วารสารเกษตรนเรศวร
ISSN : 0859-3027
ISSN (Online) : 2730-356X



*บทความวิจัย*

# คุณสมบัติทางเคมี ปริมาณสารฟีนอลิก กิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับสัตว์เลี้ยงของผงเปลือกส้มซ่าอบแห้ง

มนัสนันท์ นิพันรัมย์[1], กิตติศักดิ์ ธรรมพิทักษ์[1], เอื้องพร สังคต[1] และ นรภัทร หวันเหล็ม[1]*

[1]ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000
*Corresponding author: noraphath@nu.ac.th
(Received August 3, 2021; Revised September 25, 2021; Accepted September 28, 2021)

## บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมี ปริมาณสารฟีนอลิก กิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับสัตว์เลี้ยงของผงเปลือกส้มซ่าอบแห้ง จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผงเปลือกส้มซ่าอบแห้ง โดยเจือจางผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งด้วยน้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:10 พบว่ามีค่าพีเอชเท่ากับ 3.91±0.11 และมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้เท่ากับ 3.57±0.12 °Brix เมื่อศึกษาปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณสารฟีนอลิก และกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระของผงเปลือกส้มซ่าอบแห้ง พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.14±0.04 เปอร์เซ็นต์ 1,677.34±21.23 mg GAE/100 g และ 4,604.54±49 mg/100 g ตามลำดับ เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค (*Escherichia coli* CIP 76.24, *Staphylococcus aureus* CIP 75.25, *Salmonella* Typhimurium CIP 58.58, *Listeria innocua* CIP 80.11$^{T}$) และแบคทีเรียแลคติก (*Lactobacillus plantarum* TISTR 926, *Pediococcus acidilactici* V202, *Enterococcus faecium* C707 และ *Enterococcus faecalis* CF1GI 15) โดยวิธี agar well diffusion พบว่าสารสกัดผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งสามารถยับยั้ง *E. coli* CIP 76.24 ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* CIP 75.25, *S.* Typhimurium CIP 58.58, *L. innocua* CIP 80.11$^{T}$, *L. plantarum* TISTR 926, *P. acidilactici* V202, *E. faecium* C707 และ *E. faecalis* CF1GI 15 ได้ การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งมีคุณสมบัติที่จะนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารสัตว์ เนื่องจากมีสารฟีนอลิก สารต้านอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้

**คำสำคัญ**: สารประกอบฟีนอลิก, สารต้านอนุมูลอิสระ, ส้มซ่า, แบคทีเรียก่อโรค, แบคทีเรียแลคติก

NARESUAN AGRICULTURE JOURNAL
ISSN : 0859-3027
ISSN (Online) : 2730-356X



*Research Article*

# Chemical Properties, Total Phenolic Content, Antioxidant Activity, and Inhibition of Domestic Animal Related Bacteria of Dried *Somsa* (*Citrus aurantium* var. aurantium) Peel Powder

Manatsanan Nipanram[1], Kittisak Thampitak[1], Uangporn Sangkod[1] and Noraphat Hwanhlem[1]*

[1] Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand
*Corresponding author: noraphath@nu.ac.th
(Received August 3, 2021; Revised September 25, 2021; Accepted September 28, 2021)

## Abstract

This study was performed to evaluate the chemical properties, total phenolic content, antioxidant activity, and inhibition of domestic animal related bacteria of dried *Somsa* (*Citrus aurantium* var. aurantium) peel powder (DSP). The pH and total soluble solid of DSP diluted with distilled water at 1:10 ratio (w/v) were 3.91±0.11 and 3.57±0.12 °Brix, respectively. The total titratable acidity, total phenolic content and antioxidant activity of diluted DSP were 0.14±0.04%,1,677.34±21.23 mg GAE/100g and 4,604.54±49 mg/100 g, respectively. Inhibition of pathogenic bacteria (*Escherichia coli* CIP 76.24, *Staphylococcus aureus* CIP 75.25, *Salmonella* Typhimurium CIP 58.58, *Listeria innocua* CIP 80.11$^{T}$) and lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum* TISTR 926, *Pediococcus acidilactici* V202, *Enterococcus faecium* C707, *Enterococcus faecalis* CF1GI 15) of DSP extract was conducted by agar well diffusion assay. Our results found that *E. coli* CIP 76.24 was inhibited by DSP extract, whereas other tested bacteria were not. This study indicated that DSP has the potentiality to be applied as a feed additive because it contains phenolic content, antioxidant activity, and inhibition efficiency of the growth of *E. coli*.

**Keywords**: Phenolic compound, Antioxidant, *Citrus aurantium*, Pathogenic bacteria, Lactic acid bacteria

## บทนำ

ความเครียดของสัตว์เลี้ยงเป็นปัญหาหนึ่งในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ ซึ่งเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น การเคลื่อนย้ายที่อยู่ การปรับเปลี่ยนสูตรอาหาร สภาพอากาศที่ร้อนหรือหนาวเกินไป การปนเปื้อนของแบคทีเรียในโรงเรือนหรืออาหารสัตว์ เป็นต้น ส่งผลให้ร่างกายสัตว์มีการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติซอล (cortisol) มากเกินไปและกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งเป็นอะตอมหรือกลุ่มอะตอมที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว ไม่เสถียรและมีพลังงานสูง มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา ก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ในร่างกายของสัตว์เลี้ยง อนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ รวมถึงทำลายโครงสร้างและทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์ส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่าง ๆ ในร่างกายสัตว์ ส่งผลให้สัตว์เลี้ยงเกิดความเครียด แต่อนุมูลอิสระถูกกำจัดได้โดยสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ชนิดหนึ่ง สามารถพบได้ในพืชหลากหลายชนิด เช่น ขมิ้น พริก ขิง ใบชา กานพลู กะเพรา ตะไคร้ และส้ม เป็นต้น ซึ่งการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายรูปแบบ โดยโมเลกุลของสารต้านอนุมูลอิสระจะเข้าไปทำปฏิกิริยาโดยการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ แล้วทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง และไม่เกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ เนื่องจากโมเลกุลของสารต้านอนุมูลอิสระมีความเสถียร ถือได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระเป็นตัวขจัดปฏิกิริยาลูกโซ่ที่จะเข้าไปทำลายโมเลกุลสารในร่างกายสัตว์ ชะลอและป้องกันการเสื่อมสภาพของเซลล์ (รัตนาภรณ์ และคณะ, 2561) นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบฟีนอลิกสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้อีกด้วย (Esekhiagbe et al., 2009; Miklasiŕska-Majdanik et al., 2018) เมื่อมีปริมาณฟีนอลิกมากพอก็จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อสูงตามไปด้วยเช่นกัน โดยมีกลไกในการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำลายเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (cytoplasmic membrane) และโปรตีนที่เป็นเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane protein) (Hayriye et al., 2015)

ส้มซ่า (*Citrus aurantium* L.) อยู่ในวงศ์ Rutaceae มีชื่อสามัญว่า Sour orange, Bitter orange, Bigarade, Seville orange ชาวกะเหรี่ยงในจังหวัดแม่ฮ่องสอนเรียกซาอ้อ ส่วนจังหวัดตรังเรียกว่า ส้มจังกระ เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง มีหนามยาวตามลำต้น ใบประกอบแบบลดรูป เหลือใบย่อยใบเดียว ใบหนาเป็นมัน มีต่อมน้ำมันอยู่ทั่วไป ก้านใบมีปีก ดอกสีขาว มีกลิ่นหอม ผลกลมขนาดใกล้เคียงกับผลมะนาว เปลือกหนา เปลือกนอกเป็นสีเขียวอมน้ำตาล มีลักษณะเปลือกตะปุ่มตะป่ำ เนื้อในคล้ายส้มโอ รสเปรี้ยวอมหวาน ชาวบ้านจึงนำน้ำส้มซ่ามาใช้ในการประกอบอาหารแทนมะนาว และนำเปลือกมาปรุงแต่งกลิ่นของอาหาร มีรายงานการวิจัยพบว่าน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดเมทานอล (methanol) จากเปลือกผล ใบ ดอก เมล็ดรวมทั้งน้ำของส้มซ่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ชมัยพร และคณะ, 2560) ส้มซ่ามีแหล่งกำเนิดมาจากทางตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดียและพื้นที่ที่ติดกับพม่าและจีน แล้วแพร่กระจายไปทางตะวันออกเฉียงเหนือยังญี่ปุ่น และทางตะวันตกผ่านอินเดียไปยังตะวันออกกลางแล้วต่อไปยังยุโรป มีการกระจายอย่างรวดเร็วในเขตเมดิเตอร์เรเนียนหลายพันปีมาแล้ว และพบว่าปลูกอย่างแพร่หลายในสเปน ปัจจุบันมีการปลูกทั่วไปทั้งในเขตร้อนและกึ่งร้อน แต่พบน้อยในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ส้มซ่าสามารถใช้สำหรับป้องกันและรักษาโรคหลายอย่าง (Pratama et al., 2019) เช่น ต้านมะเร็งปอด (Lee et al., 2012), รักษาอาการซึมเศร้า วิตกกังวล (Xing et al., 2015), ต้านเบาหวาน (Campbell et al, 2006) และลดอาการระคายเคืองกระเพาะอาหาร (Moraes et al., 2009) นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* Typhimurium และ *S. aureus* ได้อีกด้วย (Ellouze et al., 2012; Karabıyıklı et al., 2014) โดยองค์ประกอบทางเคมีของส้มซ่าประกอบด้วยวิตามิน แร่ธาตุ สารประกอบฟีนอลิกและเทอร์ปีนอยส์ ซึ่งฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ถือเป็นสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ที่มีความสำคัญทางสรีรวิทยาและเภสัชวิทยา ซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพ มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนแอโรมาติก

(aromatic ring) ที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) รวมอยู่ในโมเลกุล ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป สามารถละลายในน้ำได้ ส่วนใหญ่มักพบอยู่รวมกับน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) ได้แก่ flavonol, flavonone, flavone, isoflavone, flavonol catechin และ anthocyanins (Suntar et al., 2018)

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีแนวคิดในการนำเปลือกส้มซ่าซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยจากวิสาหกิจชุมชนพัฒนาทรัพยากรชีวภาพเพื่อเศรษฐกิจชุมชนบ้านวังส้มซ่า จังหวัดพิษณุโลก มาศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ปริมาณสารฟีนอลิก กิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งแบคทีเรียในสัตว์เลี้ยง ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารสัตว์ได้ในอนาคต นอกจากนั้นยังเป็นการกำจัดขยะที่เกิดจากกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหย (zero waste) ได้อีกด้วย

## อุปกรณ์และวิธีการ

**1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผงเปลือกส้มซ่าอบแห้ง**

1.1 การเตรียมผงเปลือกส้มซ่าอบแห้ง นำเปลือกส้มซ่าไปอบให้แห้งจนได้น้ำหนักคงที่ด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด แล้วนำไปร่อนด้วยตะแกรงขนาด 100 mesh เก็บผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งที่มีขนาดอนุภาค 100 mesh ใส่ถุงซิป แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนถัดไป

1.2 การหาค่าพีเอช (pH) นำผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งที่ได้จากข้อ 1.1 มาละลายด้วยน้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:5 1:10 และ 1:20 ผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำมาวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter (Ohaus Corporation, Korea)

1.3 วิเคราะห์หาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (Total soluble solids) ด้วยเครื่อง Hand refractometer (ATAGO, Hand Held Refractometer MASTER-53M, Japan) ที่ปรับเทียบมาตรฐานด้วยน้ำกลั่นปรับให้อ่านค่าได้ 0 ก่อนการวัดตัวอย่างทุกครั้ง จากนั้นทำการหยดตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 1.2 จำนวน 1-2 หยดลงบนแผ่นตรวจวัดแล้วปิดฝาเลนส์ และทำการส่องดูค่าหักเหของแสง อ่านค่าที่เส้นแบ่งระหว่างสีขาวกับสีฟ้าแล้วบันทึกผล โดยทำการหาค่าทั้งหมด 3 ครั้ง ซึ่งค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้จะถูกเทียบค่าออกมาเป็น °Brix ซึ่งมีความแม่นยำอยู่ที่ ±0.2% (Magwaza & Opara, 2015)

1.4 การหาปริมาณกรดทั้งหมด (Total titratable acidity) ตามวิธีการของ AOAC (2000) โดยนำผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งที่ได้จากข้อ 1.1 มาละลายด้วยน้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:10 และนำไปกรองด้วยผ้าขาวบางให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นหยดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein) ความเข้มข้นร้อยละ 1 (w/v) ลงไป 2-3 หยด แล้วไตเตรทจนถึงจุดเปลี่ยนสีด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล บันทึกปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ แล้วคำนวณค่าร้อยละของกรดทั้งหมดเทียบกับกรดซิตริกจากสูตร

% Total titratable acidity = (ml of used NaOH × normality of NaOH × 64.04 x100)/(Volume of sample in ml ×1000)

เมื่อ normality of NaOH = 0.1 M
Eq.wt. citric acid = 64.04
Volume of sample = 10 mL

**2. การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกและกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระของผงเปลือกส้มซ่าอบแห้ง**

2.1 เตรียมสารสกัดจากผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งเพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกและกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยชั่งตัวอย่างผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งที่ได้จากข้อ 1.1 นำไปผสมด้วยน้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:10 (w/v) เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วกรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman No.3

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิก (Total phenolic content: TPC) ดัดแปลงจากวิธีของ Kwaw et al. (2018) โดยดูดตัวอย่างสารสกัดผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งที่ได้จากข้อ 2.1 มา 0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 7.5% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์ หลังจากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วย UV-Vis Spectrophotometer (Cert No. BSCC-UV-006/19 Model UV-1800 Bara Scientific CO., LTD.) ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ปริมาณฟีนอลิกรวมหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วย milligram of gallic acid equivalent per milliliter of extract โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

2.3 การศึกษากิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Kwaw et al. (2018) ทำการเตรียมสารละลาย 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical ความเข้มข้น 0.1 mM ในเมทานอล (MeOH) โดยชั่งสาร DDPH 0.0039 กรัม ละลายในเมทานอล 99.9% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร จากนั้นดูดตัวอย่างสารสกัดผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งที่ได้จากข้อ 2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า แล้วดูดตัวอย่างสารละลายมา 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DDPH 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer และนำไปไว้ในที่มืดเป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลานำมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วย UV-Vis Spectrophotometer (Cert No. BSCC-UV-006 / 19 Model UV-1800 Bara Scientific CO., LTD.) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และคำนวณหาค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในหน่วย มิลลิกรัม/100 กรัม โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารทดสอบกับความเข้มข้นของ Trolox ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

**3. การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียแลคติกที่เกี่ยวข้องกับสัตว์เลี้ยงของผงเปลือกส้มซ่าอบแห้ง**

3.1 เตรียมสารสกัดผงเปลือกส้มซ่าอบแห้ง โดยแบ่งออกเป็น 3 วิธี ได้แก่

1) สกัดโดยไม่ใช้ความร้อน โดยนำผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งมาละลายกับน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อด้วยอัตราส่วน 1:10 (w/v)

2) สกัดโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยนำผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งมาละลายกับน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อด้วยอัตราส่วน 1:10 (w/v) แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที

3) สกัดโดยใช้ความร้อนและความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (autoclave) โดยนำผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งมาละลายกับน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อด้วยอัตราส่วน 1:10 (w/v) แล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที

จากนั้นนำสารสกัดที่เตรียมได้จาก 3 วิธีข้างต้นมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.3 แล้วนำไปกรองต่อด้วย syringe filter ขนาด 0.25 ไมครอน เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ เก็บสารสกัดที่ได้ในหลอดไมโครเซนติฟิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนถัดไป

3.2 การกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียแลคติก ทำการกระตุ้นแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *S. aureus* CIP 75.25, *S.* Typhimurium CIP 58.58, *E. coli* CIP 76.24 และ *L. innocua* CIP 80.11$^{T}$ ที่เก็บรักษาไว้ใน glycerol ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว Brain heart infusion (BHI) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยกเว้น *L. innocua* CIP 80.11$^{T}$ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสหรืออุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการกระตุ้นแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* TISTR 926, *P. acidilactici* V202, *E. faecium* C707, *E. faecalis* CF1GI 15 ที่เก็บรักษาไว้ใน glycerol ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส (Souza et al., 2017) ยกเว้น *L. plantarum* TISTR 926 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งแบคทีเรียทั้งหมดจะถูกเลี้ยงในภาวะที่ไม่มีอากาศโดยไม่มีการเขย่า เมื่อแบคทีเรียทั้งหมดเจริญ ทำการกระตุ้นแบคทีเรียทั้งหมดเหมือนเดิมอีก 1 ครั้ง

3.3 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion โดยนำแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *S. aureus* CIP 75.25, *S.* Typhimurium CIP 58.58, *E. coli* CIP 76.24, *L. innocua* CIP 80.11$^{T}$ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (6 log CFU/mL) ที่ถูกกระตุ้นจากข้อ 3.2 มาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar (0.75% agar) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วทิ้งให้อาหารแข็งตัว จากนั้นเจาะหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร แล้วเติมสารสกัดผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งที่เตรียมไว้จากข้อ 3.1 ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร เปิดฝาทิ้งไว้ให้สารสกัดซึมเข้าอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้ตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยกเว้น *L. innocua* CIP 80.11$^{T}$ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสหรืออุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ *L. plantarum* TISTR 926, *P. acidilactici* V202, *E. faecium* C707, *E. faecalis* CF1GI 15 ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (0.75% agar) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว จากนั้นเจาะหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร แล้วเติมสารสกัดผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งที่เตรียมไว้จากข้อ 3.1 ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร เปิดฝาทิ้งไว้ให้สารสกัดซึมเข้าอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้ตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ยกเว้น *L. plantarum* TISTR 926 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการเกิดวงใสในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วรายงานผลเป็นบวก (+) หากมีวงใสของการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคหรือแบคทีเรียแลคติก หรือลบ (-) หากไม่มีวงใสของการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคหรือแบคทีเรียแลคติก

## ผลและวิจารณ์

**1. ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ปริมาณสารฟีนอลิกและกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระของผงเปลือกส้มซ่าอบแห้ง**

การศึกษาค่าพีเอชและปริมาณของแข็งที่ละลายได้ของผงเปลือกส้มซ่าอบแห้ง โดยใช้อัตราส่วนของผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งต่อน้ำกลั่นที่ 1:5 1:10 และ 1:20 พบว่ามีค่าเท่ากับ 3.87±0.12, 3.91±0.11 และ 3.99±0.04 และ 5.27±0.11, 3.57±0.12 และ 1.87±0.11 °Brix ตามลำดับ การศึกษานี้พบว่าการผสมผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งด้วยน้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:5 มีความหนืดมากเกินไปทำให้ไม่เหมาะต่อการนำไปกรอง ในขณะที่การผสมผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งด้วยน้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:20 มีความเจือจางมากเกินไปซึ่งไม่เหมาะต่อการวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณสารฟีนอลิกและกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกใช้ผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งที่ผสมด้วยน้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:10 (w/v) ไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณสารฟีนอลิกและกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.14±0.04 เปอร์เซ็นต์ 1,677.34±21.23 mg GAE/100g และ 4,604.54±49 mg/100g ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 1

**Table 1** Chemical properties of dried *Somsa* (*Citrus aurantium* var. aurantium) peel powder (DSP)

| Chemical properties | DSP to distilled water ratio | | |
|---|---|---|---|
| | 1:5 | 1:10 | 1:20 |
| pH | 3.87±0.12 | 3.91±0.11 | 3.99±0.04 |
| Total soluble solids (°Brix) | 5.27±0.11 | 3.57±0.12 | 1.87±0.06 |
| Total titratable acidity (%) | ND | 0.14±0.04 | ND |
| Total phenolic content (mg GAE/100g) | ND | 1,677.34±21.23 | ND |
| Antioxidant activity (mg/100g) | ND | 4,604.54±49.00 | ND |

GAE: gallic acid equivalent (GAE)/100g extract)

ND = no determination

ปริมาณสารฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ เมื่อปริมาณสารฟีนอลิกสูงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระก็จะสูงตามไปด้วย (ชมัยพร และคณะ, 2560) และการสกัดโดยใช้น้ำ เมทานอล และเอทานอล ก็ล้วนส่งผลต่อปริมาณสารฟีนอลิกและสารต้านอนุมูลอิสระ (Karimi et al., 2012) อย่างไรก็ตามน้ำถือเป็นตัวทำละลายที่ถูกนำมาใช้สำหรับกระบวนการแยกสารอินทรีย์หลายชนิด เนื่องจากมีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพที่เหมาะสมและง่ายต่อการนำไปประยุกต์ใช้ที่สภาวะต่าง ๆ นอกจากนั้นน้ำยังมีราคาถูก มีความปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากที่สุดเมื่อเทียบกับตัวทำละลายอื่น (Hartonen & Riekkola, 2017) ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกใช้น้ำในการสกัด นอกจากนั้น วิธีการและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดก็มีผลต่อปริมาณสารฟีนอลิกและสารต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน (Lou et al., 2014) ซึ่งชมัยพร และคณะ (2560) ได้ศึกษาผลของสภาวะการสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนต่าง ๆ ของส้มซ่าที่สกัดด้วยตัวทำละลาย หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส และต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส พบว่าส่วนสกัดจากเปลือกผลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ความสามารถในการรีดิวซ์ และฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ สูงกว่าส่วนสกัดจากใบ แต่ส่วนสกัดจากใบของส้มซ่ามีปริมาณสารฟลาโว

นอยด์รวมสูงกว่าส่วนสกัดจากเปลือกผลและกิ่งของส้มซ่า ส่วนสกัดจากเปลือกผลและใบที่สกัดโดยการต้มในน้ำเดือดและส่วนสกัดจากกิ่งที่สกัดด้วยน้ำโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าส่วนสกัดที่สภาวะอื่นๆ

**2. ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียแลคติกของสารสกัดผงเปลือกส้มซ่าอบแห้ง**

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียแลคติกด้วยสารสกัดผงเปลือกส้มซ่าอบแห้ง พบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้ง *E. coli* CIP 76.24 ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* CIP 75.25, *S.* Typhimurium CIP 58.58, *L. innocua* CIP 80.11$^{T}$, *L. plantarum* TISTR 926, *P. acidilactici* V202, *E. faecium* C707 และ *E. faecalis* CF1GI 15 ดังแสดงใน Table 2

**Table 2** Inhibition of pathogenic bacteria and lactic acid bacteria of dried *Somsa* (*Citrus aurantium* var. aurantium) peel powder extract

| Indicator strains | Inhibition activity | | |
|---|---|---|---|
| | Non-heat | Boil at 100 °C (40 min) | Autoclave at 121 °C (40 min) |
| Pathogenic bacteria | | | |
| *S. aureus* CIP 75.25 | - | - | - |
| *S.* Typhimurium CIP 58.58 | - | - | - |
| *E. coli* CIP 76.24 | + | + | + |
| *L. innocua* CIP 80.11$^{T}$ | - | - | - |
| Lactic acid bacteria | | | |
| *L. plantarum* TISTR 926 | - | - | - |
| *P. acidilactici* V202 | - | - | - |
| *E. faecium* C707 | - | - | - |
| *E. faecalis* CF1GI 15 | - | - | - |

(+) Presence of the inhibition zone. (-) no inhibition zone.

*E. coli* เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์ที่มีสุขภาพดี ซึ่งปกติแล้วมักไม่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์ อย่างไรก็ตาม *E. coli* บางชนิดเป็นอันตรายและสามารถทำให้เกิดโรคในคนได้ เช่น *E. coli* O157:H7 ซึ่งผลิตสารพิษที่มีชื่อว่า Shiga-toxin (Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC)) และเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อจากสัตว์สู่คน (zoonotic diseases) ซึ่งทำให้มีอาการท้องร่วงเป็นน้ำหรือมีเลือดปน มีไข้ ปวดท้อง คลื่นไส้ และอาเจียน ซึ่งโคและสัตว์เคี้ยวเอื้องอื่น ๆ เป็นแหล่งที่สำคัญที่สุดของ STEC ที่สามารถถ่ายทอดจากสัตว์สู่คน โดยคนส่วนใหญ่สามารถติดเชื้อ STEC จากการกินอาหารที่ทำจากสัตว์และปรุงแบบสุก ๆ ดิบ ๆ การดื่มนมหรือน้ำที่ปนเปื้อนอุจจาระสัตว์ หรือการสัมผัสโดยตรงกับสัตว์ที่ติดเชื้อหรือสิ่งแวดล้อมในฟาร์ม เช่น น้ำ อาหารสัตว์ และสภาพแวดล้อมในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ (Fairbrother & Nadeau, 2006)

Gill & Holley (2006) รายงานว่าสารสกัดจากพืช เช่น Terpenoid, Alkaloid และสารประกอบฟีนอลิกสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนและเอนไซม์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย

และสารภายในเซลล์ไหลออกนอกเซลล์ นอกจากนี้สารดังกล่าวยังสามารถยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์แบคทีเรีย โดยสารสกัดพืชที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำจะทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ไมโตคอนเดรียของแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุให้โครงสร้างเซลล์แบคทีเรียเปลี่ยนแปลงไป รวมถึงความสามารถในการให้สารซึมผ่านเปลี่ยนแปลงไปด้วย (Tiwari et al., 2009) สอดคล้องกับการศึกษาของ Miklasiństka-Majdanik et al., (2018) และ Liu et al., (2020) รายงานว่า สารประกอบฟีนอลิกสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *E. coli* และ *Staphylococcus epidermidis* ได้ โดยมีความเป็นพิษต่อเซลล์และมีผลข้างเคียงต่อสิ่งมีชีวิตในระดับต่ำ ซึ่ง Cano & Arnao (2005) รายงานว่าสารประกอบฟีนอลิกที่พบในพืชนั้นมีทั้งคุณสมบัติที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (lipophilic) ดังนั้นการยับยั้ง *E. coli* ที่พบในการศึกษานี้น่าจะเกิดจากสารประกอบฟีนอลิกส่วนที่ไม่ชอบน้ำของสารที่สกัดได้จากผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งซึ่งอาจทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของ *E. coli* ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วแบคทีเรียแกรมลบจะมีความไวต่อสารต้านเชื้อแบคทีเรียน้อยกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบนั้นอุดมไปด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งทำหน้าที่ในการยับยั้งการซึมผ่านของสารต้านจุลชีพ อย่างไรก็ตาม Marques et al (2017) รายงานว่าสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากแป้งชานอ้อยอะเซโรล่ามีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบเท่ากับหรือสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียของสารประกอบฟีนอลิกนั้นสัมพันธ์กับการยับยั้งเอนไซม์ การเผาผลาญ หรือความซับซ้อนของไอออนโลหะที่จำเป็นต่อการเผาผลาญของแบคทีเรีย โดยสารประกอบฟีนอลิกส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (flavonoid lipophilic) เช่น Quercetin มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ การสร้างสารเชิงซ้อนของโปรตีนนอกเซลล์ โปรตีนที่ละลายน้ำได้และการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และส่งผลให้เกิดกลไกการออกฤทธิ์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ในขณะที่ Puupponen-Pimiä et al. (2001) รายงานว่าสารประกอบฟีนอลิกชนิด Myricetin สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของคน แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Salmonella* sp. ได้ ในขณะที่สารประกอบฟีนอลิกจากคลาวด์เบอร์รี่ ราสเบอร์รี่ และสตรอว์เบอร์รี่สามารถยับยั้ง *Salmonella* sp. ได้เป็นอย่างดี และยังพบว่าสารประกอบฟีนอลิกจากซีบัคธอร์นเบอร์รี่และแบล็คเคอแรนท์มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของสารประกอบฟีนอลิกหรือความไวของแบคทีเรียต่อสารประกอบฟีนอลิกนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับแกรมของแบคทีเรีย แต่ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียและแหล่งและชนิดของสารประกอบฟีนอลิก (Bouarab-Chibane et al., 2019; Puupponen-Pimiä et al., 2001)

## สรุป

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ปริมาณสารฟีนอลิก กิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับสัตว์เลี้ยงของผงเปลือกส้มซ่าอบแห้ง พบว่าผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งมีคุณสมบัติในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารสัตว์ เนื่องจากมีสารฟีนอลิกและสารต้านอนุมูลอิสระที่อาจจะไปช่วยยับยั้ง ชะลอ หรือลดปฏิกิริยาลูกโซ่ภายในร่างกายสัตว์ ส่งผลให้สัตว์เกิดความเครียดน้อยลง ลดอาการเจ็บป่วย ป้องกันหรือยับยั้งการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยเฉพาะ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่มีโอกาสพบในการเลี้ยงสัตว์ ในขณะเดียวกันผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกซึ่งเป็นประโยชน์ต่อร่างกายสัตว์ ดังนั้นผงเปลือกส้มซ่าอบแห้งจึงมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ในการผลิตอาหารสัตว์และ/หรือใช้เลี้ยงสัตว์ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมก่อนนำไปประยุกต์ใช้ เช่น การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการประกอบอาหารสัตว์ การตรวจสอบปริมาณสารฟีนอลิก สารต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้ง

แบคทีเรียในอาหารสัตว์ที่ผลิตได้ หรือการศึกษาประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสัตว์ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีส่วนผสมของผงเปลือกส้มซ่า เป็นต้น

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของคณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร สำหรับความช่วยในการวิจัยและขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ฯ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัยในครั้งนี้

## เอกสารอ้างอิง

ชมัยพร รอดกลิ่น, เอกรัฐ ศรีสุข, และกล่าวขวัญ ศรีสุข. (2560). ผลของสภาวะการสกัดต่อปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกสารประกอบฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนต่าง ๆ ของส้มซ่า. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 22(1), 211-225.

รัตนาภรณ์ จันทร์ทิพย์, นริศรา ไล้เลิศ, วิวัฒน์ หวังเจริญ, เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, และดวงพร อมรเลิศพิศาล. (2561). Effect of solvents extraction on polyphenolic content and antioxidant activity of *Rhizoclonium hieroglyphicum* extract (รายงานการประชุมวิชาการระดับชาติประจำปี 2561). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

AOAC. 17th edn, 2000, Official method 942.15 Acidity (Titratable) of fruit products read with A.O.A.C official method 920. 149. Preparation of test sample.

Bouarab-Chibane, L., Forquet, V., Lantéri, P., Clément, Y., Léonard-Akkari, L., Oulahal, N., Degraeve, P., & Bordes, C. (2019). Antibacterial properties of polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) models. *Frontiers in Microbiology*, 10, 829.

Campbell, J.I.A., Mortensen, A., & Mølgaard, P. (2006). Tissue lipid lowering-effect of a traditional Nigerian anti-diabetic infusion of *Rauwolfia vomitoria* foilage and *Citrus aurantium* fruit. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(3), 379–386.

Cano, A., & Arnao, M.B. (2005) Hydrophilic and lipophilic antioxidant activity in different leaves of three lettuce varieties. *International Journal of Food Properties*, 8(3), 521-528.

Ellouze, I., Abderrabba, M., Sabaou, N., Mathieu, F., Lebrihi, A., & Bouajila, J. (2012). Season's variation impact on *Citrus aurantium* leaves essential oil: Chemical composition and biological activities. *Journal of Food Science*, 77(9), T173-180.

Esekhiagbe, M., Agatemor, M.U. & Agatemor, C. (2009). Phenolic content and antimicrobial potentials of *Xylopia aethiopica* and *Myristica argentea*. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 28, 159-162.

Fairbrother, J. M., & Nadeau, E. (2006). *Escherichia coli*: On-farm contamination of animals. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, 25(2), 555–569.

Gill, A.O., & Holley, R.A. (2006). Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology,* 106, 1-9.

Hartonen, K., & Riekkola, M.-L. (2017). Chapter 2—Water as the first choice green solvent. In F. Pena-Pereira & M. Tobiszewski (Eds.), *The application of green solvents in separation processes* (pp. 19–55). Elsevier.

Hayriye, C.K. & Melissa, C.N. (2015). Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia coli. Food Bioscience*, 11, 8-16.

Karabıyıklı, Ş., Değirmenci, H., & Karapınar, M. (2014). Inhibitory effect of sour orange (*Citrus aurantium*) juice on *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*. *LWT - Food Science and Technology*, 55(2), 421–425.

Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., Oskoueian, A. & Jaarar, H.Z. (2012). Phenolic compounds characterization and biological activities of *Citrus aurantium* bloom. *Molecules,* 17, 1203-1218.

Kwaw, E., Ma, Y., Tchabo, W., Apaliya, M.T., Wu, M., Sackey, A.S., Xiao, L. & Tahir, H.E. (2018). Effect of lactobacillus strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice. *Food Chemistry,* 250, 148-154.

Lee, D.-H., Park, K.-I., Park, H.-S., Kang, S.-R., Nagappan, A., Kim, J.-A., Kim, E.-H., Lee, W.-S., Hah, Y.-S., Chung, H.-J., An, S.-J., & Kim, G.-S. (2012). Flavonoids Isolated from Korea *Citrus aurantium* L. induce G2/M phase arrest and apoptosis in human gastric cancer AGS cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,* Article ID 515901.

Liu, J., Du, C., Beaman, H. T., & Monroe, M. B. B. (2020). Characterization of phenolic acid antimicrobial and antioxidant structure–property relationships. *Pharmaceutics*, 12(5), 419.

Lou, N. S., Lai, C. Y., Hsu, S. Y. & Ho, T.C. (2014). Flavonoid compositions and antioxidant activity of calamondin extracts prepared using different solvents. *Journal of Food and Drug analysis,* 22, 290-295.

Magwaza, L.S. & Opara, U.L. (2015). Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products. *Scientia Horticulturae,* 184, 179-192.

Marques, T. R., Caetano, A. A., Rodrigues, L. M. A., Simão, A. A., Machado, G. H. A., & Corrêa, A. D. (2017). Characterization of phenolic compounds, antioxidant and antibacterial potential the extract of acerola bagasse flour. *Acta Scientiarum. Technology*, 39(2), 143–148.

Moraes, T. M., Kushima, H., Moleiro, F. C., Santos, R. C., Rocha, L. R. M., Marques, M. O., Vilegas, W., & Hiruma-Lima, C. A. (2009). Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: Role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chemico-Biological Interactions*, 180(3), 499–505.

Miklasińska-Majdanik, M., Kępa, M., Wojtyczka, R. D., Idzik, D., & Wąsik, T. J. (2018). Phenolic compounds diminish antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* clinical strains. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(10), 2321.

Pratama, M. D., Premjet, S., Choopayak, C., & Premjet, D. (2019). Chemical composition and antioxidant activities of essential oil from *Somsa* (*Citrus aurantium* L.) in Phitsanulok province, Thailand. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 24(1), APST-24-01-02 (8 pages).

Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., & Oksman-Caldentey, K.-M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 494–507.

Souza, E. C., Azevedo, P. O. de S. de, Domínguez, J. M., Converti, A., & Oliveira, R. P. de S. (2017). Influence of temperature and pH on the production of biosurfactant, bacteriocin and lactic acid by *Lactococcus lactis* CECT-4434. *CyTA - Journal of Food*, 15(4), 525–530.

Suntar, I., Khan, H., Patel, S., Celano, R., & Rastrelli, L. (2018). An overview on *Citrus aurantium* L.: Its functions as food ingredient and therapeutic agent. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 7864269.

Tiwari, B.K., Valdramidi, V.P., O'Donnel, C.P., Muthukumarappan, K., Bourke, P. & Cullen, P.J. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 57, 5987-6000.

Xing, H., Zhang, K., Zhang, R., Shi, H., Bi, K., & Chen, X. (2015). Antidepressant-like effect of the water extract of the fixed combination of *Gardenia jasminoides*, *Citrus aurantium* and *Magnolia officinalis* in a rat model of chronic unpredictable mild stress. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 22(13), 1178–1185.