Thesis Title Fermentation Kinetics of *Morinda citrifolia* Linn and Antimicrobial Activity of its Products

Author Miss Sasithorn Sirilun

Degree Master of Science (Pharmaceutical Sciences)

Thesis Advisory Committee Asst.Prof.Dr. Chaiyavat Chaiyasut Chairperson
Assoc.Prof.Dr. Naiyatat Poosaran Member
Asst. Prof.Dr. Suchart Punjaisee Member

ABSTRACT

Fermented medicinal plant juices (FMPJ) containing *Morinda citrifolia* Linn. are utilized as beverages and food supplements. The scientific data on safety evaluation, constituents, properties, health efficacy are still lacked. The objective of this research was to study the physical, chemical and biological properties of FMPJ containing *M. citrifolia* on safety aspects and selective ways for consumption. FMPJ containing *M. citrifolia* with four most popular production processes (formulas A, B, C and D) and two controls (formulas E and F) were studied. The FMPJ samples were taken on day 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180 of fermentation for testing.

It was found that taste and smell was sour. The products are dark brown colour. Gas was released on day 0-7 of fermentation. The pH values of final products were 3.2-4.4. The initial amounts of total and reducing sugar were ranged from 10.48 to 12.62 %(w/v) and 4.16 to 10.22 % (w/v), respectively. Lactic acid, the major product was detected between 0.05 and 1.98 % (w/v). Acetic acid was also detected on day 20-180 of fermentation with the concentration between 1.03 and 1.92 % (w/v). Observed ethanol was detected till the end of fermentation period with the values

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ranged from 0.02 to 1.93 % (v/v). Methanol, acetaldehyde and iso-propanol were only detected at first period of fermentation (day 0-6) with the values between 618.45-2,488.8 mg/L, 24.82-747.39 mg/L and 216.01-1,409.0 mg/L, respectively.

Observed physical and chemical properties are related to the varieties and quantities of microorganisms in the FMPJ. It was found that total bacterial counts were between 7.1×10^{2} and 7.4×10^{11} CFU/ml. These were related to the amount of lactic acid bacteria (4.8×10^{2} –5.7×10^{9} CFU/ml) observed. Total coliforms were found between 2.0 and 313 MPN/100 ml. The pathogenic bacteria, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* and *Shigella* spp. were not found in all samples. The amounts of yeast and mold varied. They depended on the fermentation time and sanitation of the fermentation and sampling process.

