

การใช้อัลตราโซนิกช่วยสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากกระเทียมเพื่อยับยั้ง
การเจริญของเชื้อ *Escherichia coli*



สุพิชญ์ชญา กลั่นทะกะสุวรรณ

ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2562

การใช้อัลตราโซนิกช่วยสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากกระเทียมเพื่อยับยั้ง
การเจริญของเชื้อ *Escherichia coli*



สุพิชญ์ชญา กลั่นทะกะสุวรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การใช้อัลตราโซนิกช่วยสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากกระเทียมเพื่อยับยั้ง
การเจริญของเชื้อ *Escherichia coli*

สุพิชญ์ชญา กลั่นทะกะสุวรรณ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หยาดฝน ทนงการกิจ)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.จตุรภัทร วาฤทธิ์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา นาคประสม)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร

(รองศาสตราจารย์ ดร.จตุรภัทร วาฤทธิ์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ชื่อเรื่อง	การใช้อัลตราโซนิกช่วยสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากกระเทียมเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Escherichia coli</i>
ชื่อผู้เขียน	นางสาวสุพิชญ์ชญา กลั่นทะกะสุวรรณ
ชื่อปริญญา	วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หยาดฝน ทนงการกิจ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้อัลตราโซนิกช่วยสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากกระเทียม ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และความคงตัวของสารเก็บรักษา โดยนำกระเทียมมาสกัดด้วยความถี่ 28 45 และ 100 กิโลเฮิร์ต อุณหภูมิ 20 30 และ 40 องศาเซลเซียส และเวลาในการสกัดที่ 20 40 และ 60 นาที พิจารณาจากปริมาณสารอัลลิซินที่สกัดได้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดมากที่สุด คือ การสกัดที่ความถี่ 45 กิโลเฮิร์ต อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเวลาในการสกัด 40 นาที มีปริมาณสารอัลลิซินเท่ากับ 6.29 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี Broth dilution method พบว่ามีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Minimal inhibition concentration: MIC₉₀) เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 97.75 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาความคงตัวของสารอัลลิซินระหว่างการรักษาที่อุณหภูมิ 4 27 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณสารอัลลิซินที่ลดลงเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับศูนย์โดยมีค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับ (k) เท่ากับ -0.105 -0.123 และ -0.592 และมีค่าครึ่งชีวิตของปฏิกิริยาเท่ากับ 21 17 และ 4 วันตามลำดับ

คำสำคัญ : อัลลิซิน, การสกัด, จลนศาสตร์, อัลตราโซนิก, ความคงตัว

Title	ULTRASONIC-ASSISTED EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM GARLIC FOR GROWTH INHIBITION OF <i>Escherichia coli</i>
Author	Miss Suphitchaya Kalantakuwan
Degree	Master of Engineering in Food Engineering
Advisory Committee Chairperson	Assistant Professor Dr. Yardfon Tanongkankit

ABSTRACT

This research aimed to investigate the optimum condition for using ultrasonic-assisted extraction of a bioactive compound from garlic, ability to inhibit *E. coli* and stability during storage. Extracting garlic with the frequency of 28, 45 and 100 kHz, the temperature of 20, 30 and 40°C and the extraction time of 20, 40 and 60 minutes. Based on allicin content, it was found that the optimum extraction condition was extracted at 45 kHz, 30°C and 40 min with allicin content of 6.29±0.01 mg/ml. Then, the extract was tested for inhibition of *E. coli* using the broth dilution method. It was found that the minimal inhibition concentration (MIC₉₀) at 12.5 µg/ml was able to inhibit the growth of *E. coli* for 97.75%. The study on the stability of allicin during storage at 4, 27 and 40°C showed that the reduced allicin content was in accordance with the zero-order reaction. A reaction rate constant (k) was -0.105, -0.123 and -0.592 with a half-life value of 21, 17 and 4 days, respectively.

Keyword : Allicin, Degradation, extraction, Kinetic, Ultrasonic, Stability

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นผลงานที่ผู้วิจัยได้ทุ่มเทความตั้งใจ สติปัญญา จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความอนุเคราะห์ คำแนะนำและความช่วยเหลือจากบุคคลหลายฝ่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หยาดฝน ทนงการกิจ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่า ให้ความรู้ คำแนะนำ และคำปรึกษาในการวางแผนดำเนินการทดลอง ตลอดจนช่วยสนับสนุนวัสดุ อุปกรณ์สำหรับใช้ในการดำเนินงานจนกระทั่งงานทุกอย่างสำเร็จลุล่วงจึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จตุรภัทร วาฤทธิ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา นาคประสม กรรมการที่ปรึกษา และอาจารย์ประจำหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิตทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขจนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จออกมาอย่างสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณครอบครัว คุณแม่พัชรกัญญ์ ภัทร์จิราภักดิ์ คุณพ่อฐานวัฒน์ กลั่นทะกะสุวรรณ และคุณลุงวิกรม กลั่นทะกะสุวรรณ ที่ให้การอบรม ส่งเสริมการศึกษา เป็นกำลังใจที่ดีและให้คำปรึกษาในด้านต่างๆ จนทำให้ผู้จัดทำประสบความสำเร็จในการเรียน

สุดท้ายขอขอบคุณคุณคุณรุ่นพี่ เพื่อน และน้อง สาขาวิศวกรรมอาหารทั้ง ป.โท และป.เอก ไม่ว่าจะป็นพี่วรลักษณ์ สุริวงษ์ พี่ศรัลย์ภักดิ์ ชำนาญ พี่พันธ์ลพ สินธูยา พี่นราธิป สุจินดา พี่รุฬห์รัชย์ ไทยสมัคร พี่สกาเวือน แก้วคำ และ Nur Farhana Abd Radman ที่ได้ให้คำแนะนำ ช่วยสอนในเรื่องต่างๆ และให้กำลังใจ จนกระทั่งผู้จัดทำได้ประสบความสำเร็จในการทำวิทยานิพนธ์ได้อย่างสมบูรณ์

สุพิชญ์ชญา กลั่นทะกะสุวรรณ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....ค	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ง	ง
กิตติกรรมประกาศ.....จ	จ
สารบัญ.....ฉ	ฉ
สารบัญตาราง.....ณ	ณ
สารบัญภาพ.....ญ	ญ
บทที่ 1 บทนำ..... 1	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1	1
วัตถุประสงค์ของการศึกษา..... 3	3
ขอบเขตการทำงาน..... 4	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 4	4
บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและการตรวจเอกสาร..... 5	5
ความรู้เกี่ยวกับกระเทียม..... 5	5
การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์และการกระจายพันธุ์ของกระเทียม..... 5	5
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกระเทียม..... 6	6
ส่วนประกอบ และสารสำคัญของกระเทียม..... 7	7
สารอัลลิซิน (Allicin)..... 8	8
การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์..... 10	10
เชื้อจุลินทรีย์..... 11	11
การสกัดสารจากพืช..... 12	12
การสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก..... 16	16

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Absorption Spectrophotometer)	21
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	23
บทที่ 3 วิธีการวิจัย.....	25
อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	25
การทดลองที่ 1 การสกัดและคำนวณสารอัลลิซินจากกระเทียม.....	27
วิธีการเตรียมตัวอย่างการทดลอง	27
การสกัดแบบดั้งเดิม.....	27
การสกัดด้วยอัลตราโซนิค.....	27
การวิเคราะห์ปริมาณสารอัลลิซินในกระเทียม	28
การคำนวณหาสารอัลลิซิน.....	28
การทดลองที่ 2 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้ง การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>E.coli</i>	29
การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ.....	29
การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์.....	29
การทดลองที่ 3 การศึกษาความคงตัวของสารอัลลิซินในระหว่างการเก็บรักษา.....	30
แผนการดำเนินงาน	31
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	32
ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้อัลตราโซนิคช่วยสกัดสารอัลลิซินจากกระเทียม	32
ผลการศึกษาการสกัดด้วยวิธีอัลตราโซนิคและวิธีดั้งเดิม	37
การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>E. coli</i>	38
ผลการศึกษาความคงตัวของอัลลิซินระหว่างการเก็บรักษา	40
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ.....	44
สรุปผลการศึกษา	44
ข้อเสนอแนะ	44

บรรณานุกรม	45
ภาคผนวก	52
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	53
ภาคผนวก ข การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	58
ภาคผนวก ค เอกสารเผยแพร่งานวิจัย	60
ประวัติผู้วิจัย	65



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ปริมาณสารอัลลิซินที่สกัดได้จากกระเทียมพันธุ์เชียงใหม่ในแต่ละปัจจัย	36
ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดจากกระเทียมต่อการยับยั้งเชื้อ <i>E. coli</i> ATCC 25922 โดยวิธี Optical density assay (OD600).....	38
ตารางที่ 3 อัตราคงที่ (k) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของปฏิกิริยาอันดับศูนย์ ปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง และปฏิกิริยาอันดับสอง.....	43



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะของ (ก) Soft neck garlic และ (ข) Hard neck garlic.....	6
ภาพที่ 2 ลักษณะของกระเทียม.....	7
ภาพที่ 3 ลักษณะโครงสร้างของอัลลิซิน.....	8
ภาพที่ 4 ปฏิกริยาการเกิดอัลลิซิน.....	8
ภาพที่ 5 ลักษณะของเชื้อ <i>E. coli</i> ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	11
ภาพที่ 6 ลักษณะการสารถสารด้วยวิธีการหมัก.....	12
ภาพที่ 7 การสกัดสารด้วยวิธีกลั่นด้วยน้ำร้อน.....	13
ภาพที่ 8 การสกัดสารด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ.....	14
ภาพที่ 9 การสกัดสารด้วยตัวทำละลาย.....	14
ภาพที่ 10 การสกัดสารแบบซอกท์เลต.....	15
ภาพที่ 11 การเกิดฟองอากาศในตัวกลางเนื่องจากคลื่นอัลตราโซนิก.....	17
ภาพที่ 12 อ่างอัลตราโซนิก.....	18
ภาพที่ 13 อ่างอัลตราโซนิกแบบคัพฮอร์น.....	19
ภาพที่ 14 ลักษณะของฮอร์นชนิดต่างๆ.....	20
ภาพที่ 15 อัลตราโซนิกแบบโพรบ.....	20
ภาพที่ 16 ลักษณะการทำงานของ Spectrophotometer.....	21
ภาพที่ 17 ลักษณะกระเทียมพันธุ์เชียงใหม่ที่ใช้ในการทดลอง.....	25
ภาพที่ 18 เครื่องอัลตราโซนิกแบบอ่างที่ใช้ในการทดลอง.....	25
ภาพที่ 19 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง.....	26
ภาพที่ 21 แผนภูมิการดำเนินงาน.....	31

ภาพที่ 22 ปริมาณสารอัลลิซินทั้งหมดที่สกัดได้ที่ความถี่ 28 45 และ 100 กิโลเฮิร์ต อุณหภูมิ 20 30 และ 40 องศาเซลเซียส และเวลาอัลตราโซนิกที่ (ก) 20 นาที (ข) 40 นาที (ค) 60 นาที.....35

ภาพที่ 23 ปริมาณสารอัลลิซินที่สกัดได้จากกระเทียมด้วยเทคนิคการสกัดแบบอัลตราโซนิก เปรียบเทียบกับการสกัดแบบดั้งเดิม37

ภาพที่ 24 ปริมาณสารอัลลิซินระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ41

ภาพที่ 25 ปริมาณสารอัลลิซินตามอันดับปฏิกิริยา (ก) ปฏิกิริยาอันดับศูนย์ (ข) ปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง และ (ค) ปฏิกิริยาอันดับสอง.....42



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อาหารเป็นปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญของมนุษย์ในการดำรงชีวิต การบริโภคอาหารที่สะอาดและมีคุณภาพปราศจากการปนเปื้อนสารเคมีและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคนั้นย่อมส่งผลที่ดีต่อสุขภาพของผู้บริโภค แต่อย่างไรก็ตามในสภาพแวดล้อมปัจจุบันที่เต็มไปด้วยมลภาวะที่เป็นพิษรวมทั้งรูปแบบการผลิตอาหารที่เปลี่ยนแปลงไปจากการผลิตเพื่อบริโภคเฉพาะในครัวเรือนเป็นการผลิตในปริมาณมากเพื่อการจำหน่ายในระดับอุตสาหกรรม จึงมีการเติมสารเคมีบางชนิดเช่นสารกันเสียเพื่อรักษาคุณภาพของอาหารและยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ส่งผลให้อาหารมีอายุการเก็บและวางจำหน่ายที่ยาวนานขึ้น แต่ในการบริโภคสารเคมีที่เจือปนในอาหารนั้นหากร่างกายได้รับในปริมาณที่มากหรือได้รับติดต่อกันเป็นเวลานานอาจส่งผลเสียต่อสุขภาพร่างกายของผู้บริโภคได้ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการศึกษาการใช้สารสกัดจากพืชและสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แทนการใช้สารเคมีมากขึ้น พบว่าสารสกัดจากพืชและสมุนไพรหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ เช่นสารสกัดสมุนไพรเบญจกานี เปลือกทับทิมและใบคุณสมารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Samonella Typhimurium* ได้ดีกว่าการใช้ Amoxicilin (ประพฤษ และคณะ, 2555) สารสกัดจากใบพริกเผ้วสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (จิราภรณ์ และเรื่อนแก้ว, 2555; วัชรา และศศิธร, 2553) และสารสกัดจากกระเทียมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ได้ (Arora and Kaur, 1999)

กระเทียม (Garlic) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Allium sativum* Linn วงศ์ Alliaceae เป็นพืชหัวสกุลเดียวกับหอมหัวใหญ่ หอมหัวแดงและอยู่ในวงศ์กับต้นลิลี (Lily) กระเทียมเป็นส่วนหัวที่อยู่ใต้ดินและเติบโตขึ้นโดยมีกลีบประมาณ 10-12 กลีบ มีประมาณ 300 สายพันธุ์ทั่วโลก แต่ละพันธุ์จะมีขนาดกลีบ และรสชาติแตกต่างกันไป (Block, 2010) สำหรับกระเทียมนั้นจัดว่าเป็นทั้งอาหาร เครื่องเทศ และสมุนไพร สำหรับอาหารนั้นใช้กันเป็นอย่างมากในภูมิภาคเอเชีย เนื่องจากเป็นพืชหาง่ายรวมถึงสรรพคุณทางยาของกระเทียมเป็นที่รู้จักว่ามีมาอย่างยาวนาน ทั้งยังคงสืบทอดและพัฒนามาจนถึงปัจจุบัน การเลือกรับประทานอาหารที่มีส่วนประกอบของกระเทียมสูงจึงเป็นการกินเพื่อสุขภาพโดยแท้

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสรรพคุณทางยาของกระเทียมนั้นช่วยในการรักษา ป้องกันโรค และฆ่าเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ อาทิเช่น ป้องกันโรคหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง ช่วยป้องกันเกล็ดเลือดแข็งตัว แก้อักเสบ ต้านเชื้อราและโรคผิวหนัง เป็นต้น (Ankri and Mirelman, 1999; Arora and Kaur, 1999; Baghalian et al., 2005) สาเหตุที่กระเทียมสามารถป้องกันและรักษาโรคได้ เนื่องจากกระเทียมประกอบไปด้วยสารออกฤทธิ์สำคัญซึ่งเป็นสารในกลุ่มสารประกอบกำมะถัน (Organosulfur) เช่น อัลลิซาทิน (Allisatin) อัลลิซิน (Allicin) อะโจอิน (Ajoene) และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) เช่น เควอซิทิน (Quercetin) ไอโซเควอซิทริน (Isoquercitrin) เรนูทริน (Reynoutrin) เป็นต้น

อัลลิซิน จัดเป็นสารสำคัญของกระเทียมที่พบมากที่สุด โดยทั่วไปอัลลิซินจะสะสมอยู่ในรูปสารอัลลิอิน (Alliin) แต่เมื่อกระเทียมถูกหั่นหรือสับ เอนไซม์อัลลิเนส (Allinase) จะทำปฏิกิริยากับสารอัลลิอินกลายเป็นอัลลิซิน (Jones et al., 2007; Slusarenko et al., 2008) อัลลิซินมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด (Marchese et al., 2016) ทั้งที่เป็นโปรโตซัว เชื้อรา แบคทีเรียหรือไวรัสบางชนิด โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนเอนไซม์ในจุลินทรีย์จึงสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ มีการทดลองนำอัลลิซินมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Ankri and Mirelman, 1999) *Bacillus subtilis*, *B. cereus* (สุนิดา และคณะ, 2557) นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, *Magnaporthe grisea* และ *Plectosphaerella cucumerina* ได้เป็นอย่างดี (Curtis et al., 2004) ทำให้อัลลิซินถือเป็นยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) จากธรรมชาติ (Ankri and Mirelman, 1999; Slusarenko et al., 2008) แต่อัลลิซินเป็นสารที่ค่อนข้างสลายตัวง่ายทั้งจากการเพาะปลูก การเก็บรักษาหรือกระทั่งวิธีการสกัด (Arzanlou et al., 2015; Olech and Zaborska, 2012) ดังนั้น กระบวนการและเวลาการสกัดที่เหมาะสมจะช่วยรักษาสารอัลลิซินได้

โดยทั่วไปการสกัดสารจากกระเทียมนั้น จะใช้วิธีสกัดแบบเย็นซึ่งเป็นวิธีการที่ไม่ผ่านความร้อน (Lawson and Gardner, 2005) วิธีการนี้สามารถทำได้ง่ายแต่มีข้อเสียที่ต้องรอให้กระเทียมเกิดการทำปฏิกิริยาภายในเพื่อให้ได้สารอัลลิซินออกมาและเมื่อได้สกัดออกมาได้แล้วยังได้ให้ปริมาณที่น้อยและเสี่ยงต่อการสูญเสียสารอัลลิซิน เนื่องจากใช้เวลานานในการรอให้สารออกฤทธิ์และยากต่อการทำให้แห้งตัวได้ ในงานวิจัยนี้จึงได้มีแนวคิดในการศึกษาการสกัดแบบอัลตราโซนิค (Ultrasonic) ที่ช่วยคงคุณภาพของสารสกัดจากกระเทียมและได้ปริมาณสารที่เพิ่มขึ้นโดยใช้เวลาน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดด้วยวิธีดั้งเดิม

การสกัดแบบอัลตราโซนิกนั้นถือว่าเป็นวิธีการที่ช่วยเร่งการสกัด เพื่อเพิ่มปริมาณของสารสกัดที่ต้องการ รักษาคุณสมบัติของสารได้มากและยังมีประสิทธิภาพในการสกัดสารที่มีความคงตัวน้อย เนื่องจากกลไกของการสกัดด้วยอัลตราโซนิกจะทำให้เกิดปรากฏการณ์คาวิตชัน (Cavitation) โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีและทางกายภาพ (จากแรงกล) เนื่องจากฟองอากาศ (Bubbles) ที่เกิดขึ้น ซึ่งการที่ฟองอากาศเกิดขึ้นได้นั้นเนื่องจากโครงสร้างของของเหลวที่ได้รับคลื่นอัลตราโซนิกจะถูกบีบอัด (Compress) และคลายตัว (Stretch) ซ้ำไปมาเป็นจำนวนหลายพันรอบทำให้เกิดฟองอากาศขึ้น และฟองอากาศที่เกิดขึ้นภายในของเหลวนี้อาจสัมผัสกับแรงสั่นที่เกิดจากคลื่นอัลตราโซนิกเป็นระยะและเกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซระหว่างกัน (Atchley and Crum, 1998) เป็นผลให้ฟองอากาศมีขนาดใหญ่ขึ้นไปเรื่อยๆ จนกระทั่งแตกออกในที่สุด จากลักษณะการแตกของฟองอากาศนั้นจะเกิด Microjet ที่มีความแรงมากจนสามารถเจาะทำลายผนังเซลล์ของพืชได้ เมื่อผนังเซลล์ของพืชแตกออกจะทำให้เพิ่มอัตราการถ่ายเทมวลได้ดียิ่งขึ้น

นอกจากนี้วิธีการนี้ยังเป็นวิธีที่ง่ายต่อการทำและสามารถเพิ่มขนาดการผลิตในระดับอุตสาหกรรมหรือเพิ่มการผลิตได้ (Kimbaris et al., 2006) จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการใช้อัลตราโซนิกในการสกัด ช่วยเพิ่มปริมาณสารอินนูลินจากหัวแก่นตะวัน (ชุดิมา และคณะ, 2556) ปริมาณแอนโทไซยานินจากกากเม่า (อรัญญา และคณะ, 2558) นอกจากนี้การสกัดแบบอัลตราโซนิกยังช่วยเพิ่มคุณภาพสารสกัด ค่าการต้านอนุมูลอิสระจากเมล็ดเมลอนสูงกว่าการสกัดแบบซอลกซ์เลต (Bimkr et al., 2013) และช่วยเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลจากผลมะกอกสูงกว่าการหมัก (Deng et al., 2017) แต่การสกัดแบบอัลตราโซนิกต้องคำนึงถึงผลกระทบของตัวแปรต่างๆ เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารสกัดให้ได้มากที่สุด (Xu and Pan, 2013)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาผลของควมถี่ อุณหภูมิและเวลาในการสกัดด้วยอัลตราโซนิกและเปรียบเทียบวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมกับวิธีสกัดแบบอัลตราโซนิก โดยพิจารณาถึงปริมาณสารอัลลิซินที่สกัดได้ รวมถึงความคงตัวของอัลลิซินระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกัน

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้อัลตราโซนิกช่วยสกัดสารอัลลิซินจากกระเทียม
2. การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli*
3. ศึกษาความคงตัวของอัลลิซินระหว่างการเก็บรักษา

ขอบเขตการทำงาน

1. กระจกที่ใช้ในการศึกษาต้องเป็นกระจกไทยพันธุ์เชียงใหม่
2. ทำการสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิกแบบอ่าง
3. ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 เท่านั้น ไม่รวมสายพันธุ์อื่น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแบบอัลตราโซนิกของกระจก
2. ได้ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*
3. ได้อายุการเก็บรักษาของสารอัลลิซิน



บทที่ 2

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและการตรวจเอกสาร

ความรู้เกี่ยวกับกระเทียม

การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์และการกระจายพันธุ์ของกระเทียม

กระเทียม ในภาษาอังกฤษมาจากคำว่า *garleac* ซึ่งมาจากการผสมคำสองคำระหว่างเข้าด้วยกันคือ *gar* หมายถึงหอก (spear) มาจากลักษณะของหัวกระเทียมที่มีลักษณะคล้ายหอก และ *leac* ซึ่งมีรากศัพท์มาจากภาษาแองโกล-แซ็กซอน (Anglo-Saxon) แปลว่าพืช (Plant or herb) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตเอเชียกลางบริเวณประเทศทาจิกิสถาน เติร์กเมนิสถาน อุซเบกิสถาน อัฟกานิสถาน ปากีสถานและทางตอนเหนือของประเทศอิหร่าน โดยมีศูนย์กลางของการกำเนิดอยู่บริเวณตะวันตกเฉียงเหนือของเทือกเขาเทียนชานในบริเวณประเทศคีร์กีซสถานและคาซัคสถานถูกนำเข้าสู่ตะวันออกกลางโดยพ่อค้าและนักเดินทางผ่านเส้นทางสายไหม จากนั้นจึงถูกส่งต่อไปยังแหล่งชุมชนต่างๆ และแพร่กระจายไปทั่วโลก (Block, 2010)

กระเทียมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Allium sativum* Linn. จัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในวงศ์ (Family) Liliaceae สกุล (Genus) *Allium* สามารถจำแนกได้เป็น 5 กลุ่มได้แก่ *Sativum*, *Ophioscorodon*, *Longicuspis*, *Subtropical* และ *Pekinense* พืชในสกุลนี้ประกอบด้วยพืชกว่า 750 species ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มพืชที่เป็นไม้ดอกและไม้ป่า โดยพืชอาหารที่จัดอยู่ในสกุลเดียวกับกระเทียมได้แก่ หอมหัวใหญ่ หอมแดง กุยช่าย และต้นกระเทียมเป็นต้น (Block, 2010)

กระเทียมที่ปลูกเพื่อนำส่วนหัวมาใช้ในการบริโภคในปัจจุบันพบว่ามีอยู่ 2 กลุ่มด้วยกันคือ *Allium sativum* subsp. *Sativum* หรือที่เรียกว่า Soft neck garlic โดยกระเทียมในกลุ่มนี้เมื่อหันส่วนหัวออกตามขวางจะพบว่ามีกลีบจำนวน 10–40 กลีบ เรียงตัวกันเป็นชั้น หลากๆชั้น โดยมีลำต้นขนาดเล็กเป็นแกนกลาง มีกลีบขนาดใหญ่เรียงตัวอยู่ด้านนอกและกลีบขนาดเล็กเรียงตัวอยู่ด้านในของหัวกระเทียม กระเทียมพวก Soft neck จะสร้าง scape สั้นๆ โดยทั่วไปไม่มีช่อดอก บางครั้งจึงเรียกว่า Short-neck garlic ส่วนอีกกลุ่มคือ *Allium sativum* subsp. *Ophioscorodon* หรือเรียกว่า Hard neck garlic เป็นกระเทียมที่มีกลีบจำนวน 6–11 กลีบเรียงเป็นวงเดียวรอบลำต้น เมื่อออกดอกจะมี scape ที่ยาวมาก โดยส่วนของ scape จะม้วนเป็นวงจำนวน 1–3 วง ลักษณะคล้ายกับหางหมู มี bulbils ขนาดเล็กอยู่ที่ส่วนปลายยอด โดยกระเทียมพวก Soft neck จะสามารถเก็บรักษาได้ยาวนานกว่าพวก Hard neck ในขณะที่กระเทียมพวก Hard neck จะสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพอากาศหนาวเย็นได้ดีกว่าพวก Soft neck (Block, 2010; Rosen et al., 2008)



ภาพที่ 1 ลักษณะของ (ก) Soft neck garlic และ (ข) Hard neck garlic

ที่มา: DiscoveryOrganics (2015)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกระเทียม

ราก กระเทียมเป็นพืชที่มีระบบรากวิสามัญ (Adventitious root) เป็นรากแบบพิเศษที่แตกออกจากส่วนฐานที่อยู่ด้านล่างของหัวกระเทียม โดยระบบรากจะแผ่กว้างประมาณ 25 เซนติเมตร และลึกประมาณ 40 เซนติเมตร รอบๆ หัวกระเทียม (Block, 2010)

ลำต้น กระเทียมมีลำต้นเล็กๆ สูงประมาณ 5-6 เซนติเมตร อยู่ตรงตรงกลางของต้นโดยลำต้นของกระเทียมจะมีกาบใบหุ้มอยู่จนมิด

ใบ ลักษณะเป็นใบเดี่ยว รูปยาวแคบ แบน ปลายแหลม โคนใบแผ่เป็นแผ่นและเชื่อมติดกัน หุ้มรอบใบอ่อนกว่าด้านในลักษณะคล้ายลำต้นเทียม

ดอก ดอกของกระเทียมจะออกเป็นช่อตรงส่วนปลายของก้านดอก โดยก้านดอกจะแทงขึ้นมาจากส่วนกลางของลำต้น ช่อดอกมีลักษณะคล้ายหัวกระเทียมมีโครงสร้างลักษณะคล้ายใบสั้นๆ ห่อหุ้มอยู่เมื่อยังอ่อนและคลี่ออกเมื่อดอกโตขึ้นดอกกระเทียมมีขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร มีกลีบดอกสีขาว ชมพูหรือม่วงดอกละ 4-6 กลีบเรียงเป็นวงรอบเกสรตัวเมีย กลีบดอกมีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมฐานกว้างปลายกลีบดอกโค้งมนเล็กน้อย

ผล ผลกระเทียมมีลักษณะเป็นกระเปาะสั้นๆ รูปไข่ สีเขียว มีขนาดประมาณ 2.5-6.3 เซนติเมตร เรียกว่า siliqua ภายในประกอบด้วยเมล็ดเป็นจำนวนมากเรียงกันอยู่เป็นแถวเมื่อแก่ กระเปาะจะแตกออกปล่อยเมล็ดกระเทียมกระจายออกไปรอบๆ ต้น

เมล็ด เมล็ดกระเทียมมีขนาดเล็ก สีดำ เจริญอยู่ใน siliqua เมล็ดที่สมบูรณ์สามารถที่จะมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 5 ปี



ภาพที่ 2 ลักษณะของกระเทียม

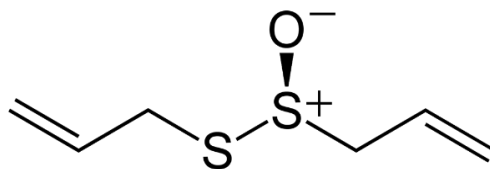
ที่มา: PlantingMan (2018)

ส่วนประกอบ และสารสำคัญของกระเทียม

ส่วนประกอบของกระเทียม 100 กรัม ให้พลังงาน 149 กิโลแคลอรี (kcal) และให้คุณค่าทางอาหารได้แก่น้ำ 58.6 กรัม คาร์โบไฮเดรต 33.1 กรัม โปรตีน 6.4 กรัม ใยอาหาร 2.1 กรัม ไขมัน 0.5 กรัม ทั้งยังอุดมไปด้วยวิตามินและแร่ธาตุหลายชนิดเช่น วิตามินเอ วิตามินบี1 วิตามินบี2 วิตามินซี ธาตุซีลีเนียม ธาตุเหล็ก ธาตุสังกะสี โดยกระเทียมถือเป็นพืชที่มีธาตุซีลีเนียมมากกว่าพืชชนิดอื่นๆ ทั้งยังมีสารอะดีโนซีน (Adenosine) ซึ่งเป็นกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) ที่เป็นตัวสร้าง DNA และ RNA ของเซลล์ในร่างกาย แต่ในส่วนของต้นกระเทียมจะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับดินที่ใช้ในการปลูกด้วย

สารสำคัญในกระเทียมประกอบด้วยสารอินทรีย์ที่มีกำมะถันหลายชนิดเช่น อัลลิอิน (Alliin หรือ 3-allyl-1-cysteine sulfoxide) อัลลิซิน (Allicin หรือ Diallyl disulfide oxide) ไดอัลลิลไดซัลไฟด์ (Diallyl disulfide) เมทิลอัลลิลไตรซัลไฟด์ (Methyl allyl trisulfide) คูมาริน (Coumarin) เอสอัลลิลซิสเตอีน (S-allylcysteine) เป็นต้น (Pszczola, 2002)

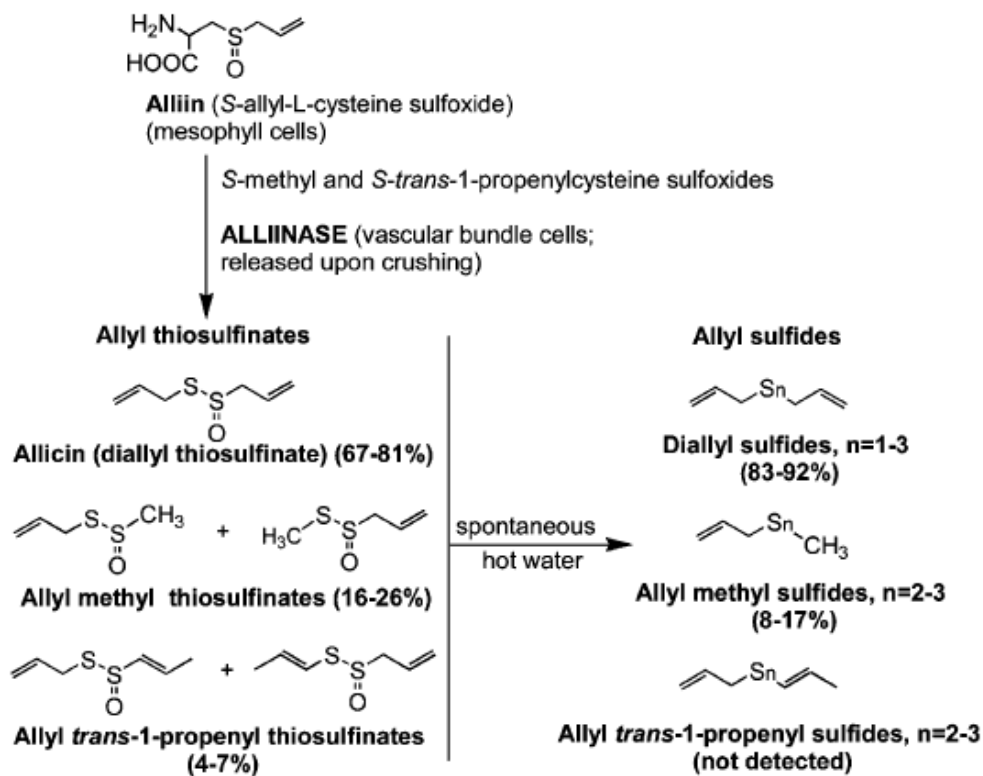
สารอัลลิซิน (Allicin)



ภาพที่ 3 ลักษณะโครงสร้างของอัลลิซิน

ที่มา: Lawson and Gardner (2005)

อัลลิซิน (2-propene-1-sulfinothioic acid S-2-propenyl ester: $C_6H_{10}OS_2$) เป็นสารทุติยภูมิที่พบทั่วไปในพืชสกุล Allium โดยพืชที่พบว่ามีปริมาณอัลลิซินสะสมอยู่มากที่สุดคือกระเทียม โดยทั่วไปอัลลิซินจะสะสมอยู่ในกระเทียมในรูปของอัลลิอิน แต่เมื่อกระเทียมถูกหั่นหรือสับเอนไซม์อัลลิเนส (Allinase: EC 4.4.1.4) ซึ่งเก็บอยู่ในแวคิวโอล (Vacuole) จะทำปฏิกิริยากับอัลลิอินกลายเป็นอัลลิซิน (Jones et al., 2007; Slusarenko et al., 2008)



ภาพที่ 4 ปฏิกิริยาการเกิดอัลลิซิน

ที่มา: Lawson and Gardner (2005)

อัลลิซินมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด (บุญญาวดี และคณะ, 2558) ไม่ว่าจะเป็นโปรโตซัว เชื้อรา แบคทีเรียหรือแม้กระทั่งเชื้อไวรัสบางชนิด โดยอาศัยพันธะไดซัลไฟด์ภายในโมเลกุลของอัลลิซินเข้าไปทำปฏิกิริยากับโปรตีนเอนไซม์หลายชนิดในจุลินทรีย์ คุณสมบัตินี้ทำให้อัลลิซินจัดเป็นยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) จึงสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ โดยที่จุลินทรีย์จะสามารถสร้างความต้านทานจากอัลลิซินได้ยาก (Ankri and Mirelman, 1999; Slusarenko et al., 2008) จึงมีการทดลองนำอัลลิซินมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์หลายชนิดซึ่งมีการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* เป็นต้น พบว่าอัลลิซินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อเหล่านี้ได้เป็นอย่างดี (Ankri and Mirelman, 1999; Arora and Kaur, 1999)

นอกจากนี้อัลลิซินยังสามารถรวมตัวกับวิตามินบี1 (ถูกทำลายได้ง่าย) ได้เป็น Allithiamine (เสถียรกว่าวิตามินบี1) เมื่อเข้าสู่ร่างกายคนและสัตว์แล้วจึงแตกตัวเป็นวิตามินบี1 และอัลลิซิน แล้ววิตามินบี 1 จะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายและใช้ประโยชน์ต่อไป อีกทั้งยังพบว่าอัลลิซินสามารถที่จะช่วยลดคอเลสเตอรอลที่จับอยู่ตามผนังของหลอดเลือดและช่วยลดการเกาะตัวกันของเกล็ดเลือดจึงทำให้เกิดการหมุนเวียนเลือดได้ดีขึ้น สามารถลดความดันเลือดลงได้ (Baghalian et al., 2005) และพบว่าอัลลิซินมีฤทธิ์ในการต้านทานอาการอักเสบและมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระ สามารถที่จะป้องกันการเกิดมะเร็งได้ (Ankri and Mirelman, 1999; ประเสริฐ, 2550) แต่สำหรับคนที่แพ้อาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่อกระเพาะอาหารดังนั้นคนเป็นโรคเกี่ยวกับกระเพาะอาหารก็ไม่ควรรับประทานกระเทียมมากเกินไป

การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

การปนเปื้อนในอาหารสามารถจำแนกได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ สิ่งปนเปื้อนทางเคมี สิ่งปนเปื้อนทางกายภาพและการปนเปื้อนทางชีวภาพ นอกจากปนเปื้อนไปยังอาหารโดยตรงแล้วยังสามารถปนเปื้อนไปยังอุปกรณ์ เครื่องมือ เครื่องจักรต่างๆ ทั้งในอุตสาหกรรมอาหารหรือการอุปโภคบริโภคในชีวิตประจำวัน การปนเปื้อนทางชีวภาพจัดเป็นการปนเปื้อนที่มีอันตรายมากที่สุดและทำให้เสียชีวิตได้ เนื่องจากการปนเปื้อนทางชีวภาพมักเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มองด้วยตาเปล่าไม่เห็นและยังสามารถปนเปื้อนได้ง่ายเพราะจุลินทรีย์มีอยู่ทั่วไปทุกหนทุกแห่งไม่ว่าจะอยู่ในดิน น้ำ อากาศ อาหาร ตามผิวหนังและลำไส้ของมนุษย์

ลักษณะอาการเนื่องมาจากจุลินทรีย์ในอาหาร แบ่งเป็น 2 ลักษณะดังนี้

1. Infection เกิดจากการบริโภคอาหารที่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค เช่น *E. coli*, *Salmonella*, *B. cereus*, *Clostridium*, *L. monocytogenes* เมื่อบริโภคเข้าไปจุลินทรีย์เหล่านี้จะแทรกตัวเข้าไปในผนังลำไส้ แล้วเจริญเติบโตบริเวณนั้น ทำให้ร่างกายมีปฏิกิริยาเกิดเป็นอาการต่างๆ โดยโรคที่พบบ่อยและเกิดจากเชื้อเหล่านี้ เช่น โรคซัลโมเนลโลซิส (Salmonellosis) เกิดจากการได้รับเชื้อ *Salmonella spp.* โรคลิสเตอริโอซิส (Listeriosis) เกิดจากการได้รับเชื้อ *L. monocytogenes* โรคเกี่ยวกับทางเดินอาหารได้แก่โรคท้องเสียถ่ายเป็นเลือด โรคบิดเกิดจากการได้รับเชื้อ *E. coli* และโรคที่เกี่ยวกับระบบประสาทเกิดจากการได้รับเชื้อ *Clostridium* เป็นต้น (วีรานูช, 2552)

2. Intoxication เกิดจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อและสารพิษ (Toxin) ที่จุลินทรีย์สร้างไว้ในอาหาร เช่น Botulinum toxin, Staph. Toxin และ Mycotoxin เป็นต้น หรือเกิดจากสารพิษที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติจะพบในพืชและสัตว์บางชนิด เช่น สารพิษในเห็ดบางชนิด สารพิษจากหอยและปลาทะเลบางชนิด (บุษกร, 2552)

ในการตรวจหรือการหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารหรืออุปกรณ์ต่างๆ นักจุลชีววิทยาจะใช้จุลินทรีย์ดัชนี (Index indicator) เป็นเชื้อบ่งชี้การปนเปื้อนจากสิ่งสกปรกควรมีคุณสมบัติดังนี้

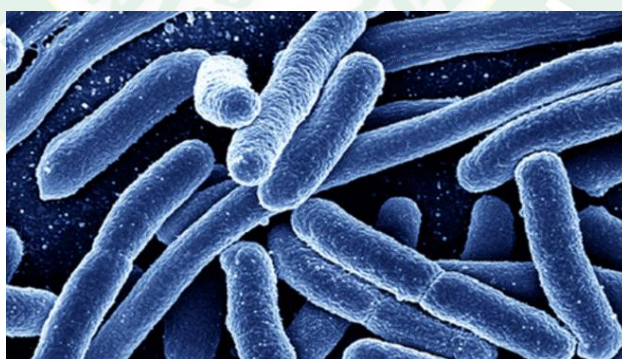
- มีแหล่งที่อยู่เดียวกันกับจุลินทรีย์ที่ก่อโรค
- มีจำนวนแปรผันตามจำนวนของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค
- เป็นเชื้อที่มีความทนทานต่อการถูกทำลายได้ใกล้เคียงกับเชื้อก่อโรค
- ไม่ควรพบในน้ำบริสุทธิ์
- มีวิธีการตรวจที่ง่ายและไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายที่แพงเกินไป

ตัวอย่างเช่นในอุจจาระมีจุลินทรีย์หลายกลุ่มได้แก่แบคทีเรียลำไส้ (Enteric Bacteria) ไวรัสและโปรโตซัว แต่นิยมตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียมากกว่าเพราะมีวิธีการตรวจที่ไม่ยุ่งยาก (บุษกร, 2552)

เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อ *Escherichia coli* หรือ *E. coli* จัดอยู่ในจิ้นัส *Escherichia* เป็นจิ้นัสที่อยู่ในตระกูล เอนทอโรแบคทีริเอซี (Family Enterobacteriaceae) เชื้อ *E. coli* เป็น Type species ของจิ้นัสนี้ ถูกพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1885 และถูกจัดเป็นเชื้อที่ไม่อันตรายมีรูปร่างท่อนสั้น เซลล์มีความกว้างประมาณ 0.6 ไมโครเมตรและยาว 2-3 ไมโครเมตร (ภาพที่ 5) เป็นเชื้อแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์และมักจะไม่มีแคปซูล เคลื่อนที่โดยใช้เพอทริคัสแฟลกเจลลา (Paritrichous flagella) ต้องการอากาศแบบแฟกคัลเททีฟแอนแอโรบ (Facultative Anaerobes) มีถิ่นที่อยู่ในลำไส้ของมนุษย์ สัตว์เลื้อยคลาน อีกทั้งยังพบในสิ่งแวดล้อมเช่นน้ำ พืช อากาศและดิน โดยพบในปริมาณสูง (ประมาณล้านเซลล์ต่อกรัม)

E. coli ที่อยู่ในลำไส้ตามปกตินั้นไม่ใช่เชื้อก่อโรคแม้ว่าจะมี *E. coli* บางสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคได้ เชื้อ *E. coli* ถูกเสนอให้ใช้เป็นดรรชนีบ่งชี้การปนเปื้อนของของเสียจากลำไส้มาเป็นเวลานาน ตั้งแต่ค.ศ. 1982 และในปี 1985 จนกระทั่งในปัจจุบันก็ยังเป็นดัชนีที่มีความน่าเชื่อถือที่จะบ่งชี้ความเป็นไปได้ในการปรากฏของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มาจากลำไส้และมีความเชื่อมโยงสูงกับความปลอดภัยของอาหารเนื่องจากแหล่งที่พบเชื้อ *E. coli* มักพบว่าปนเปื้อนในวัตถุดิบที่นำมาผลิตพนักงาน แผลงสัตว์กัดแทะ อุปกรณ์ต่างๆ น้ำและน้ำแข็งในกระบวนการผลิตโดยตรง อีกทั้งเชือนี้ยังเป็นดัชนีที่มีความเฉพาะเจาะจงสูงเนื่องจากกลุ่มของเชื้ออยู่ในระดับสปีชีส์ (Berg, 2008)



ภาพที่ 5 ลักษณะของเชื้อ *E. coli* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

