การใช้สารสกัดจากเมล็ดหว้า *Syzygium cumini* (L.) Skeels ในการควบคุมจำนวนแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในสะระแหน่ *Metha cordifolia* Opiz.

นางสาวอรวรรณ ศิริเวทย์วุฒิ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

APPLICATION OF JAMBOLAN *Syzygium cumini* (L.) Skeels SEED EXTRACTS FOR CONTROLLING SOME PATHOGENIC BACTERIA IN MINT *Metha cordifolia* Opiz.

Miss Orawan Siriwetwut

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology
Department of Food Technology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2015
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้สารสกัดจากเมล็ดหว้า *Syzygium cumini* (L.) Skeels ในการควบคุมจำนวนแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในสะระแหน่ *Metha cordifolia* Opiz.
โดย	นางสาวอรวรรณ ศิริเวทย์วุฒิ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ศิริมา พ่วงประพันธ์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ธีรวัลย์ ชาญฤทธิเสน)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

อรวรรณ ศิริเวทย์วุฒิ : การใช้สารสกัดจากเมล็ดหว้า *Syzygium cumini* (L.) Skeels ในการควบคุมจำนวนแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในสะระแหน่ *Metha cordifolia* Opiz. (APPLICATION OF JAMBOLAN *Syzygium cumini* (L.) Skeels SEED EXTRACTS FOR CONTROLLING SOME PATHOGENIC BACTERIA IN MINT *Metha cordifolia* Opiz.) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. สุเมธ ตันตระเธียร, หน้า.

งานวิจัยนี้ศึกษาอิทธิพลของวิธีการสกัดต่อความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากเมล็ดหว้า เพื่อนำมาใช้ร่วมกับกรดอินทรีย์ในการลดและควบคุมจำนวนแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในสะระแหน่ และศึกษาอายุการเก็บของสารสกัด จากการใช้ตัวทำละลายเอทานอล 50% ในการสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด (MAE) การสกัดโดยใช้คลื่นอัตราโซนิคช่วยในการสกัด (UAE) การสกัดด้วยการแช่ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (HT) และที่อุณหภูมิห้อง (RT) พบว่าสารสกัดหยาบจากการสกัดด้วยวิธี MAE ให้ปริมาณสารสกัดหยาบแห้ง รวมทั้งความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงสุด เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (*Salmonella* Typhimurium และ *Escherichia coli*) และแกรมบวก (*Staphylococcus aureus*) พบว่าสารสกัดจากทุกวิธีการสกัดมีความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรีย (MIC) เท่ากับ 3.13 mg/ml และมีความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) เท่ากับ 6.25 mg/ml เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียแกรมลบ สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกพบว่าไวต่อสารสกัดจาก MAE และ UAE ดังนั้นจึงใช้คลื่นไมโครเวฟในการสกัดเพื่อศึกษาขั้นต่อไป พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 0.5 เท่าของ MBC ร่วมกับความเข้มข้นของกรดแอซีติก 0.5 เท่าของ MBC สามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้สารสกัดร่วมกับกรดแอซีกมาใช้เป็นสารล้างเพื่อลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียในสะระแหน่ โดยพบว่าการแช่สารสกัดหยาบความเข้มข้น 0.5 เท่าของ MBC ร่วมกับกรดแอซีติกความเข้มข้น 0.5 เท่าของ MBC เป็นเวลา 10 นาที สามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้ดีที่สุด แต่มีการช้ำเกิดขึ้น จึงลดความเข้มข้นของกรดแอซีติกเท่ากับ 0.25 เท่าของ MBC และเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเท่ากับ 0.75 เท่าของ MBC ทำให้ไม่พบการช้ำ และมีจำนวนแบคทีเรียไม่ต่างจากการแช่ด้วยสารสกัดหยาบความเข้มข้น 0.5 เท่าของ MBC ร่วมกับกรดแอซีติกความเข้มข้น 0.5 เท่าของ MBC การใช้ความเข้มข้นนี้สามารถเก็บรักษาสะระแหน่ได้เป็นระยะเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส โดยปริมาณของ *E. coli* ยังไม่เกินเกณฑ์ของกรมวิชาการเกษตรสำหรับผักส่งออก สารสกัดหยาบที่ใช้สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) ได้เป็นระยะเวลา 3 เดือน ก่อนฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดลดลง แต่สามารถเก็บได้นานขึ้นเมื่อเพิ่มกรดแอซีติกในสารสกัดหยาบ อย่างไรก็ตามการเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิต่ำ (4±2 องศาเซลเซียส) สามารถเก็บได้นานที่สุด (7 เดือน)

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2558

5472253023 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY
KEYWORDS: JAMBOLAN SEED / PHENOLIC CONTENT / FLAVONOID CONTENT / EXTRACTION METHOD / ORGANIC ACID / ANTIMICROBIAL ACTIVITY / MINT

ORAWAN SIRIWETWUT: APPLICATION OF JAMBOLAN *Syzygium cumini* (L.) Skeels SEED EXTRACTS FOR CONTROLLING SOME PATHOGENIC BACTERIA IN MINT *Metha cordifolia* Opiz.. ADVISOR: ASSOC. PROF. SUMATE TANTRATIAN, Ph.D., pp.

This research was aimed to study effect of extraction on phenolic and flavonoid concentration from Jambolan seeds in order to combine them with organic acids to reduce, control some pathogenic bacteria in fresh mint and study storage time of extracts. The 50% (v/v) ethanol was used as solvent for extraction with microwave-assisted extraction (MAE), ultrasonic-assisted extraction (UAE), shaking at 80°C (HT) and at room temperature (RT). The crude extract from MAE gave highest yield, total phenolic and total flavonoid concentration (TPC and TFC) among all extracts. The antimicrobial activity of crude extracts were tested both gram negative (*Salmonella* Typhimurium *and Escherichia coli*) and gram positive (*Staphylococcus aureus*). The result shows that all extracts gave MIC 3.13 mg/ml and MBC 6.25 mg/ml on gram negative bacteria. For gram positive bacteria sensitive with extracts from MAE and UAE, Therefore, extracts from microwave assisted were used for further study. It was found that 0.50 MBC of crude extracts combined with 0.50 MBC of acetic acid demonstrated additive effect on inhibition of bacteria. Consequently, acetic acid combine with crude extract were chosen as washing agent to control bacteria in fresh mint. Soaking fresh mint with 0.50 MBC of crude extracts mixed with 0.50 MBC of acetic acid for 10 minutes gave the highest bacterial reduction, but it found that leaves showed burning effect. Thus combination of acetic acid 0.25 MBC and crude extracts 0.75 MBC gave bacterial reduction with no difference from 0.50 MBC of crude extracts mixed with 0.50 MBC of acetic acid without burning effect. The treated fresh mint was able to be kept for 6 days at 4±2 °C and still had the number of *E. coli* under the Ministry of Agriculture regulation for export produce. The crude extract was kept at room temperature (25-30 °C) for 3 months before antimicrobial activity of crude decreased, but it had longer storage time when addition with acetic acid (5 months). However, crude extract were stored at lower temperature (4 ± 2 ° C) can be kept for 7 months.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Department: Food Technology Student's Signature .....
Field of Study: Food Technology Advisor's Signature .....
Academic Year: 2015

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร อาจารย์ที่ปรึกษา ที่คอยให้คำปรึกษา แนะนำ สนับสนุน ตลอดจนเอาใจใส่และให้ความช่วยเหลือ รวมถึงช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์รวมถึง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก อาจารย์ ดร.ศิริมา พ่วงประพันธ์ คณะกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ธีรวัลย์ ชาญฤทธิเสน กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก เป็นอย่างสูงที่ได้ให้คำแนะนำ ชี้แนะข้อบกพร่อง ตลอดจนเสียสละเวลาอันมีค่าตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณการสนับสนุนทุนวิจัยจาก “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จังหวัดลำปางที่เอื้อเฟื้อสนับสนุนวัตถุดิบเมล็ดหว้าในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำการใช้เครื่องมือในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความร่วมมือ และความช่วยเหลือต่างๆ เมื่อมีปัญหาและอุปสรรคเกิดขึ้น ตลอดระยะเวลาการศึกษาและการทำงานวิจัย

ท้ายสุดผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกทุกคนในครอบครัว รวมทั้งญาติผู้ใหญ่ทุกท่าน ที่คอยอบรมสั่งสอน เลี้ยงดู และสนับสนุน รวมทั้งกำลังใจและความห่วงใยจากคนรอบข้าง ทำให้มีแรงผลักดันจนวันนี้ได้บรรลุผลสำเร็จดังที่หวังไว้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญภาพ ..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย 2

1.3 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย 2

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์ 3

2.1 หว้า (Jambolan) 3

2.2 สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) 4

2.2.1 การแบ่งกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก 4

2.2.2 การสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิก 10

2.3 การสกัดสารประกอบฟีนอลิก (phenolic extraction) 10

2.3.1 การเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารประกอบฟีนอลิก 12

2.3.1.2 การสกัดด้วยคลื่นอัตราโซนิค (ultrasonic-assisted extraction, UAE) 12

2.3.1.3 การใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด (microwave-assisted extraction, MAE) 14

2.4 กรดอินทรีย์ (organic acid) 17

2.4.1 กรดแอซีติก (acetic acid) 17

2.4.2 กรดแลกติก (lactic acid) 18

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

2.4.3 การใช้กรดอินทรีย์ในการยับยั้งเชื้อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 19
2.6 สะระแหน่ (mint) 19
2.6.1 ลักษณะทั่วไปของสะระแหน่ 19
2.6.2 ปัญหาของผักส่งออก 20
2.6.3 การล้างผัก 21
2.6.3.1 การใช้สารสกัดจากพืชในการล้างผัก 22
2.3.6.2 การใช้กรดอินทรีย์ในการล้างผัก 22
2.3.6.3 การใช้สารสกัดจากพืชร่วมกับกรดอินทรีย์ในการล้างผัก 22
2.7 แบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) 23
2.7.1 เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*: *E.coli*) 23
2.7.2 ซัลโมเนลลา (*Salmonella* Typhimurium: *S*. Typhimurium) 24
2.7.3 แสตปฟิลโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*: *S. aureus*) 25
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 25
บทที่3 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 27
3.1 วัตถุดิบ จุลินทรีย์ วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี 27
3.1.1 วัตถุดิบ 27
3.1.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ 27
3.1.3 วัสดุและอุปกรณ์ 27
3.1.4 เครื่องมือ 28
3.1.5 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ 29
3.2 ขั้นตอนการวิจัย 29
3.2.1 เตรียมตัวอย่าง 29
3.2.2 การสกัดเมล็ดหว้า 30

หน้า

3.2.2.1 การสกัดสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากเมล็ดหว้าด้วยวิธีต่างๆ 30
3.2.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 31
3.2.3.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content; TPC)..... 31
3.2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid content; TFC)..... 31
3.2.3.3 ปริมาณสารสกัดแห้ง..... 31
3.2.3.4 การตรวจวิเคราะห์ HPLC (High-performance liquid chromatography) 32
3.2.4 การตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย..... 32
3.2.4.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย 32
3.2.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ด้วยวิธีดีสก์ ดิฟฟิวชัน (disc diffusion method; DDM)..... 32
3.2.4.3 การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากเมล็ดหว้าที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ หรือค่า MIC (minimum inhibitory concentration) 33
3.2.4.4 ทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ หรือค่า MBC (minimum bactericidal concentration)..... 34
3.2.5 การทดสอบสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติกและกรดแลกติกในการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย..... 35
3.2.5.1 ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด (MBC) ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้ากรดแอซีติก และ กรดแลกติก 35
3.2.5.2 การลดจำนวนแบคทีเรียด้วยสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า กรดแอซีติก กรดแลกติก สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติก และสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับ กรดแลกติก 35

3.2.6 การใช้สารสกัดหยาบจากเมล็ดหว้า กรดอินทรีย์ และสารสกัดหยาบร่วมกับกรดอินทรีย์เพื่อลดจำนวนของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด และ แบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในสะระแหน่ 36

3.2.7 อายุการเก็บของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีแตกต่างกัน 37

3.2.8 อายุการเก็บของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า และสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติก 38

บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 41

4.1. ความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ 41

4.2 การเพิ่มประสิทธิภาพในการลดจำนวนแบคทีเรียด้วยสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติกหรือกรดแลกติก 50

4.3 การใช้สารสกัดหยาบจากเมล็ดหว้า กรดแอซีติก และสารสกัดร่วมกับกรดแอซีติกในการแช่สะระแหน่เพื่อลดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย 56

4.4 ศึกษาอายุการเก็บรักษาของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า และสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติก 65

4.5 ศึกษาอายุการเก็บรักษาของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ 68

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 72

5.1 สรุปผลการทดลอง 72

5.2 ข้อเสนอแนะ 72

รายการอ้างอิง 74

ภาคผนวก 81

ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีและวิธีวิเคราะห์ 82

ภาคผนวก ข การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 85

ภาคผนวก ค สารเคมี 86

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 87

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของเมล็ดหว้า 4

ตารางที่ 2.2 การใช้จำนวนคาร์บอนอะตอมในโครงสร้างเป็นเกณฑ์ในการแบ่งกลุ่มฟีนอลิก 5

ตารางที่ 2.3 ค่า dielectric constant และค่า loss tangent ของตัวทำละลายบางชนิด 15

ตารางที่ 2.4 สถิติการแจ้งเตือนปัญหาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในสะระแหน่ระหว่างปี 2551 – 2553 21

ตารางที่ 3.1 การให้ความร้อนเป็นรอบเวลา (cycle) ในการใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด 30

ตารางที่ 3.2 ความเข้มข้นของสารในหลอดทดลองเพื่อหาค่า MIC 34

ตารางที่ 3.3 แสดงจำนวนสิ่งทดลองของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าและกรดแอซีติกแบบ mixture design 36

ตารางที่ 4.1 อิทธิพลของวิธีการสกัดต่อปริมาณสารสกัดแห้ง (%) ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า 41

ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแกลลิก กรดเฟอรูริก กรดคลอโรจินิก และเควอซิทิน ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ด้วยเครื่อง HPLC 45

ตารางที่ 4.3 ฤทธิต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (100 mg/ml) ที่ตรวจวัดด้วยวิธี disc difusion method (DDM) 49

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย (MIC, mg/ml) ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ 49

ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC, mg/ml) ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ 50

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า กรดแอซีติก และกรดแลกติก 51

ตารางที่ 4.7 ความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย MBC ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า กรดแอซีติกและกรดแลกติก 51

ตารางที่ 4.8 ค่า pH ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) กรดแอซีติก (A) กรดแลกติก (L) สารสกัดหยาบร่วมกับกรดแอซีติก (EA) และ สารสกัดหยาบร่วมกับกรดแลกติก (EL) 54

ตารางที่ 4.9 ค่า pH ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) กรดแอซีติก (A) สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติกความเข้มข้น (EA1, EA2 และ EA3) 58

ตารางที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงค่า MIC และ MBC ระหว่างการเก็บรักษาของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) และสกัดหยาบจากเมล็ดหว้าผสมกรดแอซีติก (EA) ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S.* Typhimurium ที่อุณภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 5 เดือน..... 67

ตารางที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงค่า MIC และ MBC ระหว่างการเก็บรักษาของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) สกัดหยาบจากเมล็ดหว้าผสมกรดแอซีติก (AE) ต่อเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่อุณภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 5 เดือน..... 67

ตารางที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงค่า MIC และ MBC ระหว่างการเก็บรักษาของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) สกัดหยาบจากเมล็ดหว้าผสมกรดแอซีติก (EA) ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่อุณภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 5 เดือน..... 68

ตารางที่ 4.13 การเปลี่ยนแปลงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S.* Typhimurium ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 เดือน..... 71

ตารางที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ต่อเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 เดือน..... 71

ตารางที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 เดือน..... 71

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญภาพ

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอลิก 5

ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของกรดฟีนอลิกบางชนิด 6

ภาพที่ 2.3 โครงสร้างฟลาโวนอยด์ 7

ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของสารประกอบฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ 8

ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของแทนนินบางชนิด 9

ภาพที่ 2.6 การสกัดสารจากเซลล์พืช 11

ภาพที่ 2.7 การเกิดฟองก๊าซเนื่องจากคลื่นอัลตราโซนิค 12

ภาพที่ 2.8 การเกิดฟองก๊าซและการการแตกตัวของก๊าซอากาศในของเหลวเมื่อได้รับคลื่นอัตราโซนิค 13

ภาพที่ 2.9 ทรานส์ดิวเซอร์บริเวณฐานอ่างอัตราโซนิค 14

ภาพที่ 2.10 ความร้อนที่เกิดขึ้นด้วยวิธีการสกัดแบบเดิมและความร้อนที่เกิดขึ้นจากการใช้ไมโครเวฟช่วยในการสกัด 15

ภาพที่ 2.11 การเคลื่อนที่ของอิออน (ionic polarization) และ การหมุนของสารประกอบที่มีขั้ว (dipole rotation) เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้า 16

ภาพที่ 2.12 โครงสร้างของกรดแอซีติก 18

ภาพที่ 2.13 โครงสร้างของกรดแลกติก 18

ภาพที่ 2.14 โครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (ก) และ แบคทีเรียแกรมบวก (ข) 23

ภาพที่ 3.1 ผงเมล็ดหว้า 30

ภาพที่ 3.2 ระดับการซ้ำของใบสะระแหน่ (ก) ระดับที่ 0 (ข) ระดับที่1 (ค) ระดับที่ 2 (ง) ระดับที่ 3 37

ภาพที่ 3.3 แผนผังแสดงสรุปการสกัดเมล็ดหว้าด้วยวิธีต่างๆ 39

ภาพที่ 3.4 แผนผังแสดงสรุปการแช่สะระแหน่ด้วยสารต่างๆ 40

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 4.1 อิทธิพลของวิธีการสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด (MAE) การใช้คลื่นอัตราโซนิคช่วยในการสกัด (UAE) การสกัดด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (RT) และที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (HT) ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC)..... 43

ภาพที่ 4.2 อิทธิพลของวิธีการสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด (MAE) การใช้คลื่นอัตราโซนิคช่วยในการสกัด (UAE) การสกัดด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (RT) และที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (HT) ต่อปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC)..... 43

ภาพที่ 4.3 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่ใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด (MAE)..... 45

ภาพที่ 4.4 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่ใช้คลื่นอัตราโซนิคช่วยในการสกัด (UAE)..... 46

ภาพที่ 4.5 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (RT)..... 46

ภาพที่ 4.6 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (HT)..... 47

ภาพที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรีย *S.* Typhimurium ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่มีสารสกัดหยาบ (E) กรดแอซีติก (A) กรดแลกติก (L) สารสกัดหยาบร่วมกับกรดแอซีติก (EA) และสารสกัดหยาบร่วมกับกรดแลกติก (EL) ระหว่างการบ่ม 9 ชั่วโมง..... 54

ภาพที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรีย *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่มีสารสกัดหยาบ (E) กรดแอซีติก (A) กรดแลกติก (L) สารสกัดหยาบร่วมกับกรดแอซีติก (EL) และสารสกัดหยาบร่วมกับกรดแลกติก (EL) ระหว่างการบ่ม 9 ชั่วโมง..... 55

ภาพที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรีย *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่มีสารสกัดหยาบ (E) กรดแอซีติก (A) กรดแลกติก (L) สารสกัดหยาบร่วมกับกรดแอซีติก(EA) และสารสกัดหยาบร่วมกับกรดแลกติก (EL) ระหว่างการบ่ม 9 ชั่วโมง..... 55

ภาพที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (TPC) ในสะระแหน่ หลังแช่ด้วยสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) กรดแอซีติก (A) สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติก (EA1 EA2 และ EA3) และระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน..... 58

ภาพที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในสะระแหน่ หลังแช่ด้วยสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) กรดแอซีติก (A) สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติก

(EA1 EA2 และ EA3) และระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน 59

ภาพที่ 4.12 ค่าการชำของสะระแหน่หลังแช่สารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) กรดแอซีติก (A) สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติก (EA1 EA2 และ EA3) และระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วันด้วย 60

ภาพที่ 4.13 การชำของสะระแหน่หลังจากแช่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (DI) เป็นเวลา 10 นาที 61

ภาพที่ 4.14 การชำของสะระแหน่หลังจากแช่ด้วยสารสกัดความเข้มข้น 1 MBC (E) เป็นเวลา 10 นาที 61

ภาพที่ 4.15 การชำของสะระแหน่หลังจากแช่ด้วยกรดแอซีติกความเข้มข้น 1 MBC (A) เป็นเวลา 10 นาที 61

ภาพที่ 4.16 การชำของสะระแหน่หลังจากแช่ด้วยสารสกัดความเข้มข้น 0.5 MBC ร่วมกับกรดแอซีติกความเข้มข้น 0.5 MBC (EA1) เป็นเวลา 10 นาที 62

ภาพที่ 4.17 การชำของสะระแหน่หลังจากแช่ด้วยสารสกัดความเข้มข้น 0.75 MBC ร่วมกับกรดแอซีติกความเข้มข้น 0.25 MBC (EA1) เป็นเวลา 10 นาที 62

ภาพที่ 4.18 การชำของสะระแหน่หลังจากแช่ด้วยสารสกัดความเข้มข้น 0.875 MBC ร่วมกับกรดแอซีติกความเข้มข้น 0.125 MBC (EA1) เป็นเวลา 10 นาที 62

ภาพที่ 4.19 การชำของสะระแหน่ที่แช่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (DI) ในวันที่12 63

ภาพที่ 4.20 การชำของสะระแหน่ที่แช่ด้วยสารสกัดความเข้มข้น 1 MBC (E) ในวันที่12 63

ภาพที่ 4.21 การชำของสะระแหน่ที่แช่ด้วยกรดแอซีติกความเข้มข้น 1 MBC (A) ในวันที่12 63

ภาพที่ 4.22 การชำของสะระแหน่ที่แช่ด้วยสารสกัดความเข้มข้น 0.5 MBC ร่วมกับกรดแอซีติกความเข้มข้น 0.5 MBC (EA1) ในวันที่12 64

ภาพที่ 4.23 การชำของสะระแหน่ที่แช่ด้วยสารสกัดความเข้มข้น 0.75 MBC ร่วมกับกรดแอซีติกความเข้มข้น 0.25 MBC (EA1) ในวันที่12 64

ภาพที่ 4.24 การชำของสะระแหน่ที่แช่ด้วยสารสกัดความเข้มข้น 0.875 MBC ร่วมกับกรดแอซีติกความเข้มข้น 0.125 MBC (EA1) ในวันที่12 64

ภาพที่ 4.25 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) และสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าผสมกับกรดแอซีติก (EA) ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 5 เดือน 66

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาพที่ 4.26 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นสารประกอบฟลาโวนอยด์ (TFC) ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) และ สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าผสมกับกรดแอซีติก (EA) ระหว่างการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 5 เดือน 67

ภาพที่ 4.27 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิก (TPC) ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 เดือน 69

ภาพที่ 4.28 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (TFC) ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 เดือน 70

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

หว้า เป็นไม้ยืนต้น มีถิ่นกำเนิดจากประเทศอินเดีย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Syzygium cumini* (L.) Skeels และมีชื่อเรียกสามัญ ได้แก่ jambolan plum และ java plum เป็นต้น ในประเทศไทยพบได้ทั่วไปตามป่าดิบชื้นและป่าผลัดใบ ส่วนของผลหว้ามีรสชาติเปรี้ยวอมหวานและรสฝาดเล็กน้อยนิยมนำมาบริโภคสด หลังจากการบริโภคจะเหลือส่วนของเมล็ดมักไม่ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ แต่เมล็ดหว้ามีสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ (Bigoniya และคณะ, 2012) ซึ่งมีสมบัติสำคัญคือ สมบัติต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ เช่น *Escherichia coli, Salmonella* Typhimurium และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น (Banerjee และ Narendhirakannan, 2011) ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เพื่อใช้ประโยชน์ดังกล่าวสามารถทำได้หลายวิธี งานวิจัยนี้จึงเปรียบเทียบวิธีสกัดที่คาดว่าเหมาะสมต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากเมล็ดหว้า ได้แก่ การใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด การใช้คลื่นอัตราโซนิคช่วยในการสกัด การสกัดด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบจากเมล็ดหว้าที่ได้ มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ในระดับหนึ่ง จึงสนใจศึกษาการใช้สารสกัดหยาบจากเมล็ดหว้าร่วมกับกรดอินทรีย์ได้แก่ กรดแอซีติก หรือกรดแลกติก (Barros และคณะ, 2009) ซึ่งมีการรายงานว่าสามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียได้ดีและเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติเช่นกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด นอกจากนั้นในปัจจุบันผู้บริโภคมีความสนใจด้านสุขภาพจึงนิยมบริโภคผักสดซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการมากขึ้น แต่ผักสดเหล่านี้มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ จึงมีการใช้สารประกอบคลอรีน (chlorine compound) ลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อน แต่สารประกอบคลอรีนอาจมีการตกค้างทำให้เป็นพิษต่อผู้บริโภค โดยเกิดสารข้างเคียงที่เป็นอันตรายคือคลอรามีนและไตรฮาโลมีเธนซึ่งจัดเป็นสารก่อมะเร็ง (มัลลิกา ปัญญาคะโป และ ผ่องศรี เผ่าภูรี, 2550) นอกจากนั้นผู้บริโภคในปัจจุบันมีการหลีกเลี่ยงอาหารที่ผ่านการเติมสารเคมีหรือสารกันเสีย จึงสนใจอาหารที่มีการใช้สารจากธรรมชาติซึ่งมีความปลอดภัยกว่ามาใช้แทนสารเคมี ในงานวิจัยนี้จึงนำสารสกัดหยาบจากเมล็ดหว้า และสารสกัดหยาบมาใช้ร่วมกับกรดอินทรีย์เพื่อลดและควบคุมจำนวนแบคทีเรียก่อโรคในผักสดโดยนำมาประยุกต์ใช้กับสะระแหน่ซึ่งเป็นผักบริโภคสด และเป็นผักส่งออกที่มีการตรวจพบจำนวนเชื้อแบคทีเรียเกินมาตรฐานทำให้ประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรประงับการนำเข้าสะระแหน่จากประเทศไทย

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาการสกัดสารประกอบและฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากเมล็ดหว้าด้วยวิธีต่างๆ เพื่อนำมาใช้ในการยับยั้งเชื้อ *S.* Typhimurium, *E. coli* และ *S. aureus*

1.2.2 ศึกษาการใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดอินทรีย์บางชนิด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium, *E. coli* และ *S. aureus*

1.2.3 ศึกษาการใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดอินทรีย์ในการลดและควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในสะระแหน่

1.2.4 ศึกษาอายุการเก็บของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส และศึกษาอายุการเก็บของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า, กรดอินทรีย์ และสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดอินทรีย์ ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

1.3 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

1.2.1 ได้วิธีที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากเมล็ดหว้าเพื่อนำมาใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S.* Typhimurium, *E. coli* และ *S. aureus*

1.2.2 ได้กรดอินทรีย์ที่เหมาะสมในการใช้ร่วมกับสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *S.* Typhimurium, *E. coli* และ *S. aureus*

1.2.3 สามารถนำสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่ได้มาใช้ร่วมกับกรดอินทรีย์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการลดและควบคุมจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด และ เชื้อ *E. coli* ในสะระแหน่

1.2.4 ทราบอายุการเก็บของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส และอายุการเก็บของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า กรดอินทรีย์ และสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดอินทรีย์ ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 หว้า (Jambolan)

หว้า เป็นชื่อเรียกไม้ยืนต้นชนิดหนึ่งในประเทศไทย ซึ่งมีชื่อสามัญที่รู้จักกันโดยทั่วไปในประเทศต่างๆ ได้แก่ jamun หรือ black plum และอื่นๆ อีกได้แก่ java plum, jambul และ indian blackberry เป็นต้น โดยมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Syzygium cumini* (L.) Skeels เป็นพืชที่อยู่ในตระกูล Myrtaceae ซึ่งมีถิ่นกำเนิดมาจากอินเดีย (Modi และคณะ, 2010)

ในประเทศไทยสามารถพบหว้าได้ทั่วไปตามป่าดิบชื้นและป่าผลัดใบ ลักษณะของต้นเป็นทรงพุ่มครึ่งวงกลม ใบหว้าเป็นรูปรี สีค่อนข้างแดงในช่วงผลิใบ แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม ในประเทศไทยเริ่มออกดอกในช่วงเดือนธันวาคม – มกราคม ต่อมาในเดือนกุมภาพันธ์ - มีนาคม ดอกจะเริ่มร่วง มีผลสีเขียวขนาดเล็กเกิดขึ้นและพัฒนาต่อจนเป็นผลที่เจริญเต็มที่ในช่วงเดือนเมษายน-พฤษภาคม โดยฤดูกาลที่ออกผลจะแตกต่างกันไปตามแต่ละภูมิประเทศ เมื่อผลสุกจะเกิดการสลายคลอโรฟิลล์และสร้างสารกลุ่มแอนโธไซยานิน สีจะเริ่มเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวไปเป็นสีแดงอ่อน ม่วงแดง และ สีม่วงดำจนถึงดำเมื่อสุก (นิตยา เขียวอ่อน, 2550) ลักษณะผลหว้าที่เจริญเติบโตเต็มที่จะมีน้ำเป็นองค์ประกอบมาก เปลือกบางและเงา เนื้อผลสีขาวใส มีเส้นสีม่วงแทรกเป็นร่างแหอยู่ในส่วนเนื้อผล ลักษณะผลเป็นทรงรี หรือ ทรงกลม มีขนาดแตกต่างขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์หว้า ในช่วงตั้งแต่เริ่มเกิดผลจนผลของหว้ามีการเจริญเติบโตเต็มที่ จะมีการเปลี่ยนแปลงด้านกายภาพ เช่น ขนาดใหญ่ขึ้น เป็นต้น และมีการเปลี่ยนทางเคมี ได้แก่ การสร้างสารเมตาโบไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) และการสร้างสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) เช่น กรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ เป็นต้น (วิทยา ทรัพย์เย็น, 2550) ด้วยรสชาติเปรี้ยวอมหวาน และฝาดเล็กน้อยของผลหว้า จึงเป็นส่วนที่นิยมนำมาบริโภค ทำให้เหลือเมล็ดซึ่งไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์ แต่เมล็ดหว้ามีสารประกอบฟีนอลิกซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ต่างๆ ได้ เช่น ลดน้ำตาลในเลือด ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น โดยสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากในเมล็ดหว้า ได้แก่ กรดแกลลิก นอกจากนั้นยังพบ เควอซิทิน กรดคลอโรจินิก และ กรดเฟอรูลิก เป็นต้น (Kothari และคณะ, 2011; Shah และคณะ, 2012) นอกจากนั้นเมล็ดหว้ายังมีองค์ประกอบอื่นๆ อีกได้แก่ แป้ง โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และเถ้า (Modi และคณะ, 2010) แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของเมล็ดหว้า (Haldankar และคณะ, 2012)

องค์ประกอบ	เมล็ดหว้า
Starch (%)	41
Crude protein (%DW)	6.3 – 8.5
Crude fat (%DW)	1.18
Crude fiber (%DW)	16.9
Ash (%DW)	21.72

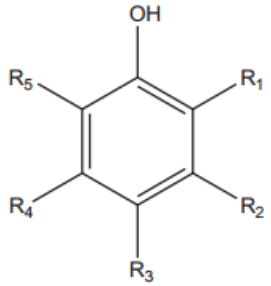
DW = Dry weight

2.2 สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

ในระหว่างที่พืชเจริญเติบโตจะมีการสร้างสารต่างๆ ได้แก่ สารเมตาโบไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) เป็นสารที่พืชได้จากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต นิวคลีโอไทด์ และ กรดอะมิโน เป็นต้น นอกจากนั้นสารที่ได้จากเมตาโบไลต์ปฐมภูมิ สามารถเปลี่ยนเป็นสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก เป็นต้น (Ahmad และคณะ, 2012) ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่พบอาจแตกต่างกันขึ้นกับส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ผล ใบ เมล็ด ลำต้น และ ราก เป็นต้น รวมถึงวงศ์และสกุลของพืช นอกจากนั้นยังขึ้นอยู่ปัจจัยภายนอก เช่น แสง อุณหภูมิ และการเกิดบาดแผลของพืช พืชสร้างสารประกอบฟีนอลิกเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆ เช่น การขยายพันธุ์และการป้องกันอันตราย เป็นต้น (วิทยา ทรัพย์เย็น, 2550) อย่างไรก็ตามสารประกอบฟีนอลิกที่พืชสร้างมีคุณสมบัติในต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ จึงนิยมสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากพืชมาใช้ประโยชน์ดังกล่าว

2.2.1 การแบ่งกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกมีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติกเกาะอยู่กับหมู่ไฮดรอกซิลตั้งแต่ 1 หมู่ขึ้นไป ดังภาพที่ 2.1 และอาจมีการแทนที่หมู่อื่นที่ตำแหน่ง R_1-R_5 หรืออาจมีวงอะโรมาติกหลายวงเกาะอยู่กับหมู่ไฮดรอกซิล ทำให้มีโครงสร้างที่หลากหลาย การสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลลิกของพืชเกิดจากเอนโดพลาสมิคเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) และเก็บอยู่ตามส่วนต่างๆ ในเซลล์ ส่วนใหญ่พบในแวคิวโอ (vacuole) มักเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่ละลายน้ำได้ เช่น กรดฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ เป็นต้น ส่วนสารประกอบฟีนอลิกที่ไม่สามารถละลายน้ำได้พบได้ในได้ในผนังเซลล์ของพืช มักมีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ ทำหน้าที่ช่วยเสริมความแข็งแรงให้กับพืช เช่น ลิกนิน เป็นต้น (Khoddami และคณะ, 2013; วิทยา ทรัพย์เย็น, 2550)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอลิก (นิตยา เขียวอ่อน, 2550)

เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติมีหลายชนิด จึงมีการแบ่งออกเป็นกลุ่ม โดยใช้จำนวนคาร์บอนอะตอมในโครงสร้างเป็นเกณฑ์ในการแบ่ง (Srivastava, 2006) ดังตารางที่ 2.2 แต่สารประกอบฟีนอลิกที่พบมากในพืชและมีการนำมาใช้ในการต้านการเจริญเชื้อแบคทีเรียมี 3 กลุ่ม (Dai และ Mumper, 2010) ดังนี้

ตารางที่ 2.2 การใช้จำนวนคาร์บอนอะตอมในโครงสร้างเป็นเกณฑ์ในการแบ่งกลุ่มฟีนอลิก (Srivastava, 2006)

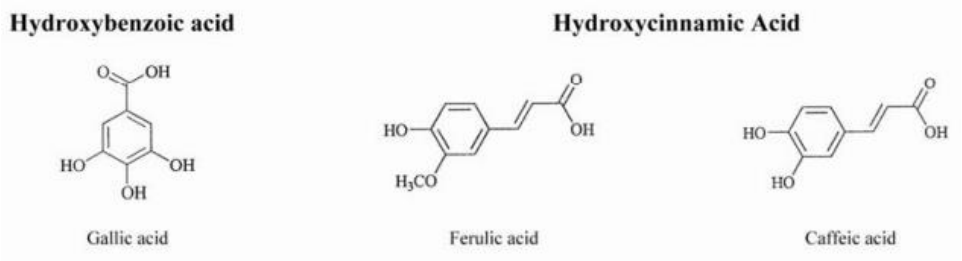
จำนวนคาร์บอนอะตอม	โครงสร้างหลัก	กลุ่ม
6	C6	simple phenolics, benzoquinones
7	C6-C1	phenolic acids
8	C6-C2	acetophenone, phenylacetic acid hydroxycinnamic acid
9	C6-C3	polypropene, coumarin, isocoumarin
10	C6-C4	naphtoquinine
13	C6-C1-C6	xanthone
14	C6-C2-C6	stilbene, anthrachinone
15	C6-C3-C6	flavonoids, isoflavonoids
18	$(C6\text{-}C3)_2$	lignans, neolignans
30	$(C6\text{-}C3\text{-}C6)_2$	biflavonoids

2.2.1.1 กรดฟีนอลิก (Phenolic acids)

กรดฟีนอลิกเป็นกลุ่มหลักของสารประกอบฟีนอลิกที่พืชสร้าง มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ สามารถพัฒนาเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ขึ้น กรดฟีนอลิกแต่ละชนิดมีหมู่ฟังก์ชันที่แตกต่างกัน และมีชื่อเรียกต่างกัน ดังภาพที่ 2.3 กรดฟีนอลิกสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

- กลุ่มกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกและอนุพันธุ์ มีโครงสร้าง C6–C1 ประกอบด้วยฟีนอลและหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) เช่น กรดแกลลิก (gallic acid) ซึ่งเป็นสารตั้งต้น gallotannins หรือ ellagitannins (นิตยา เขียวอ่อน, 2550)

- กลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิกและอนุพันธ์ มีโครงสร้าง C6-C3 อาจเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) และ เมทิเลชัน (methylation) ทำให้มีความหลากหลาย เช่น การเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิล โดยการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ในโครงสร้างของกรดพาราคูมาริก ได้เป็นกรดคาเฟอิก (caffeic acid) หรือการเกิดปฏิกิริยาเมทิลเลชัน โดยการเติมหมู่เมทิล ($-CH_3$) เข้าไปในโครงสร้างของกรดคาเฟอิก (cafeic acid) เป็นกรดเฟอรูริก (ferulic acid) (Häkkinen, 2000) โครงสร้างของกรดฟีนอลิกบางชนิดแสดงดังภาพที่ 2.2



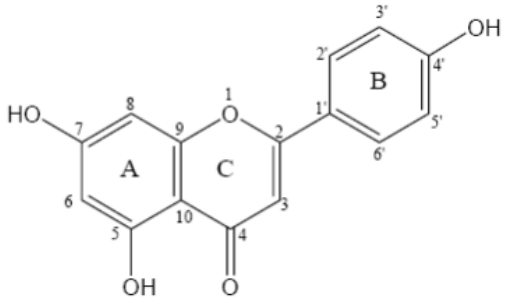
ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของกรดฟีนอลิกบางชนิด (Dai และ Mumper, 2010)

มีการรายงานว่ากรดฟีนอลิกสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้โดยไปทำลายการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ รวมทั้งยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิกซึ่งเป็นจำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย ความสามารถของกรดฟีนอลิกในการทำลายแบคทีเรียขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมี โดยจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลที่เพิ่มขึ้นในโครงสร้างของกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก และกรดไฮดรอกซีซินนามิก มีผลทำให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น แต่หากมีการแทนที่หมู่ไฮดรอกซิลด้วยหมู่เมทิลของกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก หรือจำนวนคาร์บอนที่เพิ่มขึ้นในโครงสร้างของกรดไฮดรอกซีซินนามิกจะสามารถทำให้มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น โดยกรดเฟอรูลิกซึ่งเป็นกรดฟีนอลิกชนิดหนึ่งที่อยู่ในกลุ่มของกรดไฮดรอกซีซินนามิก สามารถยับยั้งและทำลายเชื้อ *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Listeria monocytogenes* ได้ดีกว่ากรดแกลลิก ซึ่งเป็นกรดฟีนอลิกที่อยู่ในกลุ่มของกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก แม้ว่ากรดแกลลิกมีหมู่ไฮดรอกซิลมากกว่ากรดเฟอรูลิก แต่กรดฟีนอลิกมีจำนวนคาร์บอนในสายโซ่ที่ยาวกว่าจึงมีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่า (Borges และคณะ, 2013)

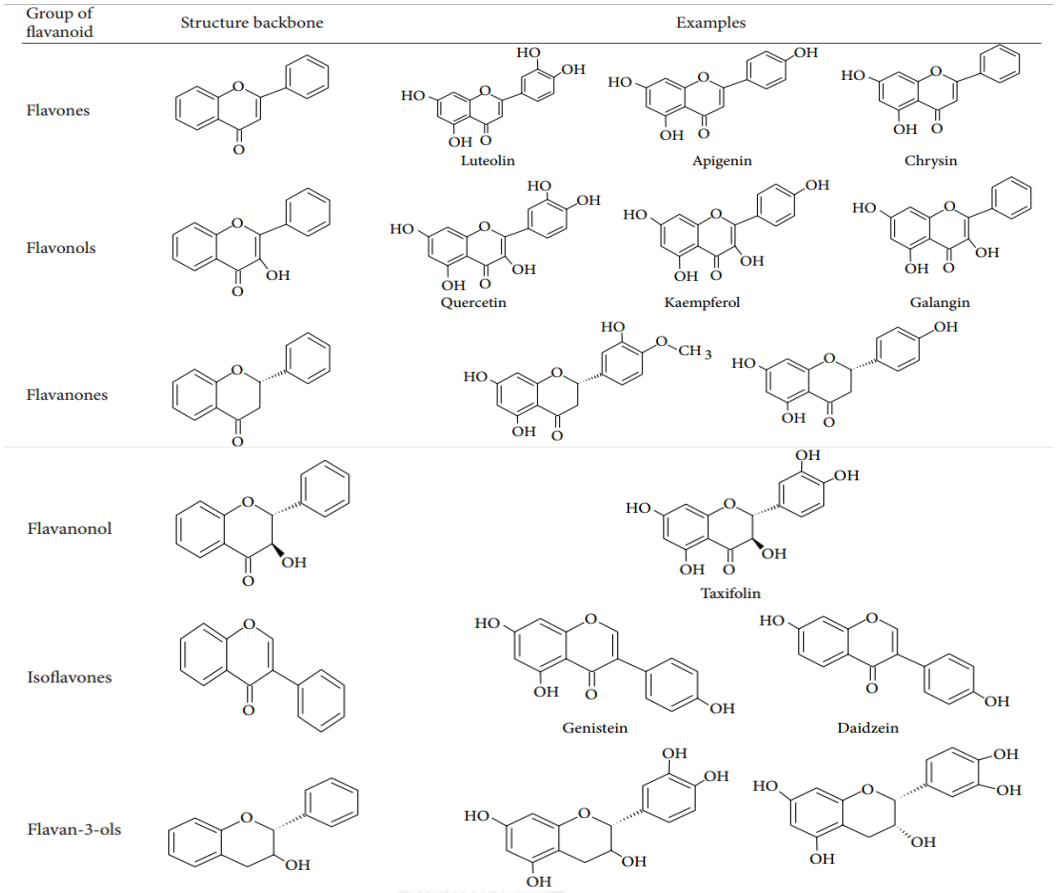
2.2.1.2 ฟลาโวนอยด์ (flavonoids)

ฟลาโวนอยด์เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม ที่มีการจัดเรียงตัวแบบ C6-C3-C6 โดยคาร์บอนที่เป็น C6 เป็น วงเบนซีน 2 วง เรียกว่า วง A และ วง B ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยคาร์บอน 3 อะตอม (C3) ดังภาพที่ 2.3 C3 ที่เชื่อมต่อระหว่างวง A และ B อาจเกิดการปิดเป็นวง C ได้ โดยเกิดจากแรงของอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว ของอะตอมออกซิเจนระหว่างวง A และ B ทำให้คาร์บอน 3 อะตอมของโครงสร้างในวง C เกิดการโค้งเข้ามาเป็นวง heterocyclic เรียกโครงสร้างนี้ว่า ฟลาวานนิวเคลียส (flavan nucleus) (Cushnie และ Lamb, 2005; วิทยา ทรัพย์เย็น, 2550)

ฟลาโวนอยด์จะแบ่งตามหมู่ฟังก์ชันและพันธะที่เกิดขึ้นที่วง C จึงสามารถแบ่งฟลาโวนอยด์ออกเป็น 6 ชนิด ตามโครงสร้างที่แตกต่างกันได้แก่ ได้แก่ ฟลาโวนอล (flavonols) ฟลาโวน (flavones) ไอโซฟลาโวน (isoflavones) ฟลาวาโนน (flavanones) ฟลาวาน-3-ออล (flavan-3-ols) ดังภาพที่ 2.4 นอกจากนั้นฟลาโวนอยด์สามารถเกิดพันธะไกลโคซิดิกกับน้ำตาลโมเลกลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ เช่น น้ำตาลกลูโคส และ น้ำตาลแรมโนส เป็นต้น เรียกโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ที่เกิดพันธะกับโมเลกุลน้ำตาลว่า ไกลโคไซด์ (glycoside) และเรียกโครงสร้างฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในรูปอิสระว่า อะไกลโคน (aglycone) ในธรรมชาติสามารถพบฟลาโวนอยด์ทั้งสองชนิด (Cushnie และ Lamb, 2005; Kumar และ Pandey, 2013)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างฟลาโวนอยด์ (Cushnie และ Lamb, 2005)



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของสารประกอบฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ (Dai และ Mumper, 2010)

สารประกอบฟลาโวนอยด์มีความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้โดยไปทำลายการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์, ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ รวมทั้งยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิกซึ่งเป็นจำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียเช่นเดียวกับกรดฟีนอลิก (Cushnie และ Lamb, 2005) แต่สารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์พบได้ในรูปของอะไกลโคนและไกลโคไซด์ ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อต่างกัน โดยมีการรายงานว่า ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ เช่น รูทิน (rutin) ซึ่งประกอบด้วยเควอซิทิน (quercetin) เกาะอยู่กับน้ำตาลรูติโนส (rutinose) มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียน้อยกว่าฟลาโวนอยด์อะไกลโคน เช่น เควอซิทิน (quercetin) เป็นต้น (Mandalari และคณะ, 2007) นอกจากนั้นยังมีการรายงานว่าจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลที่พบในโครงสร้างวง C และจำนวนหมู่เมทอกซี (methoxy) ที่พบในโครงสร้างของวง A ของฟลาโวนอยด์อะไกลโคน มีผลต่อการต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ (He และคณะ, 2013)

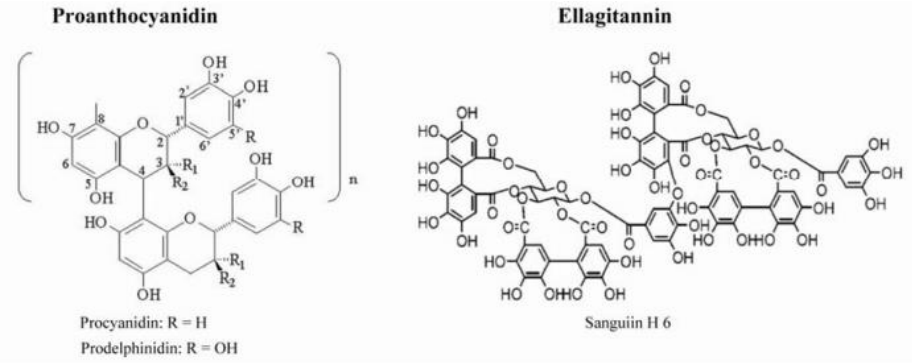
2.2.1.3 แทนนิน (Tannin)

แทนนินเป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่สำคัญของสารประกอบฟีนอลิก มักพบที่เปลือกไม้ มีรสฝาด โครงสร้างซับซ้อน สามารถตกตะกอนโปรตีนได้โดยหมู่ฟีนอลิกจับกับหมู่อะมิโน (-NH) ของสายเปปไทด์และโปรตีน และมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ แทนนินสามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม ได้แก่

- ไฮโดรไลซ์แทนนิน (hydrolysable tannins) โครงสร้างประกอบด้วย 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเป็นน้ำตาลมักเป็นน้ำตาลกลูโคส อีกส่วนเป็นกรดฟีนอลเชื่อมต่อด้วยพันธะเอสเทอร์ หากเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์กับกรดแกลลิก เรียกว่า แกลโลแทนนิน หรือเกิดกับเฮกซะไฮดรอกซีไดฟีนิกส์ เรียกว่า แอลลาจิกแทนนิน และยังเกิดโครงสร้างได้อีกหลากหลาย

- คอนเดนส์แทนนิน (condensed tannins) โครงสร้างเกิดมาจากการรวมตัวแบบโพลิเมอร์ของฟลาวาน-3-ออล (flavan-3-ol) ซึ่งอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น ลิวโคแอนโทไซยานิดิน หรือเรียกว่า โปรแอนโทไซยานิดิน เนื่องจากย่อยสลายได้เป็น แอนโทไซยานิน (Dai และ Mumper, 2010; สุปรีณา ศรีใสคำ, 2552)

โครงสร้างของโปรแอนโทไซยานิดินซึ่งอยู่ในกลุ่มคอนเดนส์แทนนินและแอลลาจิแทนนินซึ่งอยู่ในกลุ่มของไฮโดรไลซ์แทนนินแสดงดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของแทนนินบางชนิด (Dai และ Mumper, 2010)

แทนนินสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้โดยไปทำลายการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ รวมทั้งไปจับกับไอออนโลหะซึ่งเป็นจำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของแทนนินคอนเดนส์แทนนิน (condensed tannins) และ ไฮโดรไลซ์แทนนิน (hydrolysable tannins) แตกต่างกัน โดยกลุ่มคอนเดนส์แทนนิน มีการรายงานว่าการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียขึ้นอยู่กับหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างวง B ของฟลาวาน-3-ออล หากมีหมู่ไฮดรอกซิลมากทำให้ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้นด้วย ส่วนกลุ่มไฮโดรไลซ์แทนนิน ที่เกิดจากโครงสร้างของน้ำตาลกลูโคสถูกเอสเทอร์ริไฟล์ด้วยกรดฟีนอลิก เช่น กรดแทนนิก ซึ่งเป็นน้ำตาลกลูโคสถูกเอสเทอร์ริไฟล์

ด้วยกรดแกลลิก ทำให้ความสามารถในการจับอิออนของโลหะมากขึ้น จึงมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเพิ่มมากกว่ากรดฟีนอลิก (Akiyama และคณะ, 2011)

2.2.2 การสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิก

ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเกิดจากสารประกอบฟีนอลิก ดังนั้นหากสารประกอบฟีนอลิกเกิดการสลายตัวทำให้มีผลต่อฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วย โดยการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกเกิดจากปฏิกิริยาต่างๆ เช่น Isomerization, oxidation, dehydrogenation, polymerization และ thermal rearrangements เป็นต้น ซึ่งมีปัจจัยต่างๆ เป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้แก่ อุณหภูมิ pH แสง และ ออกซิเจน การสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดเกิดได้ที่สภาวะแตกต่างกัน (Stintzing และ Turek, 2013) โดยสารประกอบฟีนอลิกเมื่อละลายน้ำจะอยู่ในรูปของฟีนอล (phenol) และ ฟีโนเลต (phenolates) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่สูญเสียไฮโดรเจนอิออนของฟีนอล โดยฟีนอลและฟีโนเลตที่ละลายในน้ำจะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับค่า pH ในสภาวะที่เป็นด่างหรือมีค่าพีเอชที่สูงขึ้นจะพบฟีโนเลตได้มากขึ้น นอกจากนั้นในสภาวะด่างซึ่งมีค่า pH สูง สารประกอบฟีนอลิกสามารถการสลายตัวโดยเกิดปฏิกิริยา Decarboxylation ได้อีกด้วย แต่ในสภาวะกรดซึ่งมีค่าพีเอชต่ำจะอยู่ในรูปของฟีนอลมากกว่า โดยมีการรายงานว่าที่ค่า pH เท่ากับ 12 พบในรูปฟีโนเลตได้มาก แต่ที่พีเอชเท่ากับ 2 จะอยู่ในรูปของฟีนอลมากกว่า (Chairez และคณะ, 2006)

2.3 การสกัดสารประกอบฟีนอลิก (phenolic extraction)

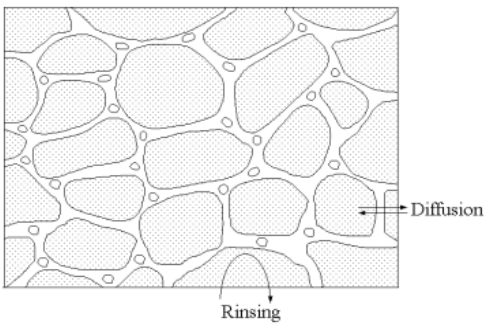
สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบที่อยู่ในเซลล์ของพืช หากใช้เป็นตัวอย่างสดจะต้องทำการสกัดทันทีหรืออาจเก็บเป็นระยะสั้นๆ ที่อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากตัวอย่างสดมีการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย ดังนั้นในการสกัดจึงต้องทำตัวอย่างให้แห้งก่อนเพื่อชะลอการเปลี่ยนแปลง (วิทยา ทรัพย์เย็น, 2550) ซึ่งในตัวอย่างพืชจะมีผนังเซลล์อยู่ชั้นนอกสุดเป็นโครงสร้างปิด การสกัดจึงต้องใช้ตัวทำละลายในการละลายเอาสารประกอบฟีนอลิกออกมา โดยการสกัดเกิดจากการแพร่ของตัวทำละลายผ่านผนังเซลล์ของพืช (diffusion) หรือเรียกว่ากระบวนการดูดน้ำกลับ (hydration) ตัวทำละลายเข้าสู่เซลล์จะเกิดการพองตัวขึ้น (swelling) และเกิดละลายหรือการชะเอาสารต่างๆ จากเซลล์ (rinsing) เป็นการถ่ายเทมวลขององค์ประกอบในเซลล์รวมกับตัวทำละลายออกสู่นอกเซลล์ (Vinatoru, 2001) ดังภาพที่ 2.6 การสกัดมีปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่

- ขนาดตัวอย่าง ตัวอย่างที่ได้จะต้องมีการลดขนาดลงเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวให้สัมผัสกับตัวทำละลายได้มากขึ้น โดยขนาดอนุภาคใหญ่ทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสกับตัวทำละลายน้อยจึงใช้ระยะเวลานานในการสกัด แต่ขนาดอนุภาคที่เล็กทำให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสมากขึ้นจึงใช้ระยะเวลาในการสกัดสั้นกว่า แต่การใช้ขนาดอนุภาคที่ต่ำกว่า 40 เมช ในการสกัดที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่าสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้ไม่แตกต่างกัน (Gong และคณะ, 2014)
- ตัวทำละลาย การสกัดต้องใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อละลายเอาสารที่ต้องการออกมา ขึ้นกับความเป็นขั้วของสารประกอบฟีนอลิก โดยส่วนที่มีขั้วเกิดจากหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ในโครงสร้าง และส่วนที่ไม่มีขั้วเกิดจากคาร์บอนอะตอมที่อยู่บนวงแหวนอะโรมาติก หากเป็น

สารประกอบฟีนอลิก ชนิดที่ไม่มีขั้วจะใช้ตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วในการสกัด เช่น คลอโรฟอร์ม หรือเฮกเซน เป็นต้น หรืออาจใช้ตัวทำละลายที่ค่อนข้างมีขั้ว เช่น เอทานอล เมทานอล อะซิโตน และอื่นๆ ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในกลุ่มของกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ซึ่งค่อนข้างมีขั้ว (วิทยา ทรัพย์เย็น, 2550) สำหรับสารสกัดสารประกอบฟีนอลิกเพื่อใช้ในอาหารมักใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ

- เวลาและอุณหภูมิ หากสกัดที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิเย็นจะทำให้ตัวทำละลายเกิดการเคลื่อนที่สัมผัสกับตัวอย่างได้ช้าทำให้การสกัดได้น้อย จึงต้องใช้ระยะเวลานานในการสกัด แต่หากเพิ่มอุณหภูมิ ความร้อนจะทำให้ลดความหนืดของตัวทำละลายทำให้เกิดการแพร่และการละลายมากขึ้น จึงใช้ระยะเวลาในการสกัดที่สั้นลดลง อย่างไรก็ตามสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดทนความร้อนได้แตกต่างกัน การใช้อุณหภูมิที่สูงและนานเกินไปอาจทำให้เกิดการสลายของสารประกอบฟีนอลิกที่ไม่ทนความร้อนได้ (Himanshu และคณะ, 2015) โดยมีการรายงานว่า การเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดถึง 50 องศาเซลเซียสทำให้สกัดสารประกอบฟีนอลิกได้มากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นโดยใช้อุณหภูมิเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส พบว่าเริ่มเกิดการสลายตัวจึงพบสารประกอบฟีนอลิกลดลงเล็กน้อย แต่จะเกิดการสลายตัวมากเมื่อใช้อุณหภูมิสูงเท่ากับ 80 องศาเซลเซียส (Akowuah และคณะ, 2009)

- วิธีการสกัด การสกัดด้วยวิธีต่างๆ ที่ใช้ทำให้ตัวทำละลายชะเอาสารออกมาได้ปริมาณที่ต่างกัน โดยการเขย่า (shaking) เป็นวิธีการสกัดแบบเดิมที่ใช้แรงเขย่าเพื่อเกิดการถ่ายโอนมวล (mass transfer) ทำให้สามารถละลายเอาสารที่ต้องการออกมาได้ และอาจมีการให้ความร้อนทำให้เกิดการถ่ายโอนความร้อน (heat transfer) เป็นการเพิ่มการถ่ายโอนมวล โดยอุณหภูมิจากตัวกลางที่ให้ความร้อนเกิดการถ่ายเทความร้อนสู่วัสดุที่บรรจุตัวทำละลาย แล้วจึงเกิดการถ่ายเทความร้อนอีกครั้งจากวัสดุสู่ตัวทำละลายและตัวอย่าง จึงใช้ระยะเวลาในการสกัดนาน (Chemat และ Cravotto, 2013; วราภรณ์ วิทยสินธนา, 2550) วิธีการสกัดที่เหมาะสมจะต้องมีละลายเอาสารประกอบฟีนอลิกออกมาได้มากที่สุด และมีการสลายของสารประกอบฟีนอลิกน้อยที่สุด ดังนั้นขั้นตอนการสกัดจึงเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญในการสกัดสารประกอบฟีนอลิก (Orsat และ Routray, 2012)



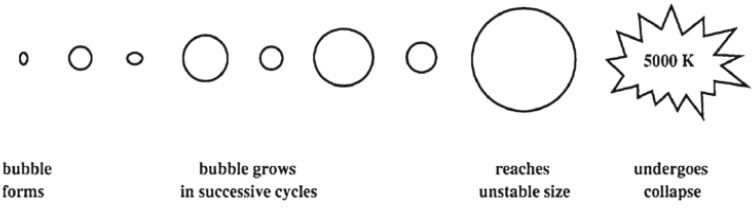
ภาพที่ 2.6 การสกัดสารจากเซลล์พืช (Vinatoru, 2001)

2.3.1 การเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารประกอบฟีนอลิก

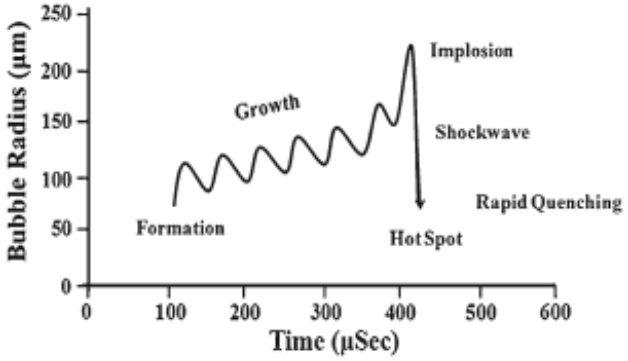
การสกัดแบบเดิมต้องใช้ระยะเวลาในการสกัดนาน หรือมีการใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไปอาจทำให้เกิดการเสื่อมสลายของสารประกอบฟีนอลิก จึงนำเทคนิคต่างๆมาประยุกต์ร่วมกับการใช้ตัวทำละลายในการสกัดสารประกอบฟีนอลิก เช่น การใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด และ การใช้คลื่นอัลตราโซนิคช่วยในการสกัด เป็นต้น ซึ่งวิธีการสกัดดังกล่าวช่วยทำให้ใช้ระยะเวลาในการสกัดสั้นลง ลดการเสื่อมสลายของสารประกอบฟีนอลิกได้ (Orsat และ Routray, 2012)

2.3.1.2 การสกัดด้วยคลื่นอัตราโซนิค (ultrasonic-assisted extraction, UAE)

การใช้คลื่นอัตราโซนิคประกอบด้วยช่วงบีบอัด (compression) และ ขยายตัว (expansion) เมื่อคลื่นอัตราโซนิคในช่วงขยายตัวเคลื่อนที่ผ่านตัวทำละลาย โมเลกุลของตัวทำละลายจะเกิดการเคลื่อนที่ออกจากกัน แต่ช่วงที่คลื่นอัตราโซนิคบีบอัดผ่านตัวทำละลาย โมเลกุลของตัวทำละลายจะเคลื่อนที่เข้าหากัน แรงบีบอัดและขยายตัวที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องนั้นเป็นผลทำให้เกิดฟองก๊าซ (bubbles) (Guo และคณะ, 2013) ในช่วงแรกฟองก๊าซจะมีขนาดเล็ก (bubble forms) ฟองก๊าซที่เกิดขึ้นนั้นจะทำให้โมเลกุลตัวทำละลายเคลื่อนที่เกิดการแพร่เข้าสู่เซลล์ และในระหว่างที่เกิดการบีบอัดและขยายตัว ฟองก๊าซจะเกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซ ทำให้ฟองก๊าซขยายตัวใหญ่ขึ้นอย่างรวดเร็ว (bubble grows) แต่ไม่นานฟองก๊าซไม่สามารถดูดซับพลังงานจากอัลตราโซนิคได้ ทำให้เกิดการควบแน่น (condensation) โมเลกุลที่ควบแน่นนั้นจะชนกันอย่างรุนแรงทำให้เกิดคลื่นกระแทก (shock waves) หรือเกิด microjet ทำให้ฟองก๊าซแตกตัว (collapse) ดังภาพที่ 2.7 ซึ่งมีความแรงมากพอที่จะทำให้ผนังเซลล์ของพืชถูกทำลาย จึงมีการถ่ายเทมวลสารเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการละลายเอาสารต่างๆ รวมทั้งสารประกอบฟีนอลิกออกจากเซลล์พืชได้มากขึ้น (Castro และ Garcia, 2003; Özcan, 2006) ฟองก๊าซที่แตกตัวนั้นเกิดจากการบีบอัดอย่างรวดเร็วของก๊าซและไอระเหยภายในฟองก๊าซทำให้เกิดจุดหรือบริเวณเล็กๆ ที่มีอุณหภูมิและความดันที่สูงมาก เรียกว่า จุดร้อน (hot spot) ดังภาพที่ 2.8 อุณหภูมิของจุดร้อนเหล่านี้อาจมากถึง 5000 องศาเซลเซียส และมีความดันมากถึง 1,000 ATM แต่อุณหภูมิจะลดลงในระยะเวลาอันสั้น โดยมีอัตราการระบายความร้อนหลังจากการเกิดการแตกของฟองก๊าซประมาณ 10 พันล้านองศาเซลเซียสต่อวินาที ซึ่งทันทีที่ฟองก๊าซแตกจะเกิดการปลดปล่อยพลังงานที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาหรือสร้างวิถีของปฏิกิริยา (reaction pathway) ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นเรียกว่า คาวิเตชัน (cavitation) ซึ่งสำคัญสำหรับการใช้คลื่นอัตราโซนิคช่วยในการสกัด (Suslick, 1994)



ภาพที่ 2.7 การเกิดฟองก๊าซเนื่องจากคลื่นอัลตราโซนิค (Guo และคณะ, 2013)



ภาพที่ 2.8 การเกิดฟองก๊าซและการการแตกตัวของก๊าซอากาศในของเหลวเมื่อได้รับคลื่นอัตราโซนิค (Guo และคณะ, 2013)

คาวิเตชันที่เกิดขึ้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ ได้แก่ คาวิเตชันแบบถาวร และคาวิเตชันแบบชั่วคราวโดยคาวิเตชันแบบถาวรจะเกิดขึ้นเมื่อฟองก๊าซได้รับคลื่นอัตราโซนิคเป็นจำนวนหลายรอบของการสั่น แต่ไม่เกิดการแตกของฟองก๊าซ ส่วนคาวิเตชันแบบชั่วคราวนั้นเกิดขึ้นในระยะการบีบอัดของฟองก๊าซในของเหลวได้รับความเครียด (tension stress) ขณะเริ่มเกิดการขยายตัวของฟองก๊าซ ซึ่งมีผลทำให้ฟองก๊าซแตกอย่างรวดเร็ว (Guo และคณะ, 2013) อย่างไรก็ตามการเกิดคาวิเตชันมีหลายปัจจัยเกี่ยวข้อง ได้แก่

- ความถี่ของคลื่น โดยความถี่สูงจะเกิดการแตกตัวของฟองก๊าซได้เร็ว

- ความเข้มของคลื่นเสียง การเพิ่มความเข้มของคลื่นเสียงทำให้เกิดการแตกตัวของฟองก๊าซได้ง่าย

- ตัวทำละลายที่ใช้ หากใช้สารที่มีความดันไอสูง ความหนืดต่ำ และมีแรงตึงผิวต่ำจะเกิดคาวิเตชันได้ดี

- ก๊าซ ก๊าซที่ละลายอยู่ในของเหