

ชื่อวิทยานิพนธ์	กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม
ผู้เขียน	นางสาวสุมลรัตน์ จันทะผล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2549

บทคัดย่อ

กิจกรรมการยับยั้งของสารสกัดเอธิลอะซิเตตและน้ำมันหอมระเหยจากผิวส้ม 7 ชนิด คือ มะกรูด มะนาว ส้มโอ ส้มเซ็ง ส้มจุก ส้มโชกุน และส้มจี๊ดที่มีผลต่อจุลินทรีย์โดยวิธี broth microdilution assay พบว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตมีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์สูงกว่าน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นด้วยไอน้ำ สารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูด (kaffir lime, *Citrus hystrix* DC.) มีกิจกรรมการยับยั้งในช่วงกว้างที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดจากผิวส้มชนิดอื่นคือสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก ยีสต์ และราคือ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *sake* and *Aspergillus fumigatus* TISTR 3180 โดยสามารถยับยั้ง *S. cerevisiae* var. *sake* และ *B. cereus* ได้ดีที่สุดที่ค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) เท่ากับ 0.28 และ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และที่ค่า MFC (Minimum Fugicidal Concentration) หรือ MBC (Minimum Bactericidal Concentration) เท่ากับ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ค่า MIC ที่ยับยั้ง *L. monocytogenes*, *C. albicans*, *A. fumigatus* TISTR 3180 ของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดมีค่าเท่ากับ 1.13, 1.13 และ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่า MBC หรือ MFC เท่ากับ 2.25, 2.25 และ 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนค่า MIC และ MBC ที่ยับยั้ง *S. aureus* มีค่าเท่ากันทั้งคู่คือ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารประกอบหลักที่พบในสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดคือ limonene (31.64 เปอร์เซ็นต์) สารประกอบรองคือ citronellal (25.96 เปอร์เซ็นต์) และ β -pinene (6.83 เปอร์เซ็นต์) ส่วนสารประกอบหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดคือ β -pinene (30.48 เปอร์เซ็นต์) สารประกอบรองคือ sabinene (22.75 เปอร์เซ็นต์) และ citronellal (15.66 เปอร์เซ็นต์)

ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดขึ้นกับพีเอช อุณหภูมิ องค์ประกอบของอาหารและชนิดของจุลินทรีย์ที่ทดสอบ โดยพบว่าน้ำมันปาเล็มมีผลทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ลดลงทุกสายพันธุ์ แป้งสาลีลดกิจกรรมการยับยั้งของสารสกัดเอธิลอะซิเตตต่อ *S. aureus*, *S. cerevisiae* var. *sake* และ *L. monocytogenes* แต่ไม่มีผลต่อการยับยั้ง *B. cereus* และ *A. fumigatus* TISTR 3180 ส่วนหางนมจะมีผลทำให้กิจกรรมการยับยั้ง *S. cerevisiae* var.

sake และ *L. monocytogenes* ลดลงแต่จะไม่มีผลต่อการยับยั้ง *S. aureus*, *B. cereus*, *C. albicans* และ *A. fumigatus* TISTR 3180 ของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูด ในอาหารมีพีเอช 4.5 กิจกรรมการยับยั้ง *S. aureus* และ *B. cereus* ของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดเพิ่มขึ้น โดยมีค่า MIC และ MBC ที่เท่ากันคือ 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยังพบการยับยั้ง *Salmonella* sp. และ *E. coli* O157 : H7 DMST 12743 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้ด้วย เมื่อนำสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดมาผ่านความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 72, 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่าที่ 72 องศาเซลเซียส 15 นาที กิจกรรมการยับยั้ง *L. monocytogenes*, *C. albicans* และ *A. fumigatus* TISTR 3180 ลดลงแต่จะไม่มีผลต่อการยับยั้ง *S. aureus*, *S. cerevisiae* var. *sake* และ *B. cereus* ส่วนการให้ความร้อนที่ 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีจะทำลายกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดเอธิลอะซิเตต

การรอดชีวิตของ *B. cereus* หลังเติมสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดที่ระดับความเข้มข้น 2.25, 1.13, 0.56 และ 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 2.25 และ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร *B. cereus* ลดลงจาก 5.12 และ 5.08 Log CFU ต่อมิลลิลิตรเป็น 2.74 และ 2.85 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ภายในเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนการใช้สารสกัดเอธิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดจำนวน *B. cereus* จาก 5.23 Log CFU ต่อมิลลิลิตรเป็น 3.14 Log CFU ต่อมิลลิลิตร ได้ภายในเวลา 9 ชั่วโมง โดยพบว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์ทำให้ผนังเซลล์ฉีกขาดจากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่งผ่าน (TEM)