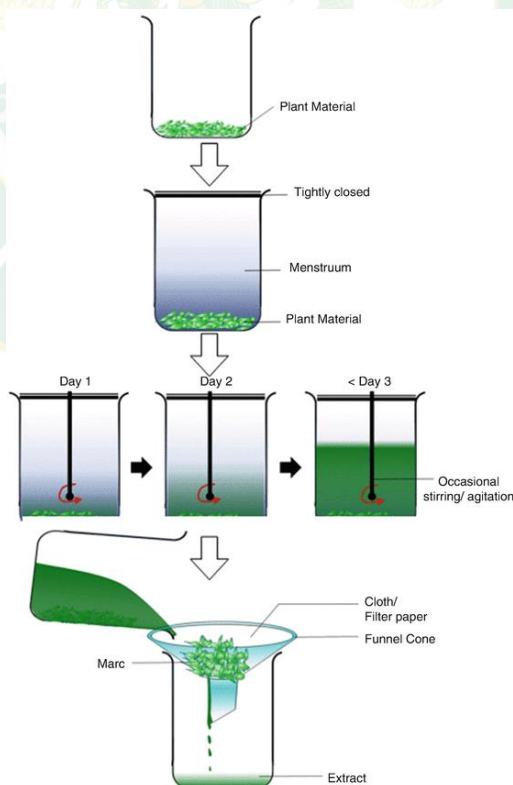
ที่มา: Mundasad (2011)

การสกัดสารจากพืช

การสกัดเป็นวิธีแยกสารที่เป็นของเหลวหรือของแข็งปนกันอยู่ โดยอาศัยสมบัติการละลายของสารและเป็นการแยกสารที่ต้องการออกจากส่วนต่างๆ ของพืชหรือของผสม หลักการสำคัญของการสกัดด้วยตัวทำละลายคือการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารที่ต้องการออกมาให้มากที่สุด เพราะสารแต่ละชนิดจะละลายในตัวทำละลายต่างกันและละลายได้ในปริมาณต่างกัน วิธีที่นิยมนำมาใช้ในการสกัดสารจากพืชมีดังนี้ (Rassem and Nour, 2016)

1. การหมัก (Maceration)

การหมักหรือการแช่เป็นวิธีการสกัดสารจากพืชโดยวิธีการหมักพืชกับตัวทำละลายในภาชนะปิด โดยใช้เวลาค่อนข้างนานเพื่อให้ตัวทำละลายค่อยๆ ละลายสารสกัดจากพืชออกมา อาจมีการเขย่าหรือคนร่วมด้วยและเมื่อครบระยะเวลาหนึ่งของการสกัดจะได้ส่วนของสารสกัดกับกาก (Marc) ออกมาแล้วจึงนำไปกรองสารสกัดออกมาใช้ต่อไป สามารถนำกากที่เหลือไปสกัดซ้ำได้เพื่อให้ได้สารมากที่สุด วิธีนี้ถึงแม้สารจะไม่ถูกความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมากและใช้เวลานาน (อารมณ และคณะ, 2537)

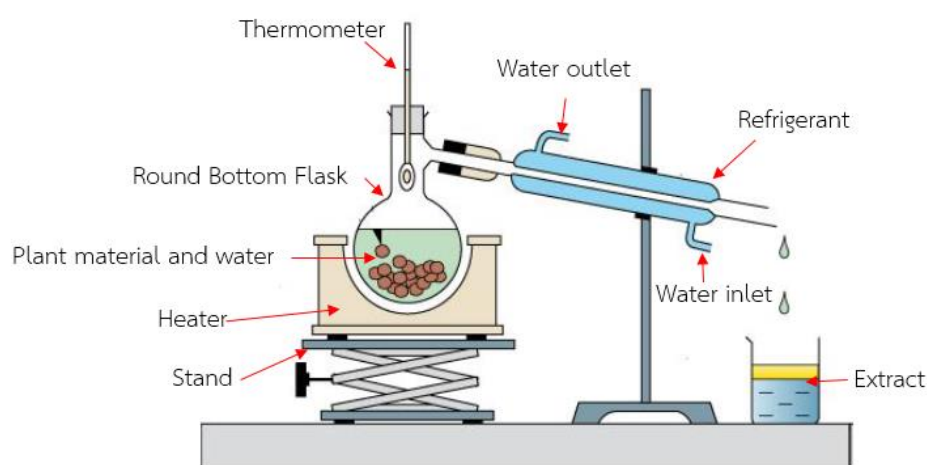


ภาพที่ 6 ลักษณะการสารสกัดสารด้วยวิธีการหมัก

ที่มา: Sasidharan et al. (2018)

2. การกลั่นด้วยน้ำร้อน (Hydro distillation)

การกลั่นด้วยน้ำร้อนเป็นวิธีที่ง่ายที่สุดของการสกัดสารการกลั่นโดยวิธีนี้พื้นที่กลั่นต้องจุ่มในน้ำเดือดทั้งหมดทำให้อาจมีพืชบางชนิดลอยอยู่เหนือน้ำได้ เป็นการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายทำหน้าที่ในการชะล้างสารจากพืชออกมา แต่วิธีการนี้มีปัญหาด้านการควบคุมความร้อนให้สม่ำเสมอเนื่องจากระดับปริมาตรตรงกลางของขวดทดลองมักจะได้รับความร้อนมากกว่าบริเวณอื่น (Rassem and Nour, 2016)

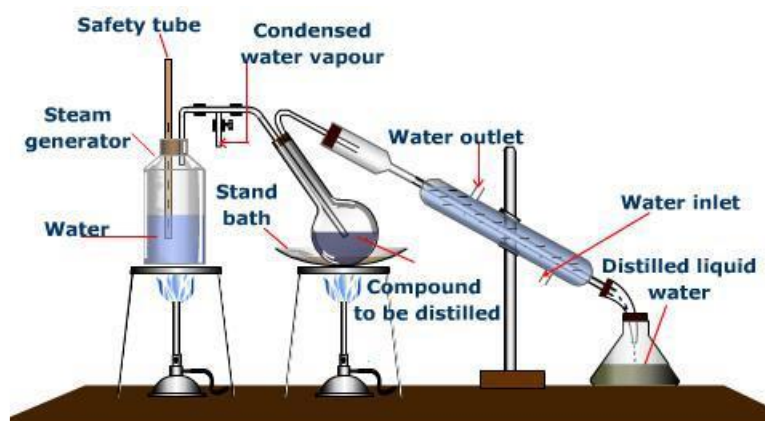


ภาพที่ 7 การสกัดสารด้วยวิธีกลั่นด้วยน้ำร้อน

ที่มา: Rassem and Nour (2016)

3. การกลั่นด้วยไอน้ำ (Steam distillation)

การกลั่นด้วยไอน้ำเป็นเทคนิคอย่างหนึ่งของการสกัดด้วยตัวทำละลายโดยใช้ไอน้ำเป็นตัวทำละลายเพื่อละลายสารและพาสารที่ต้องการออกจากของผสมได้ ส่วนใหญ่การกลั่นไอน้ำมักจะใช้สกัดสารอินทรีย์ออกจากส่วนต่างๆ ของพืชที่อยู่ตามธรรมชาติ หลักการที่สำคัญของการกลั่นด้วยไอน้ำคือสารที่ต้องการสกัดจะต้องระเหยได้ง่าย สามารถให้ไอน้ำพาออกมาจากของผสมได้และสารที่สกัดได้จะต้องไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ (ถ้าของเหลวที่กลั่นได้ละลายน้ำ หรือรวมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ จะต้องนำไปกลั่นแยกอีกครั้งหนึ่ง) หลังจากที่ถูกสกัดด้วยไอน้ำแยกมาจากของผสมแล้วของเหลวจะแยกเป็น 2 ชั้น ชั้นหนึ่งเป็นน้ำอีกชั้นหนึ่งเป็นสารที่ต้องการซึ่งสามารถใช้กรวยแยกแยกออกจากกันได้ (Rassem and Nour, 2016)

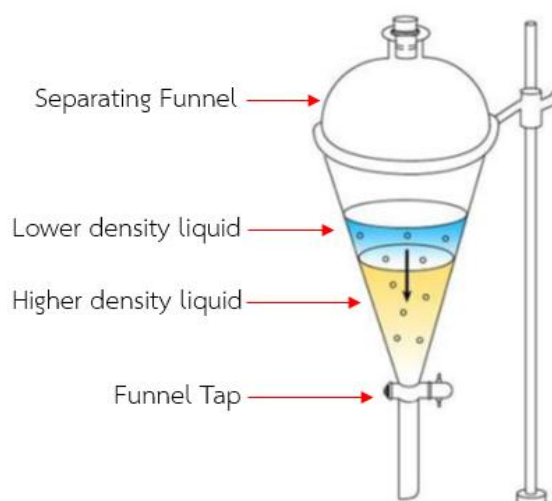


ภาพที่ 8 การสกัดสารด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ

ที่มา: Rassem and Nour (2016)

4. การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

การสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นวิธีแยกสารที่เป็นของเหลวปนกับของเหลวหรือของแข็งปนของแข็ง โดยอาศัยสมบัติการละลายสารและเป็นการแยกสารที่ต้องการออกจากส่วนต่างๆ ของพืชหรือของผสม หลักการสำคัญของการสกัดด้วยตัวทำละลายคือการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารที่ต้องการออกมาให้มากที่สุดเพราะสารแต่ละชนิดจะละลายในตัวทำละลายต่างกันและละลายได้ปริมาณต่างกัน (Rassem and Nour, 2016)

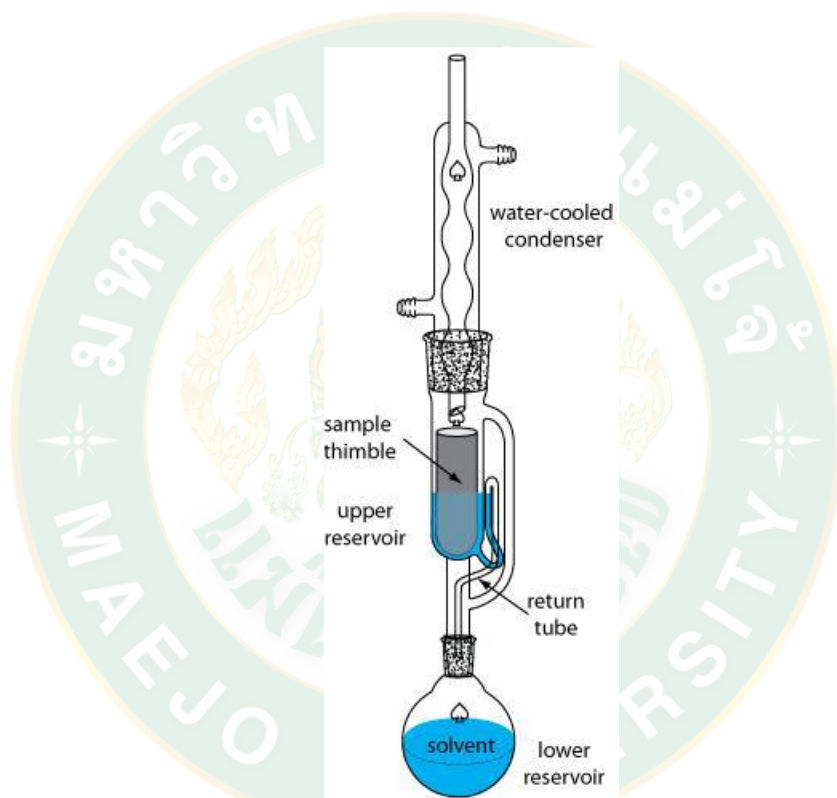


ภาพที่ 9 การสกัดสารด้วยตัวทำละลาย

ที่มา: Rassem and Nour (2016)

5. การสกัดแบบซอกซ์เฮต (Soxhlet extraction)

การสกัดสารด้วยวิธีซอกซ์เฮตถือเป็นวิธีการสกัดสารที่เหมาะสมสำหรับแยกสารอินทรีย์ที่ไม่เสถียรที่ความร้อนสูงออกจากสารผสมที่เป็นของแข็ง หลักการของวิธีนี้จะใช้ตัวทำละลายในปริมาณน้อยเนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารแล้วจะถูกทำให้ระเหยและควบแน่นกลับมาเมื่อเจอรอบหล่อเย็นทำให้สกัดได้อีกเป็นลักษณะหมุนเวียน โดยตัวทำละลายที่เราใส่ลงไปในห้องมือจะหมุนเวียนผ่านสารที่เราต้องการสกัดหลายๆ ครั้ง เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดจนกระทั่งสารที่เราต้องการสกัดออกมามีปริมาณเข้มข้นมากพอ (Rassem and Nour, 2016)



ภาพที่ 10 การสกัดสารแบบซอกซ์เฮต

ที่มา: Rassem and Nour (2016)

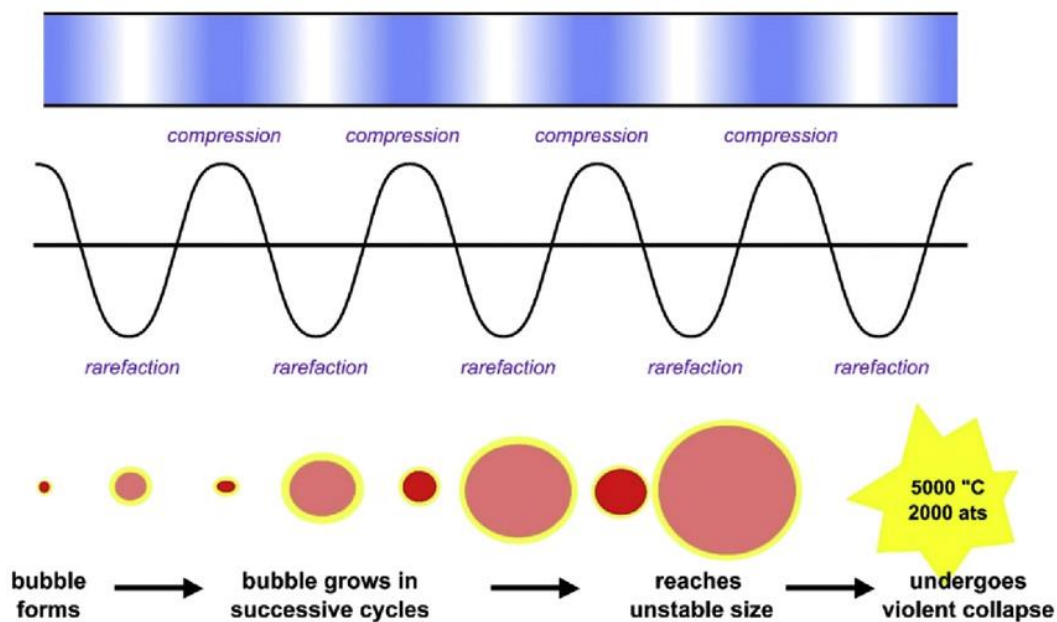
การสกดด้วยคลื่นอัลตราโซนิค

คลื่นอัลตราโซนิค (Ultrasonic waves) หมายถึงพลังงานที่เกิดจากคลื่นเสียงที่มีการสั่นของคลื่นประมาณ 20,000 ครั้งต่อวินาทีหรือสูงกว่าหรือหมายถึงคลื่นความดัน (Pressure waves) ที่มีความถี่ (Frequency) สูงกว่าคลื่นเสียงปกติ โดยทั่วไปแล้วคลื่นเสียงที่มนุษย์ได้ยินนั้นเกิดจากการสั่นสะเทือนของตัวกลางที่ยืดหยุ่น (Elastic medium) ที่มีความถี่อยู่ในช่วง 20-20,000 กิโลเฮิรต์ คลื่นเสียงผ่านเข้าสู่ตัวกลางที่ยืดหยุ่นในลักษณะที่เป็นคลื่นตามยาว (Longitudinal waves) แต่คลื่นเสียงที่ผ่านเข้าไปภายในวัตถุที่เป็นของแข็งอาจอยู่ในลักษณะที่เป็นคลื่นตามยาวหรือคลื่นตามขวาง (Transverse waves)

ในปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากอัลตราโซนิคพบว่าการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหรือในกระบวนการแปรรูปอาหาร โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ได้แก่ การใช้อัลตราโซนิคกำลังต่ำและความถี่สูง (Low power and high frequencies) ซึ่งใช้ในด้านการวิเคราะห์ (Diagnostic ultrasound) เป็นส่วนใหญ่และการใช้อัลตราโซนิคกำลังสูงและความถี่ต่ำ (High power and low frequencies) หรือที่เรียกว่าพาวเวอร์อัลตราซาวด์ (Power ultrasound) ที่มักนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหาร

กลไกในการสกดด้วยอัลตราโซนิคเกิดขึ้นได้เนื่องจากเนื้อเยื่อของพืชที่ประกอบเป็นเซลล์นั้นมีส่วนผนังเซลล์อยู่ชั้นนอกสุดซึ่งจะเป็นตัวต้านทานการสกดได้ การสกดจะประกอบด้วยสองขั้นตอนคือกระบวนการแพร่ผ่านผนังเซลล์ของตัวทำละลายและการละลายสารสำคัญออกจากเซลล์เมื่อผนังเซลล์ถูกทำลายลง ส่วนการสกดพืชแห้งจะเพิ่มอีกหนึ่งกระบวนการคือกระบวนการดูดน้ำกลับ (Hydration and swelling) อัลตราโซนิคทำให้ Swelling index สูงขึ้นดีกว่าการใช้การกวนทางกลธรรมดา อัลตราโซนิคจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการดังกล่าวได้โดยการเกิดปรากฏการณ์คาวิเตชัน

ปรากฏการณ์คาวิเตชัน (Cavitation) คือกระบวนการที่เกิดขึ้นในตัวกลางหรือสารละลายที่ได้รับคลื่นอัลตราโซนิค โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีและทางกายภาพ (จากแรงกล) เนื่องจากฟองอากาศ (Bubbles) ที่เกิดขึ้น ซึ่งการที่ฟองอากาศเกิดขึ้นได้นั้นเนื่องจากโครงสร้างของของเหลวที่ได้รับคลื่นอัลตราโซนิคจะถูกบีบอัด (Compress) และคลายตัว (Stretch) ซ้ำไปมาเป็นจำนวนหลายพันรอบทำให้เกิดฟองอากาศขึ้นดังภาพที่ 12 และฟองอากาศที่เกิดขึ้นภายในของเหลวนี้จะสัมผัสกับแรงสั่นที่เกิดจากคลื่นอัลตราโซนิคเป็นระยะและเกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซระหว่างกัน (Atchley and Crum, 1998) เป็นผลให้ฟองอากาศมีขนาดใหญ่ขึ้นไปเรื่อยๆ จนกระทั่งแตกออกในที่สุด



ภาพที่ 11 การเกิดฟองอากาศในตัวกลางเนื่องจากคลื่นอัลตราโซนิก

ที่มา: Vinatoru et al. (2017)

Frizzell (1988) รายงานว่าควิเตชันสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ควิเตชันแบบถาวร (Stable cavitation) และควิเตชันแบบชั่วคราว (Transient cavitation) ซึ่งแต่ละแบบจะมีผลทำให้พฤติกรรมหรือลักษณะของฟองอากาศที่ได้รับคลื่นอัลตราโซนิกแตกต่างกันออกไป โดยควิเตชันแบบถาวรจะเกิดขึ้นเมื่อฟองอากาศหรือฟองแก๊สเกิดการสั่นแกว่ง (Oscillate) เมื่อได้รับคลื่นอัลตราโซนิกเป็นจำนวนหลายรอบของการสั่นแต่ไม่เกิดการแตกของฟองอากาศดังกล่าวซึ่งฟองอากาศนี้อาจจะเพิ่มขนาดขึ้นจนถึงขนาดเรโซแนนซ์ (Resonance size: เป็นขนาดฟองอากาศที่มีความถี่ธรรมชาติเท่ากับความถี่ในการสั่นแบบบังคับ) ส่วนควิเตชันแบบชั่วคราวนั้น เกิดขึ้นในระหว่างการบีบอัดของฟองอากาศ (Compression phase) ในของเหลวที่ได้รับความเครียด (Tension stress) ที่เกิดขึ้นขณะเริ่มเกิดการขยายตัวของฟองอากาศ มีผลทำให้การแตกของฟองอากาศเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วหรืออาจเกิดจากฟองอากาศเกิดการสั่นแกว่งและขยายขนาดเพิ่มขึ้นในลักษณะคงที่ในระยะเวลาหนึ่งก่อนที่จะแตกออกอย่างรวดเร็วเมื่อฟองอากาศขยายขนาดขึ้นเมื่อถึงขนาดที่จำเพาะ

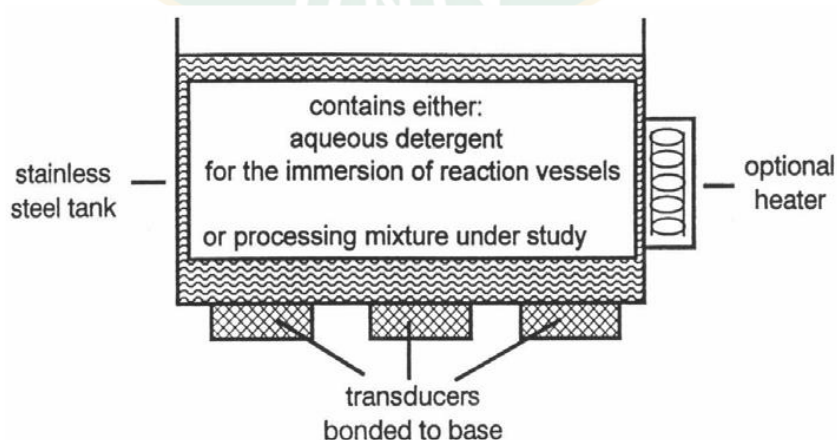
Sala et al. (1995) รายงานว่าในสภาวะที่ฟองอากาศแตกนั้นพบว่าทำให้เกิดอุณหภูมิสูงขึ้นไปถึง 5,000 เคลวิน (K) และความดันสูงถึง 2,000 atm ในบริเวณที่เกิดคลื่นกระแทก (Shock waves) ทั้งนี้เนื่องจากการเกิดการขยายและหดตัวของฟองอากาศนั้นจะเกิดสมดุลขึ้นระหว่างความดันไอน้ำภายในและภายนอกฟองอากาศ และพื้นที่ผิวของฟองอากาศขณะขยายตัวจะมีมากกว่าพื้นที่ผิวของฟองอากาศขณะหดตัวจึงเป็นผลให้การซึมผ่านของอากาศในขณะที่ขยายตัวเกิดขึ้นได้มากกว่าและฟองอากาศนี้จะขยายตัวเพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนรอบความถี่เพิ่มขึ้น โดยอัตราส่วนของการซึมผ่านของ