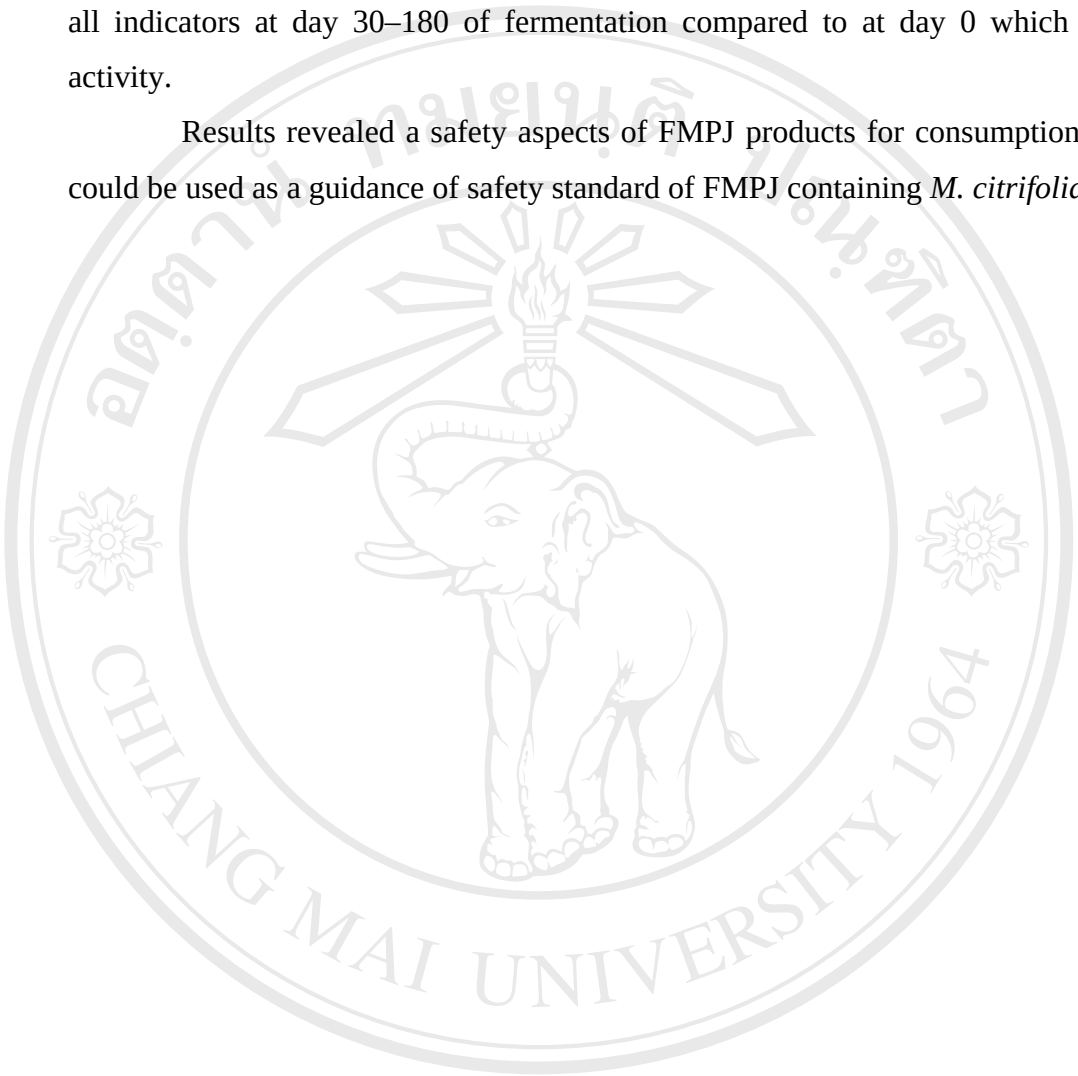
Fermentation kinetics were carried out. The specific growth rate (μ) obtained from the study were between 0.187 and 1.96 day^{-1}. The specific rate of substrate consumption (q_S) were between 1.83-7.11×10^{-3} mg/CFU/day. The product formation rate (q_P) were between 5.33×10^{-8} and 1.40×10^{-3} mg/CFU/day. The cell yield coefficient related to substrate ($Y_{X/S}$) were between 1.02-2.76×10^{2} CFU/mg. The product yield coefficient related to substrate consumption ($Y_{P/S}$) were between 2.91×10^{-5} and 0.197 mg/mg. All values of kinetic parameters of formulas A, D and E, which were fermented with starter culture were also higher than those of formulas B, C and F, which were fermented without starter culture.

The antimicrobial activities were investigated by agar well plate method. FMPJ had the antimicrobial activities against all microbial indicators: *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* and *Candida albicans* ATCC 90028. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) were also investigated. MIC titer values were ranged from 1:2-1:16, 1:2-1:8, 1:2-1:16, 1:2-1:16 and 1:2-1:16 for those microbial indicator, respectively. Their activities against *E. coli* and *P. aeruginosa* are higher than against other microbial indicators. All FMPJ filtrates except formula C were effective against

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

all indicators at day 30–180 of fermentation compared to at day 0 which had no activity.

Results revealed a safety aspects of FMPJ products for consumption. They could be used as a guidance of safety standard of FMPJ containing *M. citrifolia*.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ จลนพลศาสตร์ของการหมักลูกยอและฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของผลิตภัณฑ์ที่ได้

ผู้เขียน นางสาวศศิธร ศิริลุน

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เภสัชกรรม)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.ไชยวัฒน์ ไชยสุต ประธานกรรมการ
รศ.ดร.นัยทัศน์ ภู่ศรัณย์ กรรมการ
ผศ.ดร.สุชาติ ปันจัยสีห์ กรรมการ

บทคัดย่อ

น้ำหมักชีวภาพที่ได้จากการหมักลูกยอบ้าน ซึ่งผลิตเพื่อเป็นเครื่องดื่มและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารนั้น ยังขาดข้อมูลสนับสนุนถึงความปลอดภัย ส่วนประกอบ คุณสมบัติ รวมทั้งผลต่อสุขภาพเมื่อบริโภค การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และชีวภาพที่มีผลต่อความปลอดภัยในการบริโภค รวมทั้งประสิทธิผลเบื้องต้นในการยับยั้งจุลชีพของน้ำหมักชีวภาพที่ได้จากการหมักลูกยอบ้าน ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจในการเลือกบริโภคได้ ศึกษาโดยการจำลองรูปแบบกระบวนการผลิตน้ำหมักโดยการคัดเลือกรูปแบบการผลิตที่นิยมผลิตสูงสุด 4 สูตรการหมัก (สูตรหมัก A, B, C และ D) และชุดควบคุม 2 ชุด (สูตรหมัก E และ F) และติดตามการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก ณ วันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150 และ 180 ของการหมัก

จากการศึกษาพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นและรสเปรี้ยว และมีสีน้ำตาลเข้ม มีแก๊สมากตั้งแต่วันที่ 0 ถึง 7 ของการหมัก ค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์สุดท้ายอยู่ในช่วง 3.2-4.4 ปริมาณน้ำตาลรวมและน้ำตาลรีดิวส์เริ่มต้นร้อยละ 10.48-12.62 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ 4.16-10.22 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดจากกระบวนการหมักนี้ คือ กรดแลกติกร้อยละ 0.05-1.98 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และตรวจพบกรดอะซิติก ณ วันที่ 20-180 ของการหมัก ร้อยละ 1.03-1.92

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(น้ำหนัก/ปริมาตร) นอกจากนี้ยังตรวจพบเอธานอลร้อยละ 0.02-1.93 (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งตรวจพบถึงวันสุดท้ายของการหมัก ส่วนเมธานอล อะเซทัลดีไฮด์ และไอโซโพรพานอล ซึ่งตรวจพบในช่วงแรก (วันที่ 0-6) ของการหมักเท่านั้น โดยมีปริมาณ 618.45-2,488.8 มก/ล, 24.82-747.39 มก/ล และ 216.01-1,409.0 มก/ล ตามลำดับ

คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำหมักนั้นสัมพันธ์กับชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่พบในกระบวนการหมัก โดยตรวจพบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด $7.1x10^{2}$ ถึง $7.4x10^{11}$ (CFU/มล) สัมพันธ์กับปริมาณของแบคทีเรียแลกติก (4.8×10^{2} ถึง 5.7×10^{9} CFU/มล) พบแบคทีเรียโคลิฟอร์ม 2.0 ถึง 313 เอ็มพีเอ็น/100 มล. แต่ตรวจไม่พบแบคทีเรียชนิดก่อโรค เช่น *E. coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* และ *Shigella* sp. ในทุกตัวอย่าง ตรวจพบยีสต์และรา ซึ่งแปรผันกับช่วงระยะเวลาของการหมัก สุขลักษณะของกระบวนการผลิตและการเก็บตัวอย่าง

จากการศึกษาทางจลนพลศาสตร์การหมัก พบว่ามีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) 0.187-1.96 วัน$^{-1}$ อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (q_S) 1.83-7.11$\times10^{-3}$ มก/CFU/วัน อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะจากสารอาหาร(q_P) 5.33$\times10^{-8}$-1.40$\times10^{-3}$ มก/CFU/วัน สัมประสิทธิ์การสร้างจำนวนเซลล์จากอาหาร ($Y_{X/S}$) 1.02-2.76$\times10^{2}$ CFU/มก สัมประสิทธิ์การสร้างผลิตภัณฑ์จากอาหาร ($Y_{P/S}$) 2.91$\times10^{-5}$ -0.197 มก/มก ซึ่งค่าจลนพลศาสตร์ต่างๆ ดังกล่าวในสูตรหมัก A, D และ E ซึ่งเป็นสูตรหมักที่เติมเชื้อเริ่มต้นนั้นมีค่าสูงกว่าค่าของสูตรหมัก B, C และ F ซึ่งเป็นสูตรหมักธรรมชาติที่ไม่ได้เติมเชื้อเริ่มต้น

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลชีพโดยวิธี agar well plate พบว่าผลิตภัณฑ์น้ำหมักชีวภาพที่ผ่านการกรองปลอดเชื้อนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิด คือ แบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* และยีสต์ *Candida albicans* ATCC 90028 และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการยับยั้ง (MIC) พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำหมักชีวภาพทุกสูตรหมักที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบดังกล่าวอยู่ในช่วง 1:2-1:16, 1:2-1:8, 1:2-1:16, 1:2-1:16 และ 1:2-1:16 ตามลำดับ โดยในทุกสูตรหมักยกเว้นในสูตรหมัก C นั้นมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ ณ ช่วงอายุการหมัก 30-180 วัน และเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหมัก ณ วันที่ 0 พบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งดังกล่าว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลจากการศึกษาวิจัยดังกล่าวทำให้ทราบถึงความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์น้ำหมักชีวภาพต่อการบริโภค และข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นเกณฑ์มาตรฐานความปลอดภัยของน้ำหมักลูกยอได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved