice. It can be concluded that two fermentation time ranges (6 or 12 months) had no effect on antibacterial activity of noni juice. In addition, pure and natural microbe fermenter also did not alter those activities. Nevertheless, sugar added fermentation was the main factor that increased antibacterial activity of noni juice.

Keywords: noni, *Morinda citrifolia,* antibacterial activity, MIC, MBC

INTRODUCTION

Morinda citrifolia is known commonly as Noni. It is planted widely throughout the Pacific. It has been used in folk medicine by Polynesians for over 2000 years. It is reported to have a broad range of therapeutic effects, including antibacterial, antiviral, antifungal, antitumor, antihelmin, analgesic, hypotensive, anti-inflammatory, and immune enhancing effects [1].

Alternative medicine benefits from many parts of noni plant were approved including fruit [2], Leaf [3], seed [4] and root [5]. Ripen noni is beneficially used for noni juice production. The fresh juice from ripen fruit has been confirmed for its antibacterial activities as a result of bioactive substances such as phenolic compounds and, in case of fermented juice, acid which is a product from lactic acid fermentation process [6]. Noni juice from ripen noni fruit was mostly used in many reports for antibacterial effect demonstration [2].

In Thailand, commercial noni juices are widely produced in house or small factory. There are 2 production types of noni juice; pasteurized and fermented noni juice. Until now, there is no study of the change in active compounds occurring from different process. Moreover, quality control of fermented noni juice is not achievable when natural bacteria which consist of unknown types and number are employed. For these reasons, producers, government organizations, private agencies as well as customers are questioning for the safety of commercial fermented noni juice hence market possibility of noni juice is limited.

Objective of this study was to evaluate chemical properties, antioxidant capacity, and antibacterial effect of noni juice that produced from different producing processes. Factors affecting fermentation process were varied including fermentation time, sugar content and microbial type (natural or pure culture).

MATERIALS AND METHODS

1 Noni juice

The 7 noni juices were produced by different processes namely pasteurized fresh noni juice (FJ), 1 year fermented by pure and natural microbe with sugar (FP 12 and FN 12), 6 months fermented by pure and natural microbe with sugar (FPS 6 and FNS 6), and 6 months fermented by pure and natural microbe without sugar (FPNS 6 and FNNS 6). The brief processes are described below.

1.1 Pasteurized fresh noni juice

Fully ripe noni fruits, as indicated by yellow color and soft texture of the fruits, were cleaned, chopped and thoroughly blended. Noni puree was filtered and the juice was collected. Then the juice was pasteurized at 80 °C for 1 min prior to storage at –20 °C until use.

1.2 Fermented noni juice by pure microbe

Fully ripe noni fruit was cleaned and chopped. To the fruits, 40% w/w of 50% sugar syrup was added. Temperature of the mixture was then brought up to 70 °C for 10 min. Pasteurized noni mixture was ice-shocked in a closed fermentation tank. Ten percentage of pure microbial stock was added after cooling down prior to fermentation at room temperature for 6 or 12 months. During fermentation, fermented gas was regularly released. Fermented noni was added with 15 % pasteurized water before juice extraction. Clear fermented noni juice was kept at –20 °C for further analysis. For non-sugar added formula, similar method was employed except for excluding the addition of sugar syrup.

The pure microbial stock was freshly prepared. The mixture of chopped ripe noni fruit (70 % w/w), brown sugar (10% w/w) and water (20% w/w) was heated at 70 °C for 10 min before cooling with ice-cold bath. Ten percentage of pure culture, *Lactobacillus casei* (TISTR 1340), was added into the mixture prior to fermentation for 24 hrs.

1.3 Fermented noni juice by natural microbe
Ingredients and processing of fermented noni juice by natural microbe (with or without sugar) was similar to that of fermented noni juice by pure microbe, except for the mixture was not pasteurized and pure microbial stock was not utilized.

2 Chemical property determination
2.1 Total phenolic content
The total phenolic content in each sample was determined by spectrophotometer according to Folin-Ciocalteu procedure [7]. Total phenolic content of sample was estimated from a calibration curve of gallic acid at 760 nm. The total phenolic content of sample was expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) per mL of sample.