นอกจากนี้สารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) ปากมดลูก (Hela) และเต้านม (MCF-7) แต่จะไม่ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) สาร citronellal จะยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากเท่านั้น ส่วน limonene ซึ่งเป็นสารประกอบหลักที่พบในสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดไม่มีผลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด

Thesis Title Antimicrobial Activities of Chemical Extracts from *Citrus* spp.
Author Miss Sumonrat Chanthaphon
Major Program Biotechnology
Academic Year 2006

ABSTRACT

Seven crude extracts from peels of *Citrus* spp. (*Citrus hystrix* DC., *Citrus aurantifolia* Swingle, *Citrus maxima* Merr., *Citrus paradisi*, *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus reticulata* Blanco cv chugun and *Citrus japonica* Thunb) were investigated for their antimicrobial activities against microorganisms by broth microdilution assay. Ethyl acetate extracts from all citrus peels showed stronger antimicrobial properties than essential oils obtained from hydrodistillation. The ethyl acetate extract from kaffir lime (*Citrus hystrix* DC.) showed broad spectrum inhibitory against all gram positive bacteria, yeasts and fungi including *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *sake* and *Aspergillus fumigatus* TISTR 3180. They also exhibited MIC values of 0.28 and 0.56 mg/ml against *S. cerevisiae* var. *sake* and *B. cereus*, respectively while the MFC and MBC values against both microbes were 0.56 mg/ml. The MIC values of the extract against *L. monocytogenes*, *C. albicans* and *A. fumigatus* TISTR 3180 were 1.13, 1.13 and 1.13 mg/ml and MBC or MFC values were 2.25, 2.25 and 2.25 mg/ml whereas the MIC and MBC values against *S. aureus* were 1.13 and 1.13 mg/ml, respectively. The major constituents of the ethyl acetate extract from kaffir lime were limonene (31.64 %) citronellal (25.96 %) and β -pinene (6.83 %) whereas β -pinene (30.48 %) sabinene (22.75 %) and citronellal (15.66 %) appeared to be major compounds of the essential oil.

The antimicrobial effectiveness of the kaffir lime peel extract was dependent on various conditions such as pH, heating processes and food compositions. The presence of palm oil had reduced the inhibitory activities of the extract against all strains tested. Skim milk had reduced the inhibitory activities of the extract against *S. cerevisiae* var. *sake* and *L. monocytogenes* but there was no such influence against *S. aureus*, *B. cereus*, *C. albicans* and *A. fumigatus* TISTR 3180. Addition of wheat flour had increased the MIC values against *S. cerevisiae* var. *sake* from 0.28 mg/ml to 1.13 mg/ml but no effect against *B. cereus* and *A. fumigatus* TISTR 3180 was observed. The greatest

activities were exhibited at the MIC and MBC values of 0.28 mg/ml against both *S. aureus* and *B. cereus* at pH of 4.5, at which inhibition of Gram-negative bacteria such as *Salmonella* sp. and *E. coli* O157 : H7 DMST 12743 could be observed. Pasteurization at temperature of 72 °C for 15 minutes had reduced the inhibitory activities of the extract against *L. monocytogenes*, *C. albicans* and *A. fumigatus* TISTR 3180 but there was no reduction of the inhibitory activities against *S. aureus*, *B. cereus* and *S. cerevisiae* var. *sake*. At the concentration of 2.25 and 1.13 mg/ml, *B. cereus* was reduced from 5.12 and 5.08 Log CFU/ml to 2.74 and 2.85 Log CFU/ml, respectively after 1 hour exposure. At the concentration of 0.56 mg/ml, the extract reduced *B. cereus* from 5.23 Log CFU/ml to 3.14 Log CFU/ml was applied after 9 hours of incubation. Morphological changes of *B. cereus* treated with the extract of 0.56 mg/ml and 1.13 mg/ml of citronellal, leakage of cell wall was observed by transmission electron microscopy (TEM) analysis.

Cytotoxic assay of the kaffir lime peel extract, citronellal and limonene were evaluated towards HT-29, KB, HeLa and MCF-7 cancer cell lines. Kaffir lime extract showed strong cytotoxic activities against KB, HeLa and MCF-7 but no such inhibition against HT-29 cell lines. Citronellal showed cytotoxic activities against KB only, whereas limonene had no cytotoxic activities against all cancer cells tested.