อากาศในขณะขยายตัวต่ออัตราการซึมผ่านของอากาศในขณะถูกอัดจะเพิ่มมากขึ้นในแต่ละรอบ จนกระทั่งฟองอากาศมีขนาดเรโซแนนซ์ ทำให้ช่องว่างภายในฟองอากาศมีขนาดโตขึ้นอย่างรวดเร็ว ภายในหนึ่งรอบของการสั่นและเนื่องจากพลังงานที่ได้รับจากคลื่นอัลตราโซนิกไม่เพียงพอในการคงสถานะของอากาศ จึงทำให้เกิดการควบแน่น (Condensation) ขึ้นทันทีทันใดโดยโมเลกุลที่ควบแน่นนั้นจะชนซึ่งกันและกันอย่างรุนแรง ทำให้เกิดคลื่นกระแทกขึ้นและเกิดจุดหรือบริเวณเล็กๆ (Suslick, 1988)

จากลักษณะการแตกของฟองอากาศนั้นจะเกิด Microjet ที่มีความแรงมากจนสามารถเจาะทำลายผนังเซลล์ของพืชได้ เมื่อผนังเซลล์ของพืชแตกออกจะทำให้เพิ่มอัตราการถ่ายเทมวลได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้การทำให้ขนาดของตัวอย่างเล็กลงก่อนจะเพิ่มการสัมผัสกับตัวทำละลายและเกิดปรากฏการณ์ควิเตชันได้ง่ายขึ้น Bimakr et al. (2013) ได้ศึกษาการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเมลอนโดยวิธีซอกซ์เลตและการใช้คลื่นอัลตราโซนิก จากการศึกษาพบว่าการใช้คลื่นอัลตราโซนิกช่วยสกัดมีประสิทธิภาพดีกว่าการสกัดด้วยความร้อนโดยช่วยลดเวลาการสกัดลงจาก 6 ชั่วโมงเหลือ 40 นาทีและสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการสกัดด้วยความร้อน

เครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasonic reactor) ที่ใช้อยู่ทั่วไปในปัจจุบันมีความแตกต่างกันตรงที่การออกแบบแหล่งกำเนิดไฟฟ้า แหล่งกำเนิดคลื่นและตัวเครื่องหรือเซลล์ที่เข้าร่วมกับแหล่งกำเนิดคลื่น โดยสามารถแบ่งเป็นชนิดต่างๆ ดังนี้ (Bermudez-Aguirre, 2017)

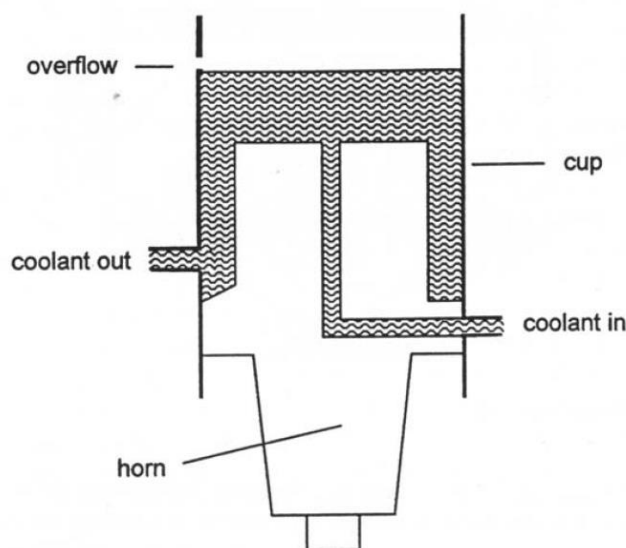
1. อ่างอัลตราโซนิก (Ultrasonic baths) เป็นอุปกรณ์ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายและมีการนำมาใช้เป็นเวลานานแล้วโดยเฉพาะในห้องปฏิบัติการเนื่องจากมีราคาไม่แพงเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องที่ใช้ระบบโพรบ



ภาพที่ 12 อ่างอัลตราโซนิก

ที่มา: Povey and Mason (1998)

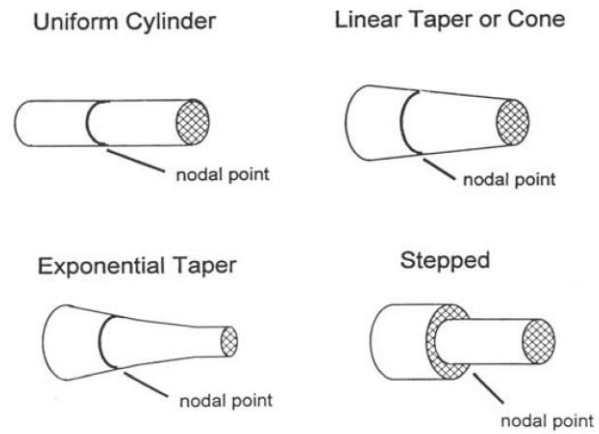
2. อ่างอัลตราโซนิกแบบคัพฮอร์น (Cup horn) เป็นอ่างอัลตราโซนิกที่สร้างพลังงานได้สูงมาก เนื่องจากบริเวณผิวหน้าที่เกิดคลื่นอัลตราซาวนด์ซึ่งติดอยู่กับทรานส์ดีวเซอร์จะสัมผัสโดยตรงกับของเหลว



ภาพที่ 13 อ่างอัลตราโซนิกแบบคัพฮอร์น

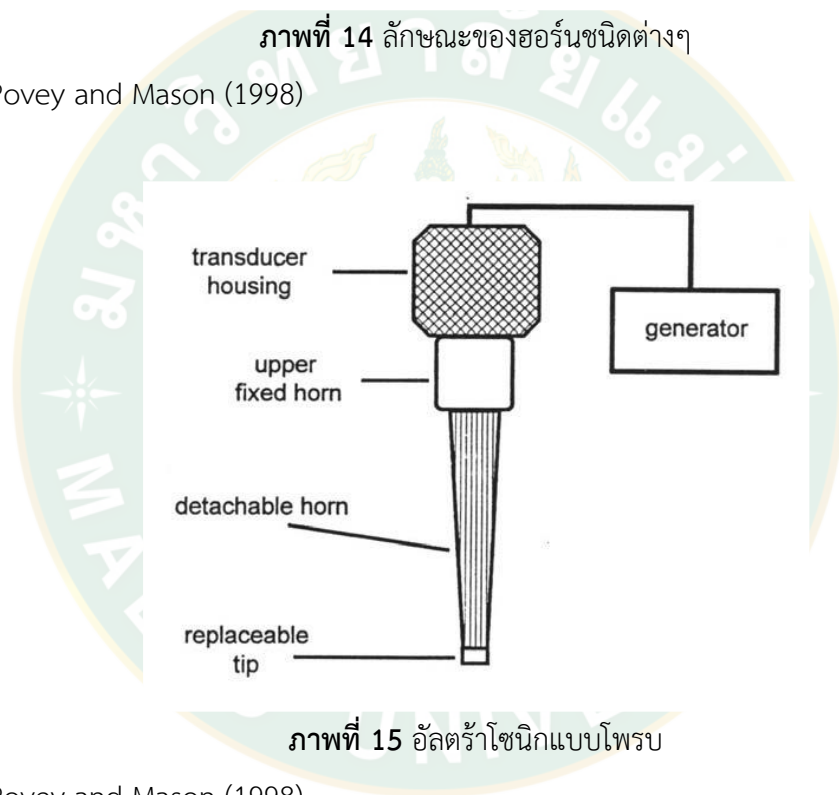
ที่มา: Povey and Mason (1998)

3. อัลตราโซนิกแบบโพรบ (Ultrasonic probe) เป็นการนำทรานส์ดีวเซอร์มาต่อเข้ากับอุปกรณ์ที่เรียกว่าฮอร์น (Horn) ลักษณะของฮอร์นจะมีความแตกต่างกันออกไปดังภาพที่ 14 โดยฮอร์นส่วนใหญ่จะให้ขนาดของความยาวคลื่นครึ่งหนึ่งหรือเป็นพหุคูณกับความยาวของคลื่นเสียงของวัสดุที่นำมาผลิต อัลตราโซนิกแบบโพรบแสดงดังภาพที่ 15 และแอมพลิจูดที่สร้างขึ้นจากโพรบนี้จะขึ้นกับลักษณะของฮอร์น สำหรับฮอร์นที่มีลักษณะเป็นแท่งทรงกระบอกนั้นแอมพลิจูดจะไม่มีเปลี่ยนแปลง แต่ฮอร์นจะทำหน้าที่ขยายหรือเพิ่มการส่งถ่ายพลังงานเสียง



ภาพที่ 14 ลักษณะของฮอร์นชนิดต่างๆ

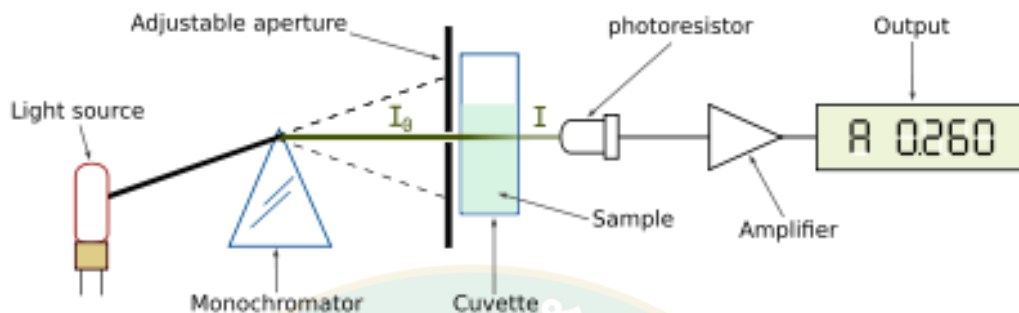
ที่มา: Povey and Mason (1998)



ภาพที่ 15 อัลตราโซนิกแบบโพรบ

ที่มา: Povey and Mason (1998)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Absorption Spectrophotometer)



ภาพที่ 16 ลักษณะการทำงานของ Spectrophotometer

ที่มา: Heda (2013)

การหาปริมาณสารใดสารหนึ่งโดยวิธีการทางห้องปฏิบัติการมีอยู่หลายวิธีแต่วิธีที่นิยมใช้มากที่สุดคือการวัดความเข้มของสี (Colorimetry) หรือการวัดความเข้มของแสงโดยการเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน (Standard solution) ที่ทราบค่าในระยะแรกๆ การเปรียบเทียบความเข้มของสี อาศัยสายตา (Visual colorimetry) ซึ่งมีความถูกต้องและแม่นยำต่ำ ต่อมาได้มีการนำตัวไวแสง (Photo sensor) มาใช้แทนการเปรียบเทียบด้วยสายตาจึงเรียกเครื่องมือที่ใช้ตัวไวแสงว่า “Photoelectric colorimeter” หรือ “Photometer” เนื่องจากสารหรือสีที่จะวัดมีความสามารถในการดูดกลืนแสงหรือปล่อยแสงที่มีช่วงความยาวคลื่น (Spectrum) ที่แตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อให้การวัดมีความจำเพาะ (Specificity) และความไว (Sensitivity) สูง จึงได้พัฒนาเครื่องมือที่สามารถวัดความเข้มของแสงช่วงความยาวคลื่นแคบๆ ได้อย่างต่อเนื่องตามต้องการและใช้ตัวไวแสงที่มีประสิทธิภาพสูง เครื่องมื่อดังกล่าวถูกเรียกว่า “สเปกโทรโฟโตมิเตอร์” (Spectrophotometer) ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาไปมากมีทั้งแบบอะนาล็อก แบบดิจิทัล รวมทั้งแบบดิจิทัลที่ทำงานโดยอัตโนมัติที่มีระบบไมโครโพรเซสเซอร์ ควบคุมการทำงาน

กฎของเบียร์และแลมเบิร์ต (Beer and Lambert’s Law) เกี่ยวกับการดูดกลืนของแสงกับความหนาของของเหลวที่มีสี กล่าวไว้ที่แต่ละชั้นของความหนาที่เท่ากันจะดูดกลืนแสงที่ผ่านในเศษส่วนที่เท่ากัน นั่นคือเมื่อลำแสงของแสงโมนโครมาติก (Monochromatic light) ฉายผ่านตัวกลางที่ดูดกลืน (Absorb medium) ซึ่งก็คือสารละลายที่มีสี ความเข้มของแสงจะลดลงในรูปของฟังก์ชันเอกโพแนนเชียล ในขณะที่ความยาวของตัวกลางมากขึ้น “อัตราของแสงที่ถูกดูดกลืนไว้ จะผันแปรเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มและระยะทางที่แสงนั้นส่องผ่าน” เมื่อใดที่สารละลายที่มีสีเป็นไปตามกฎข้อนี้ ถือว่าเป็นไปตามกฎของแลมเบิร์ต โดยมีข้อควรสังเกตคือสารละลายที่ใช้กฎข้อนี้

ได้ ต้องเป็นสารละลายที่มีเนื้อเดียวกันตลอด กฎนี้มีประโยชน์มากในการใช้ปรับความหนาของชั้นที่ดูดกลืนแสงหรือความหนาแน่นของตัวอย่าง ซึ่งอยู่ในหลอดแก้วใส เรียกว่า เซลล์ (Cell) หรือ คิวเวตต์ (Cuvette) เพื่อลดสีให้ถึงระดับในช่วงที่สามารถใช้เตรียมอนุกรมของสารละลายมาตรฐาน เพื่อใช้ทำโค้งมาตรฐาน (Standard curve) หรือเพื่อที่จะใช้กับสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ได้

เครื่องวัดความเข้มของแสงเป็นการศึกษาด้านการกระทำร่วม (Interaction) ระหว่างคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าหรือคลื่นแสงกับสสาร เช่น อะตอม (Atom) หรือโมเลกุลของสาร (Molecule) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่คือการวัดแสงที่เปล่งออกมา (Emission light) การวัดแสงที่ถูกดูดกลืน (Absorption light) และการวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence light) ที่เปล่งออกมา

เครื่องวัดการดูดกลืนแสงและเครื่องวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์มีองค์ประกอบที่คล้ายกันแต่ตำแหน่งการวางอุปกรณ์ต่างกัน กล่าวคือเครื่องวัดการดูดกลืนแสงมีหลอดไฟกำเนิดแสง (Light source) ส่งแสงผ่านไปยังตัวแยกแสง (Monochromator) ผ่านสารตัวอย่าง (Sample) ผ่านตัวไวแสง (Photo sensor) แล้วจึงอ่านค่าออกมา ส่วนเครื่องวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ หลอดไฟกำเนิดแสงจะส่งแสงผ่านสารตัวอย่างเพื่อทำให้เกิดแสงฟลูออเรสเซนซ์แล้วให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นส่งผ่านไปสู่อุปกรณ์แยกแสงและอุปกรณ์อื่นๆตามลำดับ ส่วนเครื่องวัดการเปล่งแสงโดยเปลวไฟมีอุปกรณ์เหมือนกับเครื่องวัดการดูดกลืนแสงแต่ต่างกันตรงที่ไม่มีหลอดไฟกำเนิดแสง (ชูชาติ, 2544)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Mathialagan et al. (2017) ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารอัลลิซินจากกระเทียมด้วยวิธีการสกัดแบบอัลตราโซนิคและตรวจหาปริมาณสารอัลลิซินด้วยวิธี HPLC ทั้งนี้เครื่องอัลตราโซนิคที่ทำการทดลองสามารถใช้ได้ที่ความถี่ 35 กิโลเฮิร์ตเท่านั้น จึงทำการศึกษาผลของอุณหภูมิในการสกัด (25 30 และ 35 องศาเซลเซียส) เวลาในการสกัด (30 60 90 120 และ 150 นาที) และขนาดอนุภาคของกระเทียม (หั่นเป็นแผ่นบางและป่น) จากผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาการสกัด 90 นาที และกระเทียมป่นเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด มีปริมาณสารอัลลิซินเท่ากับ 112 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

Fariás-Campomanes et al. (2014) เปรียบเทียบปริมาณสารอัลลิซินที่ได้จากการสกัดกระเทียมด้วยวิธีของของไหลความดันสูง (PLE) ผงกระเทียม น้ำมันกระเทียม และกระเทียมสด จากผลการทดลองพบว่าปริมาณสารอัลลิซินจากการสกัดมีปริมาณ 332 ± 5 ไมโครกรัมต่อกรัม รองลงมาเป็นกระเทียมสด ผงกระเทียม ส่วนในน้ำมันกระเทียมไม่สามารถตรวจพบสารอัลลิซินได้

Tomšik et al. (2016) ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบชีวภาพจากต้นกระเทียม (*Allium ursinum* L.) ด้วยวิธีการสกัดแบบอัลตราโซนิคร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยศึกษาอุณหภูมิในการสกัด (40-80 องศาเซลเซียส) ความเข้มข้นของเอทานอล (30-70 เปอร์เซ็นต์) เวลาการสกัด (40-80 นาที) และกำลังอัลตราโซนิค (19.2-38.4 วัตต์/ลิตร) ต่อปริมาณสารฟีนอลิก ปริมาณสารฟลาโวนอยด์และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ผลการศึกษาพบว่าที่สภาวะที่เหมาะสมที่สุดคืออุณหภูมิการสกัด 80 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เวลาการสกัด 79.8 นาที และกำลังอัลตราโซนิคที่ 20.06 วัตต์/ลิตร ได้ปริมาณสารฟีนอลิกเท่ากับ 1.60 กรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 100 กรัม ปริมาณสารฟลาโวนอยด์เท่ากับ 0.35 กรัมสมมูลของคาเทชินต่อสารสกัด 100 กรัม และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) เท่ากับ 0.71 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม

บุญญวดี และคณะ (2558) ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินด้วยน้ำคั้นกระเทียมเข้มข้น พบว่าน้ำคั้นกระเทียมเจือจางด้วยน้ำจืดมีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. Flavus* และน้ำคั้นกระเทียมความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. Flavus* ได้สมบูรณ์ ส่วนผลของการลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินพบว่าน้ำคั้นกระเทียมสดความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ นำมาคลุกกับพริกที่มีการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซินในอัตราส่วน 300 มิลลิกรัมต่อพริก 1 กิโลกรัม สามารถลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินได้ร้อยละ 73.67 หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน

Bakri and Douglas (2005) ศึกษาการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในช่องปากจำนวน 20 ชนิดด้วยสารสกัดจากกระเทียม โดยสารสกัดกระเทียมที่ใช้มีปริมาณสารอัลลิซิน 220 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อด้วยวิธี Agar diffusion และ Broth dilution พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) ของแบคทีเรียแกรมลบมีค่า MIC ระหว่าง 35.7-1.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า MBC เท่ากับ 7.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกมีค่า MIC ระหว่าง 142.7-35.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า MBC เท่ากับ 27.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

(สุนิดา และคณะ (2557) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากกระเทียม หอมแดงและพริกแห้ง คั่ว ในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* โดยนำมาสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์นาน 7 วัน และนำมาทดสอบเชื้อทั้ง 4 ชนิดด้วยวิธี Agar diffusion method พบว่าสารสกัดจากกระเทียมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารสกัดจากกระเทียมมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในคนได้

(สิงหนาท และรุ่งกานต์ (2551) ศึกษาผลของการเก็บรักษาต่อคุณภาพของสารสกัดกระเทียมเข้มข้นที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอัลลิซินด้วยวิธีการแยกของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าสารอัลลิซินจะสลายตัวลงอย่างต่อเนื่องจนปริมาณสารอัลลิซิน ลดลงเหลือครึ่งหนึ่งของปริมาณสารเริ่มต้นภายใน 15 วัน และไม่สามารถตรวจพบปริมาณสารอัลลิซินได้เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 40 วัน โดยมีอันดับปฏิกิริยาเป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับศูนย์มีค่าอัตราคงที่การเกิดปฏิกิริยา (k) เท่ากับ 0.905

งานวิจัยที่กล่าวมาช่วยให้ทราบว่าการใช้อัลตราโซนิกช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด ลดระยะเวลาและได้สารสกัดที่ดีกว่าแบบดั้งเดิม ส่วนในประเด็นการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแสดงให้เห็นว่ากระเทียมสามารถยับยั้งเชื้อได้ แต่สารสกัดจากกระเทียมที่ใช้ไม่ได้สกัดด้วยการใช้วิธีอัลตราโซนิก งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะหาผลของควมถี่ อุณหภูมิและเวลาในการสกัดกระเทียมไทยด้วยอัลตราโซนิกและนำสารสกัดที่ได้ไปศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* และการหาความคงตัวของสารสกัดจะทำให้ทราบถึงอายุการเก็บรักษาของสารสกัดได้

บทที่ 3 วิธีการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ต้องการที่จะศึกษาผลของความถี่ อุณหภูมิและเวลาในการสกัดสารอัลลิซินด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารอัลลิซินที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อ *E.coli* และความคงตัวของสารอัลลิซินระหว่างการเก็บรักษา ขั้นตอนของการศึกษาเริ่มจากการเตรียมอุปกรณ์ที่ใช้ วัสดุและวิธีการดำเนินงานวิจัย ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

การศึกษานี้มีอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยประกอบด้วย วัสดุที่ใช้ในการทดลองและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองมีรายละเอียดต่างๆ ดังนี้

1. วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

- กระเทียมไทยกลุ่ม Soft neck พันธุ์เชียงใหม่ (*Allium sativum* Linn)