2.2 Total Flavonoid content
Total flavonoid content determination was carried out according to the aluminium chloride colorimetric assay [8]. 1 mL of noni sample or standard solutions of catechin was added to 4 mL of distilled water. Then 0.30 mL 5% NaNO2 was added followed by 0.3 mL 10 % AlCl3 after 5 min. Five minutes after, 2 mL IM NaOH was added and the volume was made up to 10 ml with distilled water. The solution was mixed and absorbance at 510 nm was read against the blank. The total flavonoid content was expressed as mg catechin equivalents (CE).

2.3 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay
FRAP assay was modified from the method of Benzie and Strain [9]. An aliquot of 200 µL noni samples were mixed with 3 mL FRAP reagent in test tubes. The mixture was incubated in water bath for 30 minutes at 37 °C and the absorbance of the samples was determined against blank at 593 nm. Standard curve was prepared at a range of stock solution concentrations at 200, 400, 800, 1200 and 1600 µM using aqueous solution of $FeSO_4.7H_2O$. FRAP value was expressed as µmole Ferrous sulfate/mL sample.

2.4 DPPH Assay
Evaluation of radical DPPH scavenging activity of noni samples was carried out as described previously [10]. To 3.8 mL ethanol solution of 0.1 mM DPPH radical, 0.2 mL of sample was added. The mixture was well mixed and left to stand at room temperature in the dark for 30 min. The absorbance at 517 nm was measured against ethanol blank. The percent of DPPH discolouration of the sample was calculated. DPPH value was expressed as trolox equivalent/ mL sample using the calibration curve of Trolox. Linearity range of the calibration curve was 20 to 1000 µM.

2.5 Scopoletin and damnacanthal
Scopoletin and damnacanthal were analysed by HPLC-DAD/MSD. The reference methods were verified and carried out by The Central Laboratory (Thailand) Co. Ltd., Chiang Mai, Thailand.

3 Standard bacterial strains
Five standard bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6635), *Enterococcus feacalis* (ATCC 51299), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) were cultivated on trypticase soy agar (TSA) plates at 37°C, overnight. For working cultures, 3-4 colonies were suspended in trypticase soy broth (TSB), incubated for 1 hr, at 37°C. Then the culture was diluted to provide a final inoculum of approximately 10^6 CFU/ml by compared to 0.5 McFaland standard [11].

4 Determination of MIC and MBC Values
Broth microdilution assays were performed according to standard method M07-A9 of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) with modifications [12]. Briefly, 20 µL of 10^6 CFU/mL of bacteria was inoculated into 180 µL of noni juice which serial 2 fold diluted in TSB. Prior to aerobic incubation at 37°C for 24 hrs, minimum inhibitory concentration (MIC) values were determined by observing the turbidity. The lowest concentrations of noni juice with clear suspensions were considered as

the MIC values. The lowest concentrations of noni juice in post-incubation suspensions which did not harbour any bacterial growth upon culturing on TSA after overnight incubation at 37 °C were considered as the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) values.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical property of noni juice products

Table 1 illustrates total phenolic and flavonoid content and antioxidant capacities of seven noni samples produced with different conditions: pasteurized noni juice (FJ), 1 year fermentation employing pure and natural microbe in the presence of sugar (FP 12 and FN 12), 6 months fermentation employing pure and natural microbe in the presence of sugar (FPS 6 and FNS 6), and 6 months fermentation employing pure and natural microbe without sugar (FPNS 6 and FNNS 6).

Among different recipes, FPS 6 had the highest total phenolic content. Type of fermentation microbe (pure and natural) did not lead to a significant difference of phenolic content. It is also obvious that fermentation time had no major effect on total phenolic content but the presence of sugar is of most important. As can be seen, both FPS 6 and FNS 6 gave rise to a marked increase of total phenolic content whereas the lowest values were evident in non-sugar fermented juices (FPNS 6 and FNNS 6). Surprisingly, Fresh juice contained low phenolic content in a similar level with FPNS 6 and FNNS 6. Preliminary study showed that phenolic content of fresh noni juice increased during fermentation process. This was thought to be due to plant cell wall breakdown by microorganisms hence releasing of bioactive compounds was encouraged. The comparable effects were also seen in flavonoid content FRAP and DPPH values (Table 1).

Scopoletin and damnacanthal are major bioactive compounds that responsible for health benefits of noni. In the current study, it was found that the highest bioactive compounds, both scopoletin and damnacanthal, were noted in fresh juice (FJ) and FPS 6. Scopoletin content in FJ and FPS 6 were 54.49 and 53.41 mg/kg, respectively. Likewise, damnacanthal content in the two samples were 67.20 and 68.17 mg/kg, respectively. It is crucial to point out that high amount of bioactive compounds were found in fresh noni juice and the fermentation process and sugar content had no major effect.

MIC and MBC of noni products

Seven noni juices were determined for MIC by broth microdilution method, following with MBC, against five bacteria. Bacteria employed were both gram positive and negative bacteria (Tables 3 and 4). The MIC and MBC results against Gram negative (GN) bacteria show in Tables 5 and 6 and Figure 2.

Table 1 Chemical properties of noni juice products

Noni juice	Total phenolic content (mgGAE/ 100 mL)	Flavonoid content (µg CE/mL)	FRAP (µmole Ferrous sulfate/mL)	DPPH (µmole Trolox/mL)
FJ	79.7 ± 21.7^{c}	5.2 ± 0.5^{c}	112.4 ± 25.9^{cd}	72.7 ± 0.2^{d}
FJ 12	133.3 ± 11.7^{b}	22.5 ± 1.3^{a}	146.4 ± 12.9^{bc}	73.5 ± 0.0^{abc}
FN 12	133.4 ± 9.9^{b}	21.3 ± 1.9^{a}	125.5 ± 10.5^{c}	73.8 ± 0.1^{a}
FPS 6	174.3 ± 19.4^{a}	21.3 ± 2.3^{a}	193.1 ± 17.6^{a}	73.6 ± 0.1^{abc}
FPNS 6	78.7 ± 7.4^{c}	14.3 ± 2.6^{b}	$81.6 \pm 15.^{1d}$	73.3 ± 0.3^{c}
FNS 6	155.1 ± 8.7^{ab}	22.7 ± 1.3^{a}	165.0 ± 11.9^{ab}	73.7 ± 0.1^{ab}
FNNS 6	$94.2 \pm 19.^{3c}$	8.2 ± 1.2^{c}	119.5 ± 25.4^{c}	73.4 ± 0.2^{bc}

[abc]Mean values in the same column bearing different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

Table 2 Scopoletin and damnacanthal content in selected noni juice products

Noni juice	Scopoletin (mg/kg)	Damnacanthal (mg/kg)
FJ	54.49	67.20
FPS 6	53.41	68.17
FPNS 6	44.31	48.11
FNS 6	44.67	61.42
FNNS 6	38.82	55.32

Table 3 MIC of noni juice against Gram positive bacteria

Noni juices	Concentration (μL/mL)		
	S. aureus	*B. subtilis*	*E. faecalis*
FJ	31.25	62.50	31.25
FP 12	31.25	31.25	31.25
FN 12	31.25	31.25	31.25
FPS 6	31.25	31.25	31.25
FPNS 6	250	250	250
FNS 6	31.25	31.25	31.25
FNNS 6	250	250	250

Table 4 MIC of noni juice against Gram negative bacteria

Noni juices	Concentration (μL/mL)	
	E. coli	*K. pneumoniae*
FJ	31.25	62.50
FP 12	31.25	31.25
FN 12	62.50	62.50
FPS 6	62.50	31.25
FPNS 6	250	250
FNS 6	31.25	31.25
FNNS 6	250	250

Table 5 MBC of noni juice against Gram positive bacteria

Noni juices	Concentration (μL/mL)		
	S. aureus	*B. subtilis*	*E. faecalis*
FJ	250	250	250
FP 12	31.25	31.25	62.50
FN 12	31.25	31.25	31.25
FPS 6	31.25	31.25	62.50
FPNS 6	250	250	250
FNS 6	31.25	31.25	31.25
FNNS 6	250	250	250

Table 6 MBC of noni juice against Gram negative bacteria

Noni juices	Concentration (μL/mL)	
	E. coli	*K. pneumoniae*
FJ	500	500
FP 12	31.25	62.50
FN 12	62.50	62.50
FPS 6	62.50	62.50
FPNS 6	250	250
FNS 6	62.50	62.50
FNNS 6	250	250

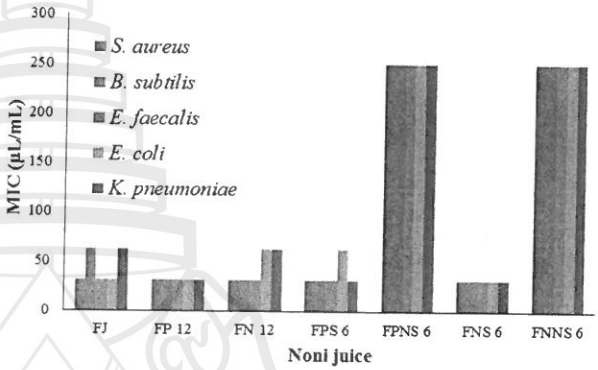


Figure 1 Minimum inhibitory concentration (MIC) of different noni juices against five bacteria.

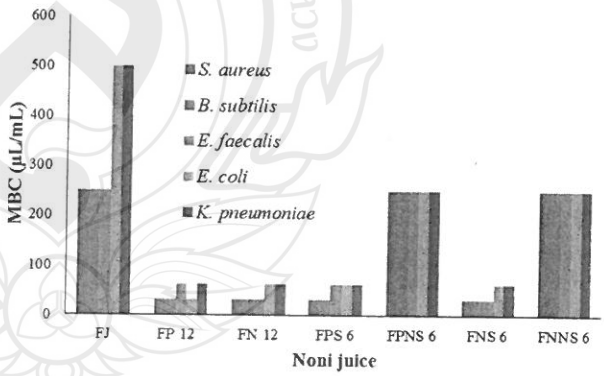


Figure 2 Minimum bactericidal concentration (MBC) of different noni juices against five bacteria.

MIC of noni juices against both GP and GN bacteria ranged from 31.25-62.5 μL/mL, except for non-sugar adding fermented juices, FPNS 6 and FNNS 6, where MIC was as high as 250 μL/mL. The MIC results indicated that sugar is the key ingredient in fermentation process which increased the antibacterial activity of noni juices. The sugar content influences lactic acid production and the content of which was thought to be responsible for its ability to inhibit microbial growth. Determination of pH (data not shown) demonstrated that sugar containing samples had lower range of pH being 2.98, 2.99, 3.07 and 3.09 in FPS6, FNS 6, FN 12 and FP 12 respectively, whereas that in pasteurized fruit juice and non-sugar fermentation, the higher values were observed being 3.51, 3.53 and 4.37 in FPNS 6, FNNS 6 and FJ respectively. Moreover, according to the chemical property of noni samples (Table 1), total phenolic content may, partly, respond to these effects. Surprisingly, MIC of fresh juice against five bacteria were also in the low ranges. This may infer that scopoletin and damnacanthal are important keys as described previously by Chan-Blanco and colleagues [13]. In current study, the high content of these bioactive compounds were also demonstrated in fresh juice compare to other samples (Table 3).

The following experiment was carried out to study MBC of noni juices against both GP and GN bacteria (Tables 5 and 6 and Figure 2). MBC of all samples were either the same or higher than MIC. In case of FJ, MBC against GN and GP were 250 and 500 μl/ml, respectively. These results indicated that antibacterial activity of active compound in FJ is bacteriostatic whereas bactericidal activity was illustrated in other noni juices, same MIC and MBC values. Likewise, although FPNS 6 and FNNS 6 showed high concentration of MIC at 250 μl/ml, but MBC was similar. The results obtained from this study are consistent with the previous reports where lactic acid fermentation of herbal plants enhanced various bio-active properties [14]. Furthermore, the different fermentation time, 6 months and 1 year, did not influence the difference antibacterial activity, thus the less time is enough for effective fermented juice preparation.

Noni juices that fermented by pure lactic acid bacteria (FP12, FPS6 and FPNS6) did not demonstrate different antibacterial activity compared to noni juices that fermented by natural microbial (FN12, FNS6 and FNN6). It can be said that natural and pure fermentation process similarly produce important antimicrobial compounds, as evident in Tables 1 and 2. Nevertheless, pure lactic acid starter culture is recommended in noni fermentation process, especially in industrial scale, because quality and safety are in concerned.

Moreover, It is not surprising that MIC of noni juices against GN was higher than GP. This indicated that GN bacteria are more tolerant to active ingredient in noni juices than GP. This can be explained by the complexity of outer compartment of GN bacteria such as cell membrane. The membrane of which has more selective permeability than GP bacteria [5].

CONCLUSION

Antibacterial compound in fresh noni juice is bacteriostatic, not bactericidal. Fermentation process in noni juice enhances bactericidal activity, probably because of bactericidal compound production. Sugar is a key ingredient in fermentation that promotes the antibacterial activity of fermented noni juice. Fermentation by natural microbe produce antibacterial compound in the similar manner as pure lactic acid bacteria employment. Moreover, the duration of fermentation 6 months is enough of producing the antibacterial effective compound of noni juice.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding and support for this study were provided by National Research Council of Thailand. Authors also thank the Centre for Scientific and Technological Equipment,

Walailak University for providing stocks of standard bacteria, equipment and research facilities.

REFERENCES

[1] Wang, M. Y., West, B. J., Jensen, C. J., Nowicki, D., Su, C., Palu, A. K., et al. (2002). Morinda citrifolia (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. Acta Pharmacologica Sinica, 23(12): 1127-1141.

[2] Kumarasamy, B., Manipal, S., Duraisamy, P., Ahmed, A., Mohanaganesh, S., & Jeevika, C. (2014). Role of aqueous extract of morinda citrifolia (Indian noni) ripe fruits in inhibiting dental caries-causing streptococcus mutans and streptococcus mitis. Journal of Dentistry (Tehran). 11(6): 703-710.

[3] Huang, C., Lai T., Huang, R., Su, K.,Lai, S. and Lanata, A. (2014). Effect of an herbal preparation fermented by lactobacillus reuteri lr107 in preventing periodontal inflammation in an experimental gingivitis model. Asian Journal of Complementary and Alternative Medicine. 2(5): 7.

[4] Lai, S. and Lan, A. C. (2014). Effect of an herbal preparation fermented by *Lactobacillus reuteri* LR107 in preventing periodontal inflammation in an experimental gingivitis model. Asian Journal Of Complementary And Alternative Medicine. 2(5): 12-18

[5] Silhavy, T. J., Kahne, D. and Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. Cold Spring Harb Perspectives in Biology. 2(5): a000414.

[6] Thani, W., Vallisuta, O., Siripong, P. and Ruangwises, N. (2010). Anti-proliferative and antioxidative activities of thai noni/ yor (*Morinda citrifolia* linn.) leaf extract. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 2(41), 482-489.

[7] Shahwar, D., Raza, M.A., Mirza, A.S.M., Abbasi, M.A. and Ahmad, V.U. (2010). Comparative study of antioxidant and antimicrobial activities of stem-bark extracts of Litchi chinensis and its organic fractions. Journal of The Chemical Society Of Pakistan. 32(3): 357–362.

[8] Dewanto, X., Wu, K., Adom, K. and Liu, R.H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity Journal of Agriculture and Food Chemistry. 50: 3010–3014

[9] Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. 1999. Ferric reducing/ antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods in Enzymology 299: 15–27.

[10] Chen, C. W. and Ho, C. T. (1995). Antioxidant Properties of Polyphenols Extracted from Green and Black Teas. Journal of Food Lipids. 2(1): 35-46.

[11] McFarland J (1907). Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. Journal of the American Medical Association, 14: 1176-1178.

[12] Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9.

[13] Chan-Blanco, Y., Vaillant, F., Perez, A.M., Reynes, M., Brillouet, J.M. and Brat, P. (2006). The noni fruit (Morinda citrifolia L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. Journal of Food Compostion and Analysis. 19(6-7): 645-654.

[14] Shotipruk, A., Kiatsongserm, J., Pavasant, P., Goto, M. and Sasaki, M. (2004), Pressurized Hot Water Extraction of Anthraquinones from the Roots of *Morinda citrifolia*. Biotechnoly Progress. 20: 1872–1875.