ภาพที่ 17 ลักษณะกระเทียมพันธุ์เชียงใหม่ที่ใช้ในการทดลอง

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- เครื่องอัลตราโซนิกแบบอ่าง ยี่ห้อ Honda electronics รุ่น W 113 ประเทศญี่ปุ่น



ภาพที่ 18 เครื่องอัลตราโซนิกแบบอ่างที่ใช้ในการทดลอง

- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Labomed, inc รุ่น Spectro SC series 002416 ประเทศสหรัฐอเมริกา



ภาพที่ 19 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

- เครื่องหมุนเหวี่ยง ยี่ห้อ Gemmy Industrial corp. รุ่น PLC-012E ประเทศไต้หวัน
- เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิทัล แบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Ohaus coppocation รุ่น PA214
- เครื่องวัด pH ยี่ห้อ FiveEasy™ Plus รุ่น FEP20

3. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- 4-Mercaptopyridine: C_5H_5NS
- Ethylene diamine tetraacetic acid: EDTA
- Monosodium phosphate: NaH_2PO_4
- Di-Sodium hydrogen phosphate: Na_2HPO_4
- Beef extract
- Bacto Casamino acids technical
- Bacto soluble starch
- Peptone
- Agar
- Ethanol: C_2H_5OH
- Distilled water

การทดลองที่ 1 การสกัดและคำนวณสารอัลลิซินจากกระเทียม

วิธีการเตรียมตัวอย่างการทดลอง

เริ่มจากคัดเลือกหัวกระเทียมที่มีความสมบูรณ์ไม่มีตำหนิจากรอยของแมลงกัดแทะหรือการเสียหายจากโรคพืช นำกระเทียมที่ผ่านการคัดแยกมาทำความสะอาดและปอกเปลือก

การสกัดแบบดั้งเดิม

ทำการชั่งน้ำหนักกระเทียมที่ปอกเปลือก 5 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้ละเอียดทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 4 นาที พักสารสกัดไว้ 30 นาที ก่อนนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นเก็บสารสกัดไว้ในขวดสีชาและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Olech and Zaborska, 2012)

การสกัดด้วยอัลตราโซนิค

ทำการชั่งน้ำหนักกระเทียมที่ปอกเปลือก 5 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้ละเอียดทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการสกัดด้วยอัลตราโซนิควางแผนการทดลองแบบ Full factorial มี 3 ปัจจัย ได้แก่

ปัจจัยที่ 1 เป็นระดับความถี่ของคลื่นอัลตราโซนิคที่ใช้ในการสกัดกระเทียมมี 3 ระดับคือ

ระดับที่ 1 ความถี่ 28 กิโลเฮิร์ต

ระดับที่ 2 ความถี่ 45 กิโลเฮิร์ต

ระดับที่ 3 ความถี่ 100 กิโลเฮิร์ต

ปัจจัยที่ 2 เป็นระดับอุณหภูมิในการสกัดกระเทียมมี 3 ระดับคือ

ระดับที่ 1 อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

ระดับที่ 2 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ระดับที่ 3 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ปัจจัยที่ 3 เป็นระยะเวลาในการสกัดกระเทียมมี 3 ระดับคือ

ระดับที่ 1 เวลา 20 นาที

ระดับที่ 2 เวลา 40 นาที

ระดับที่ 3 เวลา 60 นาที

ซึ่งเมื่อรวมปัจจัยทั้งหมดเข้าด้วยกันจะทำให้ได้ทริตเมนต์จำนวน 27 ทริตเมนต์ แต่ละทริตเมนต์ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

จากนั้นนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 นาที ก่อนนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นเก็บสารสกัดไว้ในขวดสีชาและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Tomsik et al., 2016)

การวิเคราะห์ปริมาณสารอัลลิซินในกระเทียม

การวิเคราะห์ปริมาณสารอัลลิซินในงานวิจัยนี้ทำโดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Miron et al. (2002) โดยนำสารสกัดกระเทียมปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ (โซเดียมฟอสเฟต 50 มิลลิโมล EDTA 2 มิลลิโมล ที่ pH 7.2) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 วินาที จากนั้นนำสารสกัดที่ผสมสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 4- Mercaptopyridine (4-MP 20 มิลลิกรัมต่อเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ 4 มิลลิลิตร) ปริมาณ 9 มิลลิลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที โดยจะอาศัยการทำให้เกิดปฏิกิริยาของหมู่ Thiosulfinate กับ 4- Mercaptopyridine แล้ววัดค่าการดูดกลืนของแสงโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ยี่ห้อ LabioMed, inc รุ่น Spectro SC series 002416 ที่ความยาวคลื่น 324 นาโนเมตร

การคำนวณหาสารอัลลิซิน

จากการทำปฏิกิริยาของ Thiosulfinate กับ 4- Mercaptopyridine จะได้เป็น 4-allylmercapto -thiopyridine ใช้สูตรคำนวณย้อนกลับเพื่อหาปริมาณสารอัลลิซินที่มีอยู่

$$[\text{Allicin}] = \Delta A_{324} \times \epsilon_{324}$$

$$\Delta A_{324} = [A_{324} (4\text{-MP}_{\text{control}}) - A_{324} (4\text{-MP}_{\text{with extract}})]$$

โดยที่ค่าสัมประสิทธิ์การดูดแสง (ϵ_{324}) เท่ากับ $39,600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

การทดลองที่ 2 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้ง การเจริญเติบโตของเชื้อ *E.coli*

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia Coli* ATCC 25922 มาเพาะเลี้ยงบน Nitrate Agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ เชื้อเชื้อ 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton Broth (MHB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-5 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบรียมซัลเฟต Mcfarland no. 0.5 ด้วย 0.85% NaCl แล้วเจือจางต่อให้มีเชื้อประมาณ 10^5-10^7 CFU/ml ด้วย MHB

การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

การทดสอบโดยวิธี Broth dilution method และวัดค่าความขุ่น (Optical density assay) ด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตริดังนี้

1. เตรียมสารสกัดจากกระเทียมให้มีความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 และ 1.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อและทำให้แห้งจำนวน 12 หลอด ละลายด้วย MHB 50 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของ Dimethyl sulfoxide (DMSO) สุดท้ายเป็น 0.5%
2. ใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัด ใส่ลงในหลอดทดลองที่ 2-11 หลอดละ 1 มิลลิลิตร ส่วนหลอดที่ 12 ใส่แต่อาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่มีสารสกัด
3. เติมเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ลงไปในทุกหลอดทดลอง จำนวนหลอดละ 1 มิลลิลิตร
4. นำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16-18 ชั่วโมง
5. เมื่อครบกำหนด 18 ชั่วโมง นำหลอดทดลองออกมาวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
6. คำนวณค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโต (%inhibition) จากสูตรต่อไปนี้

$$\%inhibition = [(Abs_{control} - Abs_{test\ sample}) / Abs_{control}] \times 100$$

เมื่อกำหนดให้ $Abs_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

$Abs_{test\ sample}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบ

7. วิเคราะห์หาค่า MIC_{90} (MIC หรือ Minimum Inhibition Concentration หมายถึงความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ร้อยละ 90 ขึ้นไปเมื่อเทียบกับสถานะควบคุม)

การทดลองที่ 3 การศึกษาความคงตัวของสารอัลลิซินในระหว่างการเก็บรักษา

โดยการนำสารสกัดอัลลิซินบรรจุในขวดสีชานำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบปริมาณอัลลิซินทุก 1 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำไปหาอัตราการเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวและค่าครึ่งชีวิตโดยมีสมการดังนี้

$$\text{ปฏิกิริยาสมการอันดับ 0} \quad [A] = [A]_0 - kt \quad (1)$$

$$\text{ปฏิกิริยาสมการอันดับ 1} \quad \ln[A] = \ln[A]_0 - kt \quad (2)$$

$$\text{ปฏิกิริยาสมการอันดับ 2} \quad \frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + kt \quad (3)$$

$$\text{ปฏิกิริยาสมการอันดับ 3} \quad \frac{1}{[A]^2} = \frac{1}{[A]_0^2} + kt \quad (4)$$

โดยที่ $[A]$ = คือปริมาณอัลลิซินเมื่อเวลาผ่านไป t
 $[A]_0$ = ปริมาณอัลลิซินเริ่มต้น
 k = ค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับ
 t = เวลาการเกิดปฏิกิริยา

สมการครึ่งชีวิต

$$\text{ปฏิกิริยาสมการอันดับ 0} \quad t_{\frac{1}{2}} = \frac{[A]_0}{2k} \quad (5)$$

$$\text{ปฏิกิริยาสมการอันดับ 1} \quad t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k} \quad (6)$$

$$\text{ปฏิกิริยาสมการอันดับ 2} \quad t_{\frac{1}{2}} = \frac{1}{k[A]_0} \quad (7)$$

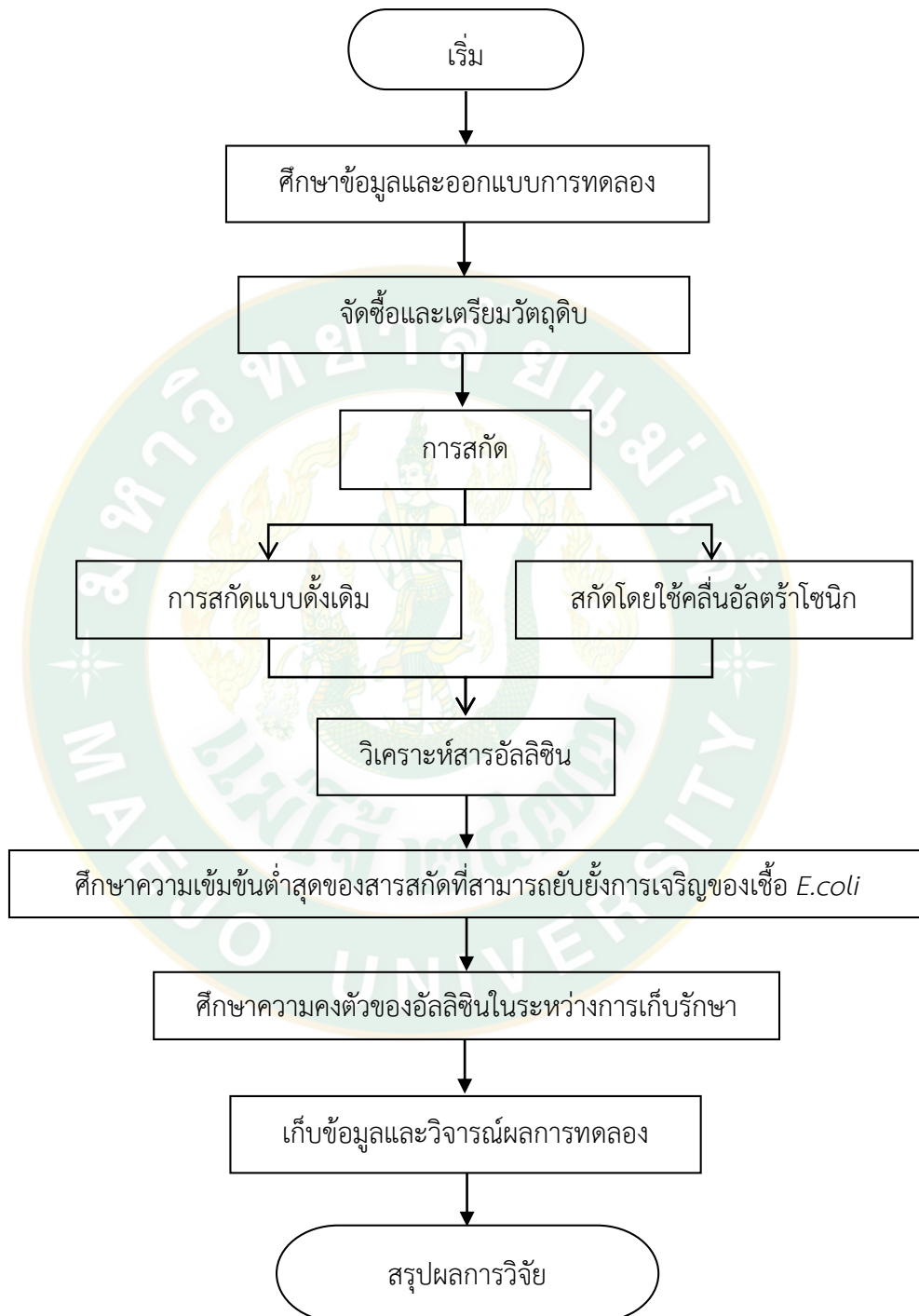
$$\text{ปฏิกิริยาสมการอันดับ 3} \quad t_{\frac{1}{2}} = \frac{3}{2k[A]_0^2} \quad (8)$$

โดยที่ $t_{\frac{1}{2}}$ = ครึ่งชีวิตของปฏิกิริยา (half-life of reaction)

$[A]_0$ = ปริมาณอัลลิซินเริ่มต้น

k = ค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับ

แผนการดำเนินงาน



ภาพที่ 20 แผนปฏิบัติการดำเนินงาน

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้อัลตราโซนิกช่วยสกัดสารอัลลิซินจากกระเทียม

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้อัลตราโซนิกช่วยสกัดสารอัลลิซิน ได้ทำการศึกษาผลของตัวแปรซึ่งได้แก่ ความถี่ของอัลตราโซนิกที่ 28 45 และ 100 กิโลเฮิร์ต อุณหภูมิการสกัดที่ 20 30 และ 40 องศาเซลเซียส และเวลาในการสกัด 20 40 และ 60 นาที ต่อปริมาณของอัลลิซินที่สกัดได้จากกระเทียม

เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 22 (ก)-(ค) พบว่า การใช้ความถี่อัลตราโซนิกสูงขึ้นส่งผลให้ปริมาณอัลลิซินที่สกัดได้เพิ่มขึ้นจนถึงความถี่ในการสกัดที่ 45 กิโลเฮิร์ตจากนั้นปริมาณอัลลิซินที่สกัดได้จะคงที่ ทั้งนี้เนื่องมาจากผลของแรงกลและปรากฏการณ์คาวิตีชัน ในกรณีที่มีความถี่อัลตราโซนิกต่ำฟองที่เกิดขึ้นจะมีขนาดใหญ่และสามารถแตกได้ง่ายจึงช่วยทำให้เกิดแรงดันพุ่ง (Pressure jet) สูงส่งผลให้ผนังเซลล์พืชถูกทำลายมาก การสกัดจึงเกิดได้ดี แต่อย่างไรก็ตาม ที่ความถี่อัลตราโซนิกต่ำจำนวนรอบที่เกิดปรากฏการณ์คาวิตีชันนี้จะเกิดได้น้อยกว่าที่ความถี่สูง ดังนั้นถ้าใช้ความถี่อัลตราโซนิกที่ต่ำมากเกินไปอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพการสกัดลดลง ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากผลการทดลองจะเห็นว่า ปริมาณสารอัลลิซินที่สกัดได้โดยใช้ความถี่ที่ 45 กิโลเฮิร์ตมีค่าสูงกว่าที่ 28 กิโลเฮิร์ต แต่เมื่อเปรียบเทียบกับความถี่ที่ 100 กิโลเฮิร์ต ปริมาณสารอัลลิซินที่สกัดได้จะใกล้เคียงกัน แม้ว่าการใช้ความถี่อัลตราโซนิกสูงจะทำให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงขึ้น แต่ถ้าใช้ความถี่ที่สูงมากเกินไป ผลจากปรากฏการณ์คาวิตีชันจะทำให้เซลล์ของสารสกัดถูกทำลายไปด้วย จึงทำให้ปริมาณสารอัลลิซินที่สกัดได้ที่ความถี่ 100 กิโลเฮิร์ตมีค่าน้อยกว่าที่ 45 กิโลเฮิร์ต ดังนั้นในการศึกษารั้งนี้การใช้ความถี่ที่ 45 กิโลเฮิร์ต จึงเป็นความถี่ที่เหมาะสมสำหรับการสกัดอัลลิซินจากกระเทียม

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Toma et al. (2001) พบว่าการสกัดที่ความถี่ 20 กิโลเฮิร์ต ปริมาณสารสกัดที่ได้จะน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารสกัดที่ได้จากการสกัดที่ 40 กิโลเฮิร์ต สอดคล้องกับผลการทดลองของ Deng et al. (2017); Kimbaris et al. (2006) และ González-Centeno et al. (2014) ที่การใช้ความถี่ที่สูงกว่า 20 กิโลเฮิร์ตจะได้ปริมาณสารสกัดมากกว่า นอกจากนี้ Liao et al. (2016) ยังรายงานว่าการใช้อัลตราโซนิกช่วยในการสกัดที่ความถี่ 48 กิโลเฮิร์ต ทำให้ได้ปริมาณ ไลโคปีนที่สกัดได้จากมะเขือเทศมีค่ามากที่สุดเมื่อเปรียบกับการสกัดที่ความถี่ 18 ถึง 146 กิโลเฮิร์ต ทั้งนี้ความถี่ที่ใช้ในการสกัดพบว่า มีปัจจัยอื่นที่สามารถทำให้ปริมาณสารสกัดเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ สังเกตได้จากการสกัดที่ 45 กับ 100 กิโลเฮิร์ตที่มีปริมาณสารอัล

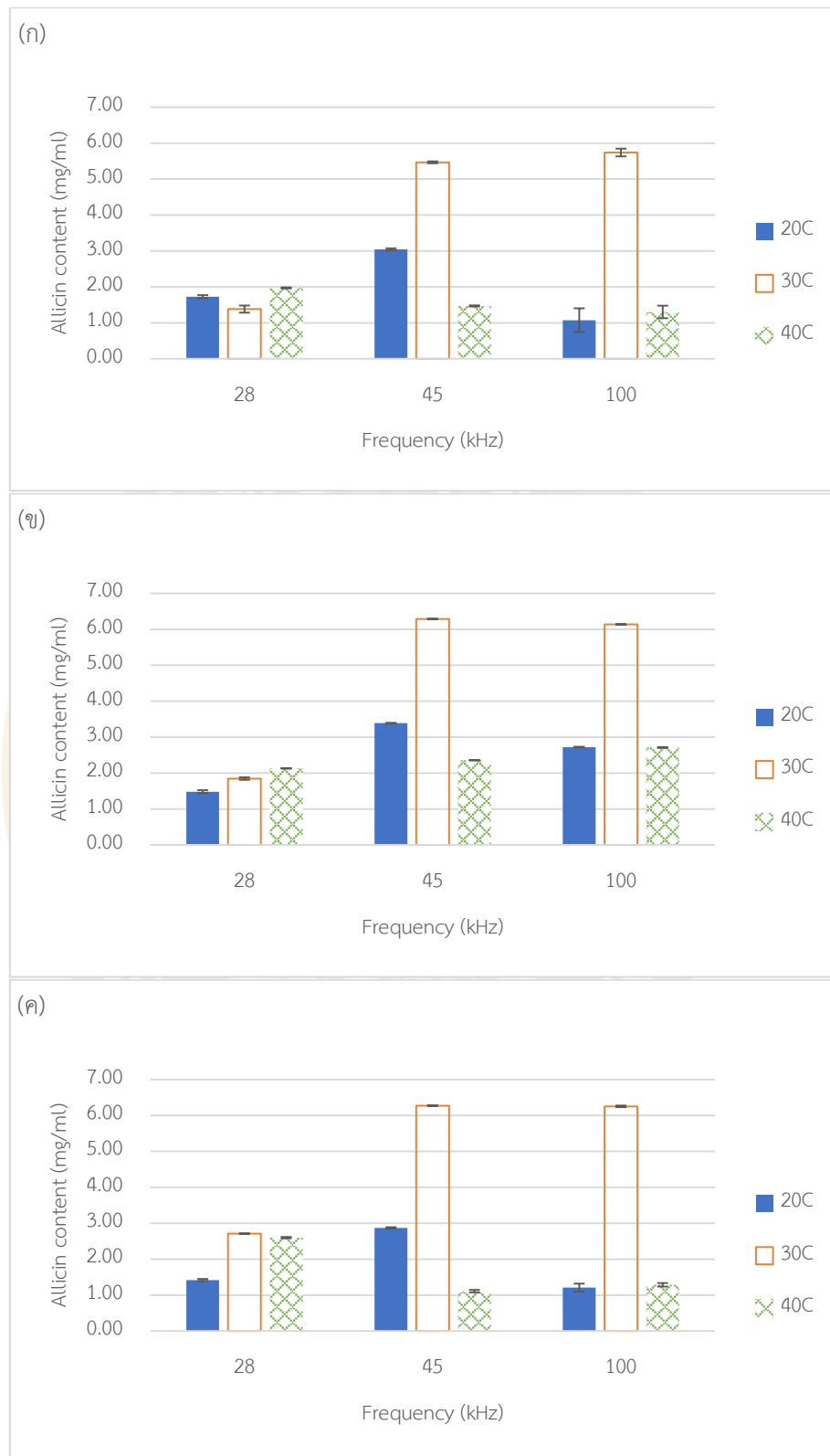
ลิซอินใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาพร้อมกับอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดที่แตกต่างกัน การสกัดที่ความถี่ 100 กิโลเฮิร์ตมีปริมาณสารอัลลิซินที่สกัดได้น้อยกว่าการสกัดที่ความถี่ 45 กิโลเฮิร์ต

ในกรณีการศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดพบว่า ปริมาณอัลลิซินที่สกัดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีค่ามากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 20 และ 40 องศาเซลเซียส เนื่องจากว่าการใช้อุณหภูมิสูงขึ้นจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด โดยอุณหภูมิสูงจะการทำลายพันธะที่ผนังเซลล์เซลล์พืช และแรงยึดเหนี่ยวโมเลกุลของสารสกัดรวมทั้งลดแรงตึงผิวของตัวทำละลายจึงส่งผลให้เกิดการปลดปล่อยของสารสกัดตามยั่งตัวทำละลายได้มากขึ้น (Hadiyanto et al., 2015) แต่อย่างไรก็ตามการใช้อุณหภูมิสูงมากเกินไปอาจส่งผลต่อความเสถียรของสารอัลลิซินได้ โดยที่อุณหภูมิสูงจะทำให้สารในหมู่ Allyl thiosulfinates เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็น Allyl sulfide ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความคงตัวน้อยและเกิดการสลายตัวไปตามธรรมชาติได้ (Ankri and Mirelman, 1999; Lawson and Gardner, 2005; Slusarenko et al., 2008) นอกจากนี้งานวิจัยของ Calvey et al. (1997) และ Poojary et al. (2017) ได้รายงานว่าอัลลิซินจะเกิดการสลายตัวเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 36 องศาเซลเซียส ดังนั้นเมื่อทำการสกัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณสารอัลลิซินที่สกัดได้จึงลดลง

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาผลของเวลาในการสกัดต่อปริมาณของอัลลิซิน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ที่การสกัดด้วยความถี่ 28 กิโลเฮิร์ต ปริมาณอัลลิซินที่สกัดได้จะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการสกัดเพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อสกัดด้วยความถี่ 45 และ 100 กิโลเฮิร์ต ปริมาณอัลลิซินที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการสกัดเพิ่มมากขึ้นจนถึงเวลาการสกัดที่ 40 นาที จากนั้นปริมาณอัลลิซินที่สกัดได้จะมีค่าลดลงเมื่อเวลาสกัดเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เป็นผลมาจากแรงกลและปรากฏการณ์คาวิตชันที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ที่ทำให้เกิดฟองอากาศและแรงดันพุ่งในระหว่างการสกัดและส่งผลให้เกิดการทำลายผนังเซลล์พืช ที่ความถี่ในการสกัดต่ำปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นช้ากว่าที่ความถี่สูง ดังนั้นที่ความถี่อัลตราโซนิคต่ำ ปริมาณอัลลิซินที่สกัดได้จะเพิ่มตามเวลาการสกัดอย่างช้าๆ เมื่อที่ความถี่อัลตราโซนิคสูงขึ้นผนังเซลล์พืชถูกทำลายได้เร็วขึ้นส่งผลให้สารอัลลิซินที่อยู่ในเซลล์พืชจะถูกชะออกมาได้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามผลของแรงกลและปฏิกิริยาคาวิตชันนี้ อาจไปทำลายโครงสร้างของอัลลิซินที่ถูกชะออกมาอยู่ในตัวทำละลายหากให้เวลานานมากเกินไป ดังนั้นการสกัดที่ความถี่ 45 และ 100 กิโลเฮิร์ต ทำให้ปริมาณอัลลิซินจึงลดลง เมื่อใช้เวลานานกว่า 40 นาที โดยผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu et al. (2017) ซึ่งพบว่า ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จาก *Phyllanthus urinaria* ด้วยอัลตราโซนิคที่ความถี่ 53 กิโลเฮิร์ต จะเพิ่มขึ้นในช่วงเวลาแรกของการสกัด จากนั้นจะค่อยๆ ลดลงเมื่อเวลาการสกัดเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้งานวิจัยของ Pingret et al. (2012); Toma et al. (2001) และ Tomsik et al. (2016) ระบุว่า การสกัดที่ 40 นาทีเป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารชีวภาพจากกระเทียม

จากตารางที่ 1 แสดงผลของปริมาณอัลลิซินที่สกัดโดยใช้อัลตราโซนิคที่ความถี่ อุณหภูมิ และเวลาการสกัดต่างๆ โดยทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติจะพบว่าการทดลองที่ 14 สกัดที่ความถี่ 45 กิโลเฮิร์ต อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที มีปริมาณสารสกัดเท่ากับ 6.29 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการทดลองอื่น แต่ไม่แตกต่างกับการทดลองที่ 15 และการทดลองที่ 24 โดยมีปริมาณสารสกัดเท่ากับ 6.27 ± 0.01 และ 6.25 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อพิจารณาจากเวลาที่ใช้ในการสกัดที่ 14 ใช้เวลาการสกัดที่น้อยกว่าการทดลองที่ 15 และ 24 ทั้งยังได้ปริมาณสารสกัดที่สูงกว่า ดังนั้นการใช้อัลตราโซนิคช่วยสกัดที่ความถี่ 45 กิโลเฮิร์ต อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 40 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารอัลลิซินจากกระเทียม โดยพิจารณาจากค่าปริมาณอัลลิซินสูงสุดที่สกัดได้รวมกับการใช้เวลาและพลังงานน้อยที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ González-Centeno et al. (2014) ที่ศึกษาผลของความถี่ของอัลตราโซนิค (40 80 และ 120 กิโลเฮิร์ต) ต่อการสกัดสารฟีนอลิกจากกากองุ่น (*Vitis vinifera* L.) พบว่า การใช้ความถี่ที่ 40 กิโลเฮิร์ต ได้ปริมาณสารฟีนอลิกมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับความถี่อื่นๆ งานวิจัยของ Jemain et al. (2017) ใช้ความถี่ที่ 40 กิโลเฮิร์ต ในการสกัดสารจาก *Curcuma caesia* rhizomes เนื่องจากเป็นความถี่ที่ได้ปริมาณสารสกัดมากที่สุด เช่นเดียวกัน

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเป็นการช่วยลดปริมาณการใช้กระเทียมสดและได้ปริมาณสารสกัดที่มากที่สุด เพื่อให้สามารถควบคุมปริมาณสารสกัดของกระเทียมได้เนื่องจากในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จำเป็นต้องทราบปริมาณของสารสกัดที่ต้องใช้ด้วยเพื่อให้สารสกัดสามารถออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด ไม่ว่าจะเป็นการพัฒนาเพื่อให้ได้สารกันเสียจากธรรมชาติทดแทนการใช้สารกันเสียสังเคราะห์ มีการใช้สารสกัดจากสมุนไพรหลายชนิดเพื่อเป็นสารกันเสีย อาทิเช่น สารสกัดจากฝรั่ง (นฤพร และศุทธิณี, 2549) สารสกัดจากผลพลึงกาสาและเปลือกมังคุด (ศรีณยา และคณะ, 2560) สารสกัดสมุนไพรเบญจกานี เปลือกทับทิมและใบคูน (ประพฤษ และคณะ, 2555) สารสกัดจากใบฟักแม้ว (จิราภรณ์ และเรือนแก้ว, 2555; วัชรา และศศิธร, 2553) การมีสารกันเสียจากธรรมชาติมาทดแทนการใช้สารกันเสียสังเคราะห์จะทำให้การบริโภคอาหารปลอดภัยมากยิ่งขึ้น ทั้งยังไม่ส่งผลเสียต่อสุขภาพอีกด้วย



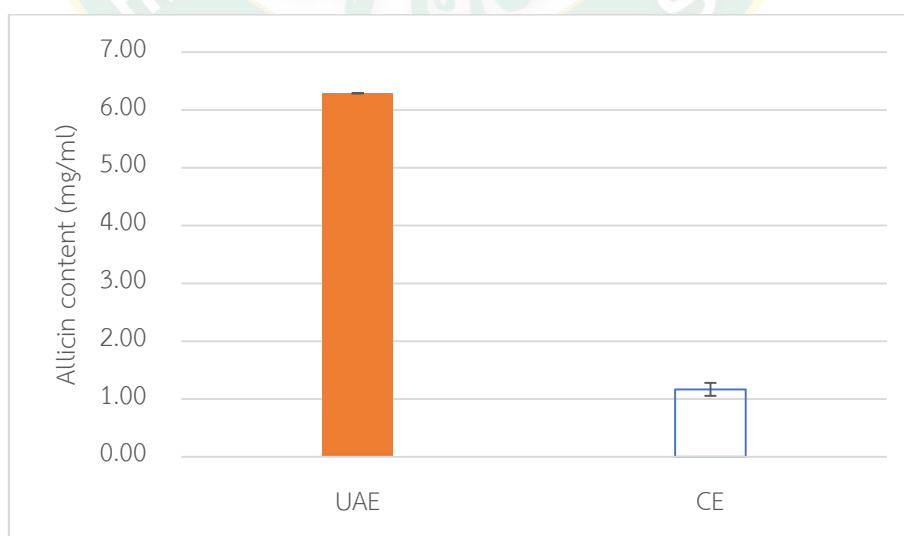
ภาพที่ 21 ปริมาณสารอัลลิซินทั้งหมดที่สกัดได้ที่ความถี่ 28 45 และ 100 กิโลเฮิร์ต อุณหภูมิ 20 30 และ 40 องศาเซลเซียส และเวลาอัลตราโซนิคที่ (ก) 20 นาที (ข) 40 นาที (ค) 60 นาที

ตารางที่ 1 ปริมาณสารอัลลิซินที่สกัดได้จากกระเทียมพันธุ์เชียงใหม่ในแต่ละปัจจัย

การทดลองที่	ความถี่ (กิโลเฮิรต์)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	ปริมาณสารอัลลิซิน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1			20	1.73±0.04 ^l
2		20	40	1.48±0.04 ^m
3			60	1.42±0.03 ^{mn}
4			20	1.38±0.10 ^{mn}
5	28	30	40	1.85±0.04 ^{kl}
6			60	2.71±0.01 ^h
7			20	1.97±0.01 ^k
8		40	40	2.13±0.01 ^j
9			60	2.60±0.02 ^h
10			20	3.05±0.03 ^f
11		20	40	3.39±0.01 ^e
12			60	2.87±0.02 ^s
13			20	5.47±0.03 ^d
14	45	30	40	6.29±0.01 ^a
15			60	6.27±0.01 ^{ab}
16			20	1.47±0.02 ^m
17		40	40	2.36±0.01 ⁱ
18			60	1.11±0.03 ^p
19			20	1.07±0.33 ^p
20		20	40	2.72±0.01 ^h
21			60	1.21±0.11 ^{op}
22			20	5.74±0.04 ^c
23	100	30	40	6.14±0.24 ^b
24			60	6.25±0.01 ^{ab}
25			20	1.30±0.17 ^{no}
26		40	40	2.71±0.01 ^h
27			60	1.29±0.05 ^{no}

ผลการศึกษาศักดิ์ด้วยวิธีอัลตราโซนิคและวิธีดั้งเดิม

ในการศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบปริมาณอัลลิซินที่สกัดได้จากการสกัดด้วยอัลตราโซนิค (Ultrasonic-assisted extraction: UAE) ที่ความถี่ 45 กิโลเฮิร์ต อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที กับการสกัดด้วยวิธีการดั้งเดิม (Conventional extraction: CE) โดยผลการทดลองแสดงในภาพที่ 19 พบว่า ปริมาณอัลลิซินที่สกัดด้วยอัลตราโซนิคมีค่าเท่ากับ 6.29 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ปริมาณอัลลิซินที่สกัดด้วยวิธีการดั้งเดิมมีค่าเท่ากับ 1.17 ± 0.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าการสกัดด้วยอัลตราโซนิคสามารถสกัดอัลลิซินจากกระเทียมได้สูงกว่าการสกัดด้วยวิธีการดั้งเดิมถึง 5.4 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากว่าในระหว่างการใช้อัลตราโซนิคช่วยสกัดจะเกิดปรากฏการณ์ควิเทชัน เมื่อคลื่นอัลตราโซนิคผ่านเข้าไปตัวทำละลายจะมีส่วนของช่วงอัดและช่วงขยาย ในช่วงขยายจะทำให้เกิดฟองอากาศเล็กๆ จำนวนมากในตัวทำละลาย จากนั้นเมื่อฟองอากาศได้รับแรงจากคลื่นอัลตราโซนิคในช่วงอัดจะทำให้ฟองอากาศนั้นแตกออกและเป็นเป็นแรงดันพุ่ง (pressure jet) ที่มีความแรงมากจนทำให้เจาะทำลายผนังเซลล์ได้ เมื่อผนังเซลล์พีชแตกออกจึงส่งผลให้เกิดการถ่ายเทมวลของสารสกัดที่อยู่ภายในเซลล์พีชออกมาอยู่ในตัวทำละลายได้ดีขึ้น (Vinatoru et al., 2017) ส่วนในกรณีการสกัดด้วยวิธีการดั้งเดิมจะมีเพียงแรงกลที่เกิดจากการกวนเท่านั้นจึงทำให้ปริมาณอัลลิซินที่สกัดได้น้อยกว่าการใช้อัลตราโซนิค โดยผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการวิจัยของ Žlabur et al. (2016) ที่รายงานว่า การใช้อัลตราโซนิคช่วยสกัดสารแคโรทีนอยด์และคลอโรฟิลล์จากใบสาระแหน่และใบมินท์ มีประสิทธิภาพการสกัดสูงกว่าการสกัดด้วยวิธีการดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 22 ปริมาณสารอัลลิซินที่สกัดได้จากกระเทียมด้วยเทคนิคการสกัดแบบอัลตราโซนิค
เปรียบเทียบกับวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli*

ในการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจะใช้สารสกัดที่ได้จากกระเทียมมาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตโดยวิธี Broth dilution method เพื่อสามารถคำนวณออกมาเป็นร้อยละของการยับยั้งการเจริญเติบโต (%Inhibition) จากนั้นทำการพิจารณาจากความเข้มข้นของสารสกัดอัลลิซินที่ต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* มากกว่าร้อยละ 90 โดยผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งพบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดอัลลิซินที่ 12.50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli* ได้มากกว่าร้อยละ 90 โดยสารอัลลิซินสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้โดยการที่พันธะไดซัลไฟด์ภายในโมเลกุลอัลลิซินเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์หลายชนิดในเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้ระบบการทำงานภายในเซลล์จุลินทรีย์เสียหาย (บุญญวดี และคณะ, 2558) โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าในช่วงใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Yoshida et al. (1999) ที่รายงานว่า ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดอัลลิซินที่ 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli* นอกจากนี้ Gambogou et al. (2018) ยังแสดงว่าการใช้สารสกัดจากกระเทียมที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 12.50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากกว่าร้อยละ 90 เช่นเดียวกัน

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดจากกระเทียมต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 โดยวิธี Optical density assay (OD600)

ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	การยับยั้งการเจริญเติบโต (เปอร์เซ็นต์)
50.00	99.30±0.31 ^a
25.00	98.75±0.23 ^{ab}
12.50	97.75±0.53 ^b
6.25	44.36±3.17 ^c
3.13	19.81±15.24 ^d
1.56	5.54±1.48 ^e

จากผลการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดกระเทียมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ที่ความเข้มข้นของสารสกัดตั้งแต่ 12.50 ไมโครกรัมต่อลิตร สามารถคิดเทียบเท่าเป็น 12.50 ไมโครกรัมต่อกรัม สมมุติว่าผลิตภัณฑ์ที่ต้องการใส่สารสกัดเป็นน้ำพริก แสดงว่าน้ำพริก 1 กรัม ต้องใส่สารสกัดกระเทียม 12.50 ไมโครกรัม จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ ดังนั้นการพัฒนาสารสกัดจากกระเทียมเป็นสารกันเสียจากธรรมชาติเพื่อทดแทนการใช้สารกันเสียสังเคราะห์สามารถทำได้ เนื่องจากพืชสมุนไพรหลายชนิดก็สามารถที่จะนำมาทดแทนการใช้สารกันเสียได้ อาทิเช่น สารสกัดจากฟางสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. aureus*, *E. coli* และ *S. typhimurium* ได้ และสามารถลดปริมาณเชื้อดังกล่าวในผลิตภัณฑ์อาหารกึ่งสำเร็จรูปได้อย่างมีประสิทธิภาพ (นฤพร และศุภิณี, 2549) ดังนั้นการใช้สารสกัดจากกระเทียมก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการทดแทนสารกันเสียสังเคราะห์ได้ นอกจากนี้งานวิจัยของ ศรีธญา และคณะ (2560) ยังใช้สารสกัดจากสมุนไพรพลิงกาสาและเปลือกมังคุด เพื่อใช้เป็นสารกันบูดในผลิตภัณฑ์ยาและเครื่องสำอางได้เช่นกัน งานวิจัยของ ศุภิเรศร์ และคณะ (2558) นำน้ำสมุนไพรจากดอกกระเจี๊ยบแดง ดอกคำฝอยและดอกอัญชันมายับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*, *L. monocytogenes* และ *S. typhimurium* ในนม พบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อ *E. coli* และยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* และ *S. typhimurium* ได้ นอกจากนี้การผสมน้ำสมุนไพรในนมยังช่วยแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มขึ้นมากกว่านมที่ไม่มีการเติมน้ำสมุนไพร

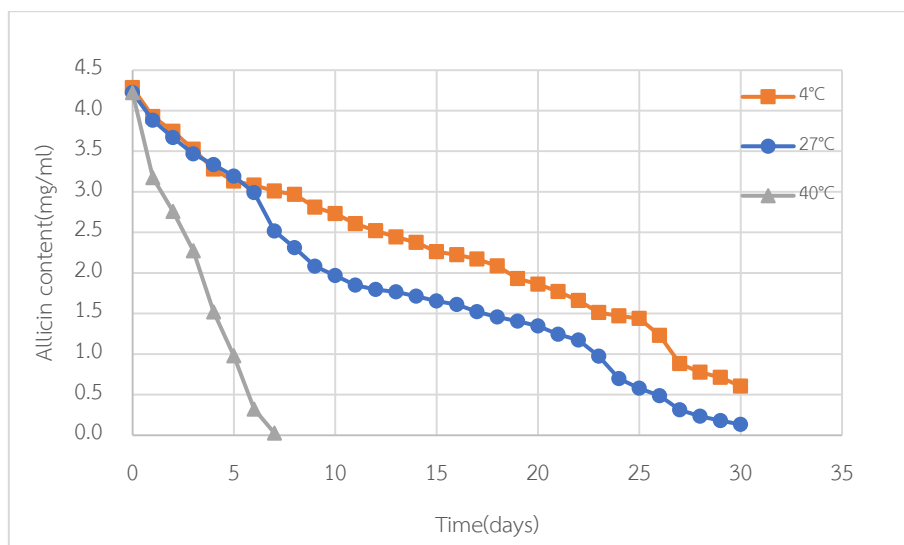
นอกจากการนำสารสกัดไปพัฒนาเป็นสารกันเสียจากธรรมชาติ ยังสามารถนำไปพัฒนาทางด้านบรรจุภัณฑ์ที่สัมผัสกับอาหาร งานวิจัยของ รินรดา และคณะ (2560) พัฒนาผลิตภัณฑ์แผ่นดูดความชื้นด้านแบคทีเรีย โดยใช้สารพอลิเมอร์จากธรรมชาติที่สามารถรับประทานได้ เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus* และ *Brochothrix thermosphacta* ในชิ้นเนื้อวัวและเนื้อไก่แช่เย็น พบว่าสามารถลดปริมาณของเชื้อแบคทีเรียและสามารถใช้ดูดซับความชื้นได้ใกล้เคียงกับการใช้แผ่นดูดซับความชื้นทางการค้า งานวิจัยของ ณัฐธิดา และคณะ (2558) ศึกษาการใช้กระดาษต่อต้านจุลินทรีย์ที่ซึบสารสกัดจากชาเพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรค ได้แก่ *E. coli* และ *S. aureus* และเชื้อก่อให้เกิดการเสื่อมเสียที่สร้างฮีสตามีน ได้แก่ *Pediococcus* spp. และ *Lactobacillus plantarum* ในเนื้อหมูสดแช่เย็น พบว่า การใช้กระดาษต่อต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากสารสกัดจากชาในบรรจุภัณฑ์ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและการสร้างสารฮีสตามีนโดยแบคทีเรียได้ จากงานวิจัยที่กล่าวมาการพัฒนาสารสกัดจากกระเทียมเป็นผลิตภัณฑ์สามารถทำได้หลายรูปแบบทั้งการเป็นสารกันเสียจากธรรมชาติ ยาต้านจุลชีพและพัฒนาในด้านของบรรจุภัณฑ์ที่สามารถต้านเชื้อได้

ผลการศึกษาความคงตัวของอัลลิซินระหว่างการรักษา

ในการศึกษาความคงตัวของอัลลิซินระหว่างการรักษา จะนำสารสกัดอัลลิซินที่ได้จากกระเทียมเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4, 27 และ 40 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาหาปริมาณสารอัลลิซินที่คงเหลือดังแสดงในภาพที่ 24 พบว่าเมื่อระยะเวลาการรักษาเพิ่มขึ้นปริมาณอัลลิซินจะมีค่าลดลง นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิในระหว่างการรักษาจะเห็นได้ว่า อัตราการลดลงของปริมาณอัลลิซินที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสสูงมากกว่าการรักษาที่อุณหภูมิ 27 และ 4 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อาจมีสาเหตุจากการที่อัลลิซินสามารถเกิดการเสื่อมสลายจาก 2 กระบวนการคือ การสลายตัวของอัลลิซินตามธรรมชาติและการสลายตัวจากความร้อน โดยในกระบวนการแรก เมื่อเวลาการรักษาเพิ่มขึ้นอัลลิซินจะเกิดการสลายตัวเป็นเป็นสารประกอบซัลไฟด์ เช่น Allyl sulfide และ Polysulfides (Wang et al., 2015) และกระบวนการที่สอง สารอัลลิซินเป็นสารประกอบที่ไม่ทนต่อความร้อน ที่อุณหภูมิสูงกว่า โดยอัลลิซินจะเกิดการสลายตัวที่อุณหภูมิสูงกว่า 36 องศาเซลเซียส (Poojary et al., 2017; Zhao et al., 2014) ดังนั้นหากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ อัลลิซินจะเกิดการสลายตัวตามธรรมชาติเพียงอย่างเดียวจึงมีอัตราการลดลงช้ากว่าการรักษาไว้ที่อุณหภูมิสูง

จากภาพที่ 24 แสดงปริมาณสารอัลลิซินที่เก็บรักษาตามอุณหภูมิพบว่าปริมาณสารอัลลิซินจะลดลงอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาการรักษาและเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาณสารอัลลิซินจะลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันแรกของการทดลองจนถึงวันที่ 30 ของการทดลองและยังสามารถตรวจพบสารอัลลิซินได้อยู่ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียสหรืออุณหภูมิห้องเฉลี่ยใน 30 วันที่ทำการทดลองปริมาณสารอัลลิซินจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 7 ของการทดลองจากนั้นปริมาณสารอัลลิซินจะลดลงอย่างคงที่ไปจนถึงวันที่ 30 ของการทดลองและยังสามารถตรวจพบสารอัลลิซินได้หลังจากวันที่ 30 ของการทดลองเช่นเดียวกันแต่มีปริมาณที่น้อยกว่าการรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สุดท้ายการรักษาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณสารอัลลิซินจะลดลงอย่างรวดเร็วจนไม่สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 7 ของการทดลอง

การที่ปริมาณสารอัลลิซินลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เนื่องจากอัลลิซินเป็นสารที่ไม่เสถียรและไม่ทนต่อความร้อนทำให้สลายตัวได้ง่าย จากงานวิจัยของ Iberl et al. (1990) พบว่าการเก็บรักษาสารอัลลิซินไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส จะทำให้สารอัลลิซินแตกตัวเป็นสารจำพวกไตรซัลไฟด์เร็วขึ้นและจะแตกตัวหมดภายใน 48 ชั่วโมง และงานวิจัยของ Phoungchandang and Boonnattakorn (2008) พบว่าการเก็บรักษาสารสกัดกระเทียมเข้มข้นที่อุณหภูมิที่สูงกว่า 30 องศาเซลเซียส ทำให้การสลายตัวของสารอัลลิซินรวดเร็วมากกว่าการเก็บสารอัลลิซินไว้ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส

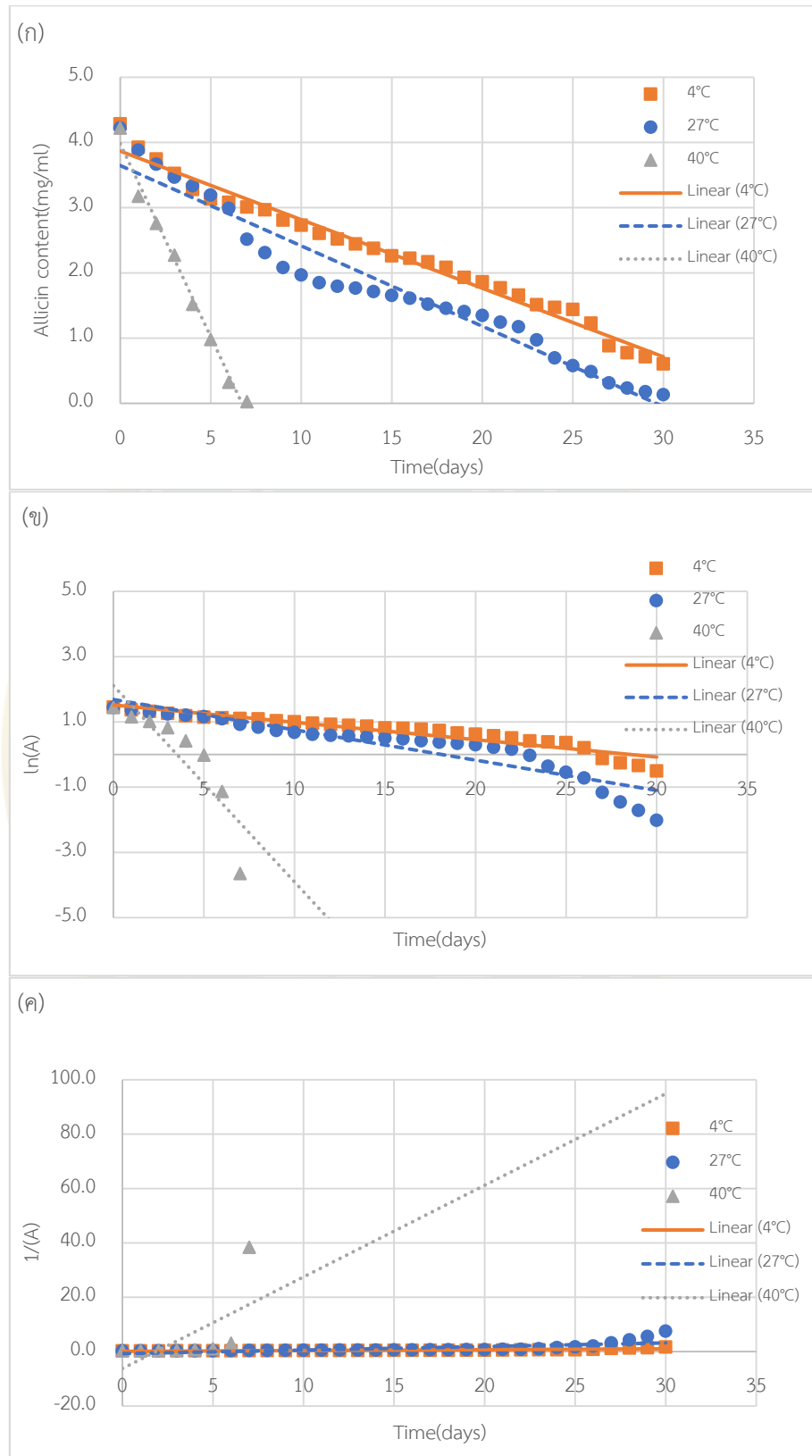


ภาพที่ 23 ปริมาณสารอัลลิซินระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ

เมื่อนำข้อมูลปริมาณสารอัลลิซินที่เก็บรักษามาหาอันดับของปฏิกิริยา (Order of reaction) ในสมการที่ (1) (2) และ (3) สำหรับปฏิกิริยาอันดับศูนย์ ปฏิกิริยาอันดับหนึ่งและปฏิกิริยาอันดับสองตามลำดับ เมื่อนำค่าที่คำนวณมาเปรียบเทียบและหาเส้นแนวโน้มของปฏิกิริยา ดังแสดงในภาพที่ 25 (ก)-(ค) พบว่าข้อมูลปริมาณสารอัลลิซินที่เก็บรักษาสัมพันธ์กับปฏิกิริยาอันดับศูนย์มากกว่าปฏิกิริยาอันดับหนึ่งและปฏิกิริยาอันดับสองดังแสดงค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับ (k) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสิ้นใจ (R²) ในตารางที่ 3

จากตารางที่ 3 แสดงค่าปริมาณสารอัลลิซินที่ตามอันดับปฏิกิริยาอันดับศูนย์ ปฏิกิริยาอันดับหนึ่งและปฏิกิริยาอันดับสองตามลำดับ โดยคำนวณตามสมการปฏิกิริยาอันดับศูนย์มีค่า R² เท่ากับ 0.98 0.95 และ 0.99 ค่าอัตราคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับ (k) เท่ากับ -0.105 -0.123 และ -0.592 เรียงตามอุณหภูมิที่เก็บรักษา เมื่อนำคำนวณตามสมการปฏิกิริยาอันดับหนึ่งมีค่า R² เท่ากับ 0.90 0.86 และ 0.77 ค่าอัตราคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับ (k) เท่ากับ -0.053 -0.093 และ -0.602 และเมื่อนำคำนวณตามสมการปฏิกิริยาอันดับสองมีค่า R² เท่ากับ 0.71 0.50 และ 0.39 ค่าอัตราคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับ (k) เท่ากับ 0.033 0.132 และ 3.37 พิจารณาจากค่า R² พบว่าที่ปฏิกิริยาอันดับศูนย์มีค่าสูงที่สุดจึงนำค่า k ของปฏิกิริยาอันดับศูนย์มาคำนวณเพื่อหาค่าครึ่งชีวิตของปฏิกิริยา (t_{1/2}) ซึ่งสามารถคำนวณตามสมการที่ (5)

จากผลการทดลองการเก็บรักษาปริมาณสารอัลลิซินลดลงตามอันดับปฏิกิริยาอันดับศูนย์สามารถคำนวณค่าครึ่งชีวิตของปฏิกิริยาได้ดังนี้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีค่าครึ่งชีวิตของปฏิกิริยาเท่ากับ 21 วัน ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส มีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 17 วัน และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 4 วัน



ภาพที่ 24 ปริมาณสารอัลลิซินตามอันดับปฏิกิริยา (ก) ปฏิกิริยาอันดับศูนย์ (ข) ปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง และ (ค) ปฏิกิริยาอันดับสอง

ตารางที่ 3 อัตราคงที่ (k) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของปฏิกิริยาอันดับศูนย์ ปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง และปฏิกิริยาอันดับสอง

ปฏิกิริยาอันดับ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อัตราคงที่การ เกิดปฏิกิริยา (k)	ค่าสัมประสิทธิ์ การตัดสินใจ R^2
ปฏิกิริยาอันดับศูนย์	4	-0.105	0.98
	27	-0.123	0.95
	40	-0.592	0.99
ปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง	4	-0.053	0.90
	27	-0.093	0.86
	40	-0.602	0.77
ปฏิกิริยาอันดับสอง	4	0.033	0.71
	27	0.132	0.50
	40	3.370	0.39

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการศึกษา

จากผลการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการใช้อัลตราโซนิกช่วยสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากกระเทียมเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* สามารถสรุปได้ดังนี้

1. สภาวะที่เหมาะสมในการใช้อัลตราโซนิกช่วยสกัดสารอัลลิซินจากกระเทียมคือที่ความถี่ 45 กิโลเฮิร์ต อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที
2. ปริมาณสารอัลลิซินที่ได้จากวิธีสกัดด้วยอัลตราโซนิกได้ปริมาณมากกว่าวิธีสกัดแบบดั้งเดิม 5.4 เท่า
3. จากการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากถึง 97.75 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
4. ผลของความคงตัวของอัลลิซินระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 27 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นไปตามปฏิกิริยาอันดับศูนย์ โดยมีค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 21 17 และ 4 วันตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. กระเทียมที่นำมาสกัดในแต่ละครั้งไม่ควรปอกเปลือกหรือป่นทิ้งไว้ข้ามวันเนื่องจากจะทำให้ปริมาณสารอัลลิซินสลายตัวไป
2. ควรมีการศึกษาคุณภาพทางประสาทสัมผัสเพิ่มเติม เพื่อสามารถนำสารสกัดไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับสารกันเสียจากธรรมชาติ

บรรณานุกรม

- จิราภรณ์ บุรคร และ เรือนแก้ว ประพฤติ. 2555. ผลของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทย จำนวน 7 ชนิดต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย. *วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก*, 10(1), 11-22.
- ชุตินา วันเพ็ญ, บุชราภรณ์ งามปัญญา, สุวัฒนา พุกกะศรี, พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ และ ปราโมทย์ คุวิจิตรจารุ. 2556. ผลการพรีทริทเมนต์ด้วยอัลตราโซนิคต่อการสกัดอินนูลินจากหัวแก่นตะวัน. *วารสารวิจัยและพัฒนา มจร.*, 36(2), 249-258.
- ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์. 2544. *เครื่องมือวิทยาศาสตร์*. โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา.
- ณัฐธิดา วังธียอง, ณัฐนันท์ ภูไพศาล, นุชนาฏ คำสม, ผานิต ทองเที่ยง, พรภัทร แก้วบุญช่วย และ สุกันธา โอศิริพันธุ์. 2558. การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างฮีสตามีนและแบคทีเรียก่อโรคในเนื้อหมูสดแช่เย็นโดยใช้กระดาษเคลือบสารสกัดจากข่า. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- นฤพร สุทธิสวัสดิ์ และ ศุภธินี ธโนศวรรยางกูร. 2549. *ฤทธิ์กันเสียของฝาง (Caesalpinia sappan L.) ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทน้ำพริก*. มหาวิทยาลัยมหิดล.
- บุญญวดี จิระวุฒิ, เนตรา สมบูรณ์แก้ว, สุพี วนศิริกุล, อังราพร ศรีจูดานู และ อมรา ชินภูมิ. 2558. การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และลดปริมาณสารแอฟลอทอกซินโดยสารออกฤทธิ์จากกรเทียม. *Thai Agricultural Research*, 33(1).
- บุษกร อุตระชาติ. 2552. *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. ศูนย์หนังสือมหาวิทยาลัยทักษิณ.
- ประพฤกษ์ ตั้งมั่นคง, ศรีสมัย วิริยารัมภะ, สุขสันต์ ฉ่ำสิงห์ และ สุตธิษา เหล่าเปี่ยม. 2555. *ประสิทธิภาพของสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย Escherichia coli และ Salmonella typhimurium*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ประเสริฐ ทองเจริญ. 2550. กระเทียม. *Buddhachinaraj Medical Journal*, 24(1), 88-92.
- รินรดา พัฒน์ใหญ่ยิ่ง, เพ็ญโฉม พจนธารี และ Catherine Nettles Cutter. 2560. *การผลิตแผ่นดูดซับความชื้นที่มีคุณสมบัติต้านแบคทีเรียที่ทำให้เนื้อสัตว์แช่เย็นเน่าเสีย*. มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา.
- วัชรา สุวรรณอาศน์ และ ศศิธร วุฒิมวิชัย. 2553. *ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและของผักในเรือนทดลอง*. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

- วีรานูช หลาง. 2552. **คู่มือตรวจวิเคราะห์ด้านจุลชีววิทยาทางอาหาร**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศรัณยา ธาธาแสง, สิริมา สายรวมญาติ, สุวรรณา เขียวอังกูร, บุญญาณี ศุภผล, ปิยะวรรณ บุษชา และ ญัตตรา จันทร์สุวานิชย์. 2560. การศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรผลพื้งกาสาและเปลือกมังคุดเพื่อใช้เป็นสารกันบูดในผลิตภัณฑ์ยาและเครื่องสำอาง. **Thai Food and Drug Journal**, 20(2), 30-36.
- ศุภิเรศร์ เสมอสวัสดิ์, อารญา หนูขวัญ และ วรพรพรณี เผ่าทองสุข. 2558. ผลของน้ำสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารและส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในนม. **การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระหว่างสถาบัน ครั้งที่ 3**.
- สิงหนาท พวงจันทร์แดง และ รุ่งกานต์ บุญนาคกร. 2551. ผลของการเก็บรักษาต่อคุณภาพของสารสกัดกระเทียม. **วารสารวิจัย มข.**, 13(2)
- สุนิดา เมืองโคตร, ทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล, วาริช ศรีละออง, เฉลิมชัย วงษ์อารี และ ทรงศิลป์ พจน์ชนะชัย. 2557. การยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในคนจากสารสกัดกระเทียม หอมแดง และพริกแห้งคั่ว. **วิทยาศาสตร์เกษตร**, 45(2), 297-300.
- อรัญญา พรหมกุล, วรัญญา วงศ์ไชยสิทธิ์, ไอรดา อักษ์เสน และ เกรียงไกร พัทธยากร. 2558. การใช้คลื่นอัลตราโซนิกในการสกัดแอนโทไซยานินจากกากเม่า. **แก่นเกษตร**, 43(1).
- อารมณ แสงวนิชย์, ชัยพัฒน์ จิระธรรมจารี, เศรษฐพงศ์ เลขะวัฒน์ และ ทวีพงศ์ สุวรรณโร. (2537). **สมุนไพรพื้นบ้านเพื่อป้องกันกำจัดศัตรูพืช**.
- Ankri, S. & Mirelman, D. 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. **Microbes and Infection**, 1(2), 125-129.
- Arora, D. S. & Kaur, J. 1999. Antimicrobial activity of spices. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 12(3), 257-262.
- Arzanlou, M., Bohlooli, S. & Omid, M. R. 2015. Purification of Allicin From Garlic Extract Using Semi-Preparative High Performance Liquid Chromatography. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, 10(2).
- Atchley, A. A. & Crum, L. A. (1998). Acoustic cavitation and bubbles dynamics. In K. S. Suslick (Ed.), **Ultrasounds, its chemical, physical and biological effects**. (pp. 1-64). New York: VCH Publishers, Inc.
- Baghalian, K., Ziai, S. A., Naghavi, M. R., Badi, H. N. & Khalighi, A. 2005. Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes.

- Scientia Horticulturae*, 103(2), 155-166.
- Bakri, I. M. & Douglas, C. W. I. 2005. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Archives of oral biology*, 50(7), 645-651.
- Berg, H. C. 2008. **E. coli in Motion**. Springer Science & Business Media.
- Bermudez-Aguirre, D. 2017. **Ultrasound: Advances in Food Processing and Preservation**. Elsevier Science.
- Bimakr, M., Rahman, R. A., Saleena Taip, F., Adzahan, N. M. & Islam Sarker, Z. 2013. Ultrasound-assisted extraction of valuable compounds from winter melon (*Benincasa hispida*) seeds. *International Food Research Journal*, 20(1).
- Block, E. 2010. **Garlic and Other Alliums: The Lore and The Science**. RSC Publishing.
- Calvey, E. M., Matusik, J. E., White, K. D., DeOrazio, R., Sha, D. & Block, E. 1997. Allium Chemistry: Supercritical Fluid Extraction and LC-APCI-MS of Thiosulfinates and Related Compounds from Homogenates of Garlic, Onion, and Ramp. Identification in Garlic and Ramp and Synthesis of 1-Propanesulfinothioic Acid S-Allyl Ester. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(11), 4406-4413.
- Curtis, H., Noll, U., Störmann, J. & Slusarenko, A. J. 2004. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65(2), 79-89.
- Deng, J., Xu, Z., Xiang, C., Liu, J., Zhou, L., Li, T., Yang, Z. & Ding, C. 2017. Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37(328-334).
- DiscoveryOrganics. 2015. (30 July). **Why is B.C. garlic so darn good**. Available <https://www.discoveryorganics.ca/why-is-b-c-garlic-so-darn-good/>.
- Farias-Campomanes, A. M., Horita, C. N., Pollonio, M. A. & Meireles, M. A. A. 2014. Allicin-rich extract obtained from garlic by pressurized liquid extraction: quantitative determination of allicin in garlic samples. *Food and Public Health*, 4(6), 272-278.
- Frizzell, L. A. (1988). Biological effects of acoustic cavitation. In K. S. Suslick (Ed.), **Ultrasounds, its chemical, physical and biological effects** (pp. 287-303). New

York: VCH Publishers, Inc.

- Gambogou, B., Ouattara, A. K., Taale, E., Karou, S. D., Ameyapoh, Y. A. & Simpore, J. 2018. **Garlic as Alternative Therapy to Treat Uropathogene Bacteria in Women with Urinary Tract Infection in Lomé, Togo.**
- González-Centeno, M. R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rosselló, C. & Femenia, A. 2014. Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.)—a response surface approach. **Ultrasonics sonochemistry**, 21(6), 2176-2184.
- Hadiyanto, Sutrisnorhadi, Sutanto, H., Suzery, M., Soetrisnanto, D. & Azizah, N. 2015. **The effects of temperature and frequencies in ultrasound assisted extraction of phycocyanin from microalgae Spirulina sp.** AIP Publishing.
- Heda, N. 2013. (4 June) **Spectrophotometry-Principles.** Available <http://namrataheda.blogspot.com/2013/06/spectrophotometry-part-1.html>.
- Iberl, B., Winkler, G. & Knobloch, K. 1990. Products of alliin transformation: ajoenes and dithiins, characterization and their determination by HPLC. **Planta Medica**, 56(02), 202-211.
- Jemain, S., Jamal, P., Raus, A., Amid, A. & Jaswir, I. 2017. Effects of process conditions on the ultrasonic extraction of phenolics scavenger from *Curcuma caesia* rhizome. **International Food Research Journal**, 24(Suppl.).
- Jones, M., Collin, H., Tregova, A., Trueman, L., Brown, L., Cosstick, R., Hughes, J., Milne, J., Wilkinson, M. & Tomsett, A. 2007. The biochemical and physiological genesis of alliin in garlic. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, 1(1), 21-24.
- Kimbaris, A. C., Siatis, N. G., Daferera, D. J., Tarantilis, P. A., Pappas, C. S. & Polissiou, M. G. 2006. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). **Ultrasonics sonochemistry**, 13(1), 54-60.
- Lawson, L. D. & Gardner, C. D. 2005. Composition, stability, and bioavailability of garlic products used in a clinical trial. **Journal of agricultural and food chemistry**, 53(16), 6254-6261.
- Liao, J., Zheng, N. & Qu, B. 2016. An improved ultrasonic-assisted extraction method

- by optimizing the ultrasonic frequency for enhancing the extraction efficiency of lycopene from tomatoes. **Food analytical methods**, 9(8), 2288-2298.
- Liu, Y., She, X.-R., Huang, J.-B., Liu, M.-C. & Zhan, M.-E. 2017. Ultrasonic-extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus urinaria*: optimization model and antioxidant activity. **Food Science and Technology**, AHEAD), 0-0.
- Marchese, A., Barbieri, R., Sanches-Silva, A., Daglia, M., Nabavi, S. F., Jafari, N. J., Izadi, M., Ajami, M. & Nabavi, S. M. 2016. Antifungal and antibacterial activities of allicin: A review. **Trends in Food Science & Technology**, 52(49-56).
- Mathialagan, R., Mansor, N., Shamsuddin, M. R., Uemura, Y. & Majeed, Z. 2017. Optimisation of Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE) of Allicin from Garlic (*Allium sativum* L.). **Chemical Engineering Transactions**, 56(1747-1752).
- Miron, T., Shin, I., Feigenblat, G., Weiner, L., Mirelman, D., Wilchek, M. & Rabinkov, A. 2002. A spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfinates. **Analytical biochemistry**, 307(1), 76-83.
- Mundasad, S. 2011. **BBC News**.
- Olech, Z. & Zaborska, W. 2012. A Spectrophotometric Assay for Total Garlic Thiosulfinates Content. Kinetic Aspects of Reaction with Chromogenic Thiols. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, 62(1).
- Phoungchandang, S. & Boonnattakorn, R. 2008. Effect of storage on quality of concentrated garlic solution. **Warasan Wichai Mokho.**, 13(2)
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.-S., Le Bourvellec, C., Renard, C. M. & Chemat, F. 2012. Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. **Journal of Food Engineering**, 111(1), 73-81.
- PlantingMan. 2018. **Garlic (*Allium sativum*) Vegetable garden**. Available <https://www.plantingman.com/garlic-allium-sativum-vegetable-garden/>
- Poojary, M. M., Putnik, P., Kovačević, D. B., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Dias, D. A. & Shpigelman, A. 2017. Stability and extraction of bioactive sulfur compounds from *Allium* genus processed by traditional and innovative technologies. **Journal of Food Composition and Analysis**, 61(28-39).
- Povey, M. J. & Mason, T. J. 1998. **Ultrasound in food processing**. Springer Science &

Business Media.

- Pszczola, D. E. 2002. Antimicrobials: setting up additional hurdles to ensure food safety. **Food Technology**, 56(6), 99-108.
- Rassem, H. H. & Nour, A. H. 2016. Techniques for extraction of essential oils from plants: a review. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, 10(16), 117-127.
- Rosen, C. J., Becker, R., Fritz, V., Hutchison, B., Percich, J., Tong, C. & Wright, J. 2008. **Growing garlic in Minnesota**. University of Minnesota Extension.
- Sala, F. J., Burgos, J., Condon, S., Lopez, P. & Raso, J. (1995). Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. In G. W. Gould (Ed.), **New methods of food preservation** (pp. 176-204). Glasgow: Blackie Academic & Professional.
- Sasidharan, S., Jothy, S. L., Vijayarathna, S., Kavitha, N., Oon, C. E., Chen, Y., Dharmaraj, S., Lai, N. S. & Kanwar, J. R. (2018). Conventional and Non-conventional Approach towards the Extraction of Bioorganic Phase. In **Bioorganic Phase in Natural Food: An Overview** (pp. 41-57): Springer.
- Slusarenko, A. J., Patel, A. & Portz, D. 2008. Control of plant diseases by natural products: Allicin from garlic as a case study. **European Journal of Plant Pathology**, 121(3), 313-322.
- Suslick, K. S. (1988). Homogeneous sonochemistry. In K. S. Suslick (Ed.), **Ultrasounds, its chemical, physical and biological effects** (pp. 121-164). New York: VCH Publishers, Inc.
- Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L. & Mason, T. 2001. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics sonochemistry**, 8(2), 137-142.
- Tomšik, A., Pavlič, B., Vladić, J., Ramić, M., Brindza, J. & Vidović, S. 2016. Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). **Ultrasonics sonochemistry**, 29(502-511).
- Vinatoru, M., Mason, T. & Calinescu, I. 2017. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 97(159-178).

- Wang, H., Li, X., Liu, X., Shen, D., Qiu, Y., Zhang, X. & Song, J. 2015. Influence of pH, concentration and light on stability of allicin in garlic (*Allium sativum* L.) aqueous extract as measured by UPLC. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 95(9), 1838-1844.
- Xu, Y. & Pan, S. 2013. Effects of various factors of ultrasonic treatment on the extraction yield of all-trans-lycopene from red grapefruit (*Citrus paradise* Macf.). **Ultrasonics sonochemistry**, 20(4), 1026-1032.
- Yoshida, H., Katsuzaki, H., Ohta, R., Ishikawa, K., Fukuda, H., Fujino, T. & Suzuki, A. 1999. Antimicrobial activity of the thiosulfinates isolated from oil-macerated garlic extract. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 63(3), 591-594.
- Zhao, D., Li, X., Zhang, H., Rena-Kasim & Chen, J. 2014. HPLC Fingerprint characteristics of active materials of garlic and other *Allium* species. **Analytical Letters**, 47(1), 155-166.
- Žlabur, J. Š., Voća, S., Dobričević, N., Plietić, S., Galić, A., Boričević, A. & Borić, N. 2016. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from lemon balm and peppermint leaves. **International agrophysics**, 30(1), 95-104.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์หาความแปรปรวน (ANOVA)

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Frequency	Between Groups	59488.500	60	991.475	1.167	.362
	Within Groups	16993.500	20	849.675		
	Total	76482.000	80			
Temperature	Between Groups	3683.333	60	61.389	.715	.841
	Within Groups	1716.667	20	85.833		
	Total	5400.000	80			
Time	Between Groups	18333.333	60	305.556	1.871	.061
	Within Groups	3266.667	20	163.333		
	Total	21600.000	80			

ภาพภาคผนวกที่ 1 ผลการวิเคราะห์ ANOVA

การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบตัวแปรตามตัวเดียว (Univariate analysis of variance)

การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบตัวแปรตามตัวเดียว เนื่องจากค่า P-value ของตัวแปรทุกตัวมีค่าน้อยกว่าระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงว่าค่าเฉลี่ยของตัวแปรแต่ละตัวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงต้องทำการเปรียบเทียบข้อมูลในแต่ละตัวแปร

Between-Subjects Factors

		N
Frequency	28	27
	45	27
	100	27
Temperature	20	27
	30	27
	40	27
Time	20	27
	40	27
	60	27

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Allicin

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	259.132 ^a	26	9.967	1426.571	.000
Intercept	673.633	1	673.633	96420.371	.000
Frequency	40.257	2	20.128	2881.069	.000
Temperature	129.172	2	64.586	9244.483	.000
Time	6.025	2	3.013	431.207	.000
Frequency * Temperature	72.213	4	18.053	2584.057	.000
Frequency * Time	5.066	4	1.266	181.268	.000
Temperature * Time	4.093	4	1.023	146.480	.000
Frequency * Temperature * Time	2.306	8	.288	41.264	.000
Error	.377	54	.007		
Total	933.143	81			
Corrected Total	259.510	80			

a. R Squared = .999 (Adjusted R Squared = .998)

ภาพภาคผนวกที่ 2 ผลวิเคราะห์ Univariate analysis of variance

Post Hoc Tests

Frequency

Homogeneous Subsets

Allicin

Duncan^{a..b}

Frequency	N	Subset		
		1	2	3
28	27	1.9196		
100	27		3.1463	
45	27			3.5856
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .007.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 27.000.

b. Alpha = 0.05.

Temperature

Homogeneous Subsets

Allicin

Duncan^{a..b}

Temperature	N	Subset		
		1	2	3
40	27	1.8830		
20	27		2.1033	
30	27			4.6652
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .007.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 27.000.

b. Alpha = 0.05.

Time

Homogeneous Subsets

Allicin

Duncan^{a..b}

Time	N	Subset		
		1	2	3
20	27	2.5630		
60	27		2.8589	
40	27			3.2296
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .007.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 27.000.

b. Alpha = 0.05.

ภาพภาคผนวกที่ 3 ผล Post Hoc แบบ Duncan

การวิเคราะห์การเปรียบเทียบเชิงซ้อน (Post Hoc tests)

Duncan ^{a,b}		Subset																					
	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16						
Ttt	3	1.0733																					
19	3	1.1100																					
18	3	1.2067	1.2067																				
21	3		1.2867	1.2867																			
27	3		1.3033	1.3033	1.3833																		
25	3			1.3833	1.4200																		
4	3			1.4200	1.4700																		
3	3				1.4800																		
16	3					1.7300																	
2	3					1.8467																	
1	3					1.8467	1.8467																
5	3					1.9733	1.9733	2.1300															
7	3							2.1300															
8	3								2.3600														
17	3									2.6000													
9	3										2.6000												
6	3											2.7133											
26	3												2.7133										
20	3													2.7200									
12	3														2.8667								
10	3															3.0433							
11	3																3.3900						
13	3																	5.4667					
22	3																		5.6233				
23	3																			6.1367			
24	3																				6.2533		
15	3																					6.2733	
14	3																						6.2900
Sig.		.069	.187	.079	.204	.093	.069	1.000	1.000	.114	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.063	.063	.063	.063	.063	.063	.617

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .007.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = 0.05.

ภาพภาคผนวกที่ 4 ผลความแตกต่างระหว่างสารสกัด



ภาคผนวก ข
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Mueller-Hinton Broth (MHB)

ส่วนประกอบ	Beef extract	300.0 กรัม
	Bacto Casamino acids technical	17.5 กรัม
	Bacto soluble starch	1.5 กรัม

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหาร 210 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากัน จากนั้นต้มให้เดือดและทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Nitrate Agar (NA)

ส่วนประกอบ	Beef extract	3.0 กรัม
	Peptone	5.0 กรัม
	Agar	15.0 กรัม
	Distilled water	1000.0 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ชั่งอาหาร 23 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากัน จากนั้นต้มให้เดือดและทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

McFarland standard

วิธีเตรียม

นำ H_2SO_4 1% v/v ผสมกับ $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.175% w/v จะได้ตะกอนขาวขุ่นของ BaSO_4 อัตราส่วนของ H_2SO_4 1% และ $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.175% เพื่อเตรียม McFarland standard หมายเลขต่างๆ ดังตาราง

McFarland Standard No.	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
Approx. cell density ($\times 10^8/\text{ml}$)	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30



ภาคผนวก ค
เอกสารเผยแพร่งานวิจัย



Effect of various conditions on ultrasonic-assisted extraction of allicin from garlic (*Allium Sativum* Linn.)

Suphitchaya Kalantakuwan, Yardfon Tanongkankit, Jaturapatr Varith and Kanjana Narkprasom

Department of Food Engineering
Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University
Chiang Mai, Thailand

Medicinal properties of garlic (*Allium Sativum* Linn.) have been studied extensively, even though it has been used as a traditional remedy. This study examined the effects of various ultrasonic frequency (28, 45 and 100 kHz), extraction temperatures (20, 30 and 40°C) and extraction time (20, 40 and 60 min) on the extraction yield of allicin content from garlic. Extraction was most efficient at 45 kHz, while the extraction temperature of 30°C and time of 40 min. Under the optimal conditions, the allicin content was 6.282 ± 0.010 mg/ml. This study is important due to its ability to improve extraction of allicin content using ultrasonic-assisted extraction method.

Keywords—ultrasonic-assisted extraction; garlic; allicin

I. INTRODUCTION

In the recent years there has been an increase of interest for use of natural compound in the prevention and treatment of various diseases such as cancer, arthritis, diabetes, etc. [1, 2, 3, 4, 5, 6] Furthermore the utilization of natural compounds from various sources has been increased in the food industry. This is in an accordance with demand to replace synthetic and toxic additives with natural and safe one in food industry. Many previous studies have shown that various spices are used in food recipe not only for taste but also for food preservation since they possess antimicrobial compounds [7, 8, 9].

Garlic (*Allium Sativum* Linn.) which is one of spices can be consumed as fresh or utilized as a raw material in many dishes. It has been claimed to contain bioactive compounds having potential inhibitor for food poisoning and spoilage and increase shelf life in processed foods [10]. The health benefits of garlic have been attributed to its thiosulfates content.

Allicin (diallylthiosulfate) is the best know active compound of garlic and it represents approximately 70% of the overall thiosulfates. Allicin is not found in fresh garlic. The chemistry of garlic is extremely complex. Fresh garlic contains non-protein amino acid alliin abundant in garlic cloves and the enzyme alliinase (alliin lyase, EC 4.4.1.4), which are contained in different parts of the garlic plant. This unique structure is designed as a defense mechanism against microbial pathogens of the soil. When fungi or other soil

pathogens attack the cloves, the membrane of those compartments is destroyed, alliin is converted into a new compound called allicin. Can explain that allicin present or formed upon crushing the cloves. It is produced by the interaction of alliin with the enzyme alliinase.

Allicin is known to possess a vast variety of biological effect. Its pharmacological actions of anti-oxidant, anti-fungal, anti-hypertensive, anti-inflammatory, and inhibition of tumor [9, 11, 12]. Therefore, the extraction of this compound from plant cell is attractive.

Various extraction methods of bioactive compounds from plant matrices have been reported. Ultrasonic-assisted extraction (UAE) has been recommended by various reports as a one of the most efficient, inexpensive and simplest existing extraction systems which can be suitably operated for large-scale preparations [13, 14]. During the process, the collapse of cavitation bubbles leads to better cell disruption through the formation of micro jets due to asymmetrical bubble collapse near a solid surface. The occurring cavitation effect consequently facilitates the release of extractable compound by disrupting the plant cell walls, allowing greater penetration of solvent into the sample matrix, increasing the contact surface area between the solid and liquid phase. Using ultrasonic, extractions can be completed in short time with high reproducibility, reducing the consumption of solvent, simplifying manipulation and work-up, extraction at lower temperatures, giving higher purity of the final product, faster extraction rates and greater yields of product [15,16]. However, applied extraction process can substantially affect the quality and concentration of targeted compounds in extract production.

Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of ultrasonic-assisted extraction variables on allicin content. Effects of different extraction parameters such as ultrasonic frequency, extraction temperature and extraction time were investigated to best ultrasonic-assisted extraction condition with the highest allicin content.



II. MATERIALS AND METHODS

A. Preparation of the plant material

Fresh garlic (*Allium Sativum* Linn.) was obtained at local farm (Chiang Mai, Thailand). Garlic clove was cleaned and peeled outer skin off, then blend with water: 100 ml per 10 g. (0.1 g/ml) of garlic [17].

B. Ultrasonic-assisted extraction (UAE)

The garlic blended of 10 ml was extracted in an ultrasonic-assisted extraction sonication bath (W113 series, Japan). The suspension obtained was centrifuged at 4000 rpm for 20 minute. The single factor experiment was performed in a designed ultrasonic frequency ranged from 28 to 100 kHz, temperature ranged from 20 to 40°C and ultrasonic time ranged from 20 to 60 min. One factor was changed, while the other factors kept constant, and each single factor experiment was repeated three [18].

C. Conventional extraction

The conventional extraction process was carried out at the optimal condition obtained during UAE of garlic. The extraction was carried out incubated at 30°C for 30 min. After extraction, the extract was centrifuged at 4000 rpm for 20 min then filtrated and stored for further analysis [19].

D. Analytical methodology

The concentration of alliin in each extracts was determined spectrophotometrically by reaction with the thiol 4-mercaptopyridine [16]. Briefly, varying quantities of garlic extract were incubated with 4-mercaptopyridine (10^{-4} M) in 50 mM phosphate buffer 2 mM EDTA pH 7.2 which results in the formation of a mixed disulphide 4-allylmercaptopyridine, and the consequent shift in absorbance at 324 nm (λ_{max}) was monitored. ϵ_M 39,600 $M^{-1}cm^{-1}$ at 324 nm was used for the calculation of alliin concentration [20].

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Effect of ultrasonic frequency on alliin content.

In order to obtain the maximum alliin content form garlic, ultrasonic frequency were performed at three extraction frequency (28, 45 and 100 kHz). The effect of different ultrasonic frequency on alliin content shown in Fig. 1. It was reported that high frequency favors the more alliin content than low frequency. Likewise, at 45 and 100 kHz, increasing the ultrasonic frequency significantly increased the alliin content. But further in term of energy, 45 kHz was chosen as the ultrasonic frequency in succeeding experiments [13, 14, 15].

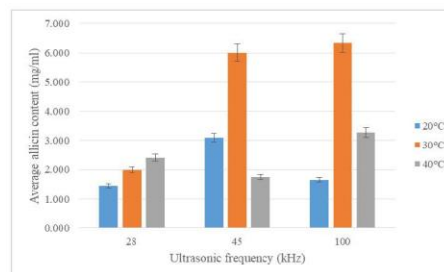


Fig. 1 Effect of ultrasonic frequency on alliin content while different extraction temperature.

B. Effect of temperature on alliin content

In this work, extraction temperature were carried out at 20, 30 and 40°C. As shown in Fig. 2, the alliin content was initially increased when the temperature increased from 20°C to 30°C and then decreased. Therefore, the extraction temperature at 30°C was chosen for further optimization studies [9, 11, 14].

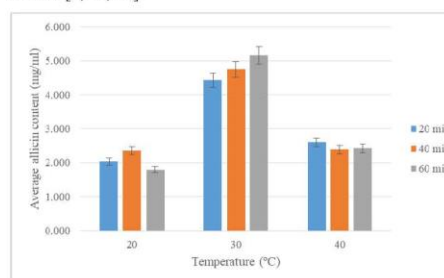


Fig. 2 Effect of extraction temperatures on alliin content while different extraction time.

C. Effect of extraction time on alliin content

The alliin content from garlic increased as the extraction time between 20 to 60 min, (Fig. 3) which significant not differences existed among 20, 40 and 60 min. However, at 60 min, the alliin content decrease. Thus, in practice, an extraction time of 40 min would be suitable due to the observed combined effects of good alliin content.

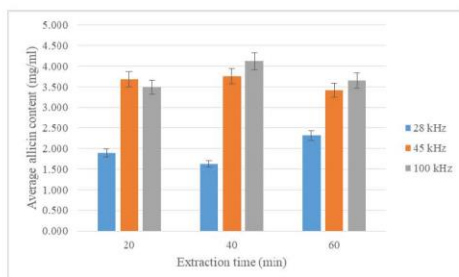


Fig. 3 Effect of extraction time on alliin content while different ultrasonic frequency.

IV. CONCLUSIONS

In the present study, various frequency and temperature significantly influenced the alliin content from garlic. Therefore, 45 kHz is a suitable extraction frequency. At 30°C exhibited the most efficient extraction while the ultrasonic frequency is 45 kHz could be used in terms of the combined effects of the alliin content. Furthermore, the ultrasonic frequency at 100 kHz and extraction time from 20 to 60 min exhibited a relatively high alliin content. As the extraction efficiency of alliin content depend largely on the combined effects of frequency, temperature and time, further investigation and optimization would be required. Since this present study focuses on ultrasonic assisted extraction of garlic (*Allium sativum* Linn.); three influencing factors in the aqueous extraction which frequency, temperature and time were investigated.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to Faculty of Engineering and Agro-Industry Maejo University, Chiang Mai, Thailand for providing insight and expertise that greatly assisted the research.

REFERENCES

- Casella, S., Leonardi, M., Melai, B., Fratini, F., & Pistelli, L. 2013. The role of diallyl sulfides and dipropyl sulfides in the in vitro antimicrobial activity of the essential oil of garlic, *Allium sativum* L., and leek, *Allium porrum* L. *Phytotherapy Research*, 27(3), 380-383.
- El-Hamidi, M., & El-Shami, S. M. 2015. Scavenging activity of different garlic extracts and garlic powder and their antioxidant effect on heated sunflower oil. *American Journal of Food Technology*, 10(4), 135-146.
- Kopec, A., Piatkowska, E., Leszczynska, T., & Sikora, E. 2013. Healthy properties of garlic. *Current Nutrition & Food Science*, 9(1), 59-64.
- Martins, N., Petropoulos, S., & Ferreira, I. C. 2016. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. *Food chemistry*, 211, 41-50.
- Zeng, Y., Li, Y., Yang, J., Pu, X., Du, J., Yang, X., & Yang, S. 2017. Therapeutic role of functional components in *Allium* for preventive chronic disease in human being. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.
- Lanzotti, V., Barile, E., Antignani, V., Bonanomi, G., & Scala, F. 2012. Antifungal saponins from bulbs of garlic, *Allium sativum* L. var. *Voghiera*. *Phytochemistry*, 78, 126-134.
- Lanzotti, V., Bonanomi, G., & Scala, F. 2013. What makes *Allium* species effective against pathogenic microbes?. *Phytochemistry reviews*, 12(4), 751-772.
- Marchese, A., Barbieri, R., Sanches-Silva, A., Daglia, M., Nabavi, S. F., Jafari, N. J., Nabavi, S. M. 2016. Antifungal and antibacterial activities of alliin: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 52, 49-56.
- Baghalian, K., Ziai, S. A., Naghavi, M. R., Badi, H. N., & Khalighi, A. 2005. Evaluation of alliin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes. *Scientia Horticulturae*, 103(2), 155-166.
- Eric Block. 2010. *Garlic and Other Alliums: The Lore and the Science*. RSC Publishing.
- Daljit S. Arora & Jasleen Kaur. 1999. Antimicrobial activity of spices. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12(3), 257-262.
- Serge Ancri & David Mirelman. 1999. Antimicrobial properties of alliin from garlic. *Microbes and Infection*, 1(2), 125-129.
- Deng, J., Xu, Z., Xiang, C., Liu, J., Zhou, L., Li, T., Yang, Z., & Ding, C. 2017. Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3, 328-334.
- Kimbaris, A. C., Statis, N. G., Daferera, D. J., Tarantilis, P. A., Pappas, C. S., & Polissiou, M. G. 2006. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrasonics sonochemistry*, 13(1), 54-60.
- Chemat, F. & Khan, M. K. 2011. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(4), 813-835.
- Picó, Y. 2012. *Chemical analysis of food: Techniques and applications*. Academic Press.
- Lawson, L. D. & Gardner, C. D. 2005. Composition, stability, and bioavailability of garlic products used in a clinical trial. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(16), 6254-6261.
- Wang, L., & Weller, C. L. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.
- Olech, Z., & Zaborska, W. 2012. A spectrophotometric assay for total garlic thiosulfonates content. Kinetic aspects of reaction with chromogenic thiols. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 62(1), 23-29.
- Miron, T., Shin, I., Feigenblat, G., Weiner, L., Mirelman, D., Wilchek, M., & Rabinov, A. 2002. A spectrophotometric assay for alliin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of

Proceedings of the 10th International Conference on Sciences, Technology and Innovation for Sustainable Well-Being (STISWB 2018)
Vientiane, Lao PDR, July 11th -13th, 2018



4-mercaptopyridine with thiosulfates. **Analytical biochemistry**,
307(1), 76-83.

- [21] Wang, H., Li, X., Liu, X., Shen, D., Qiu, Y., Zhang, X. & Song, J.
2015. Influence of pH, concentration and light on stability of allicin in
garlic (*Allium sativum* L.) aqueous extract as measured by UPLC.
Journal of the Science of Food and Agriculture, 95(9), 1838-1844.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	สุพิชญ์ชญา กลั่นทะกะสุวรรณ
เกิดเมื่อ	21 พฤศจิกายน 2535
ประวัติการศึกษา	2558 ปริญญาตรี วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมอาหาร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 2554 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนวาริชียงใหม่อินเตอร์เนชั่นแนล (VCIS)
ประวัติการทำงาน	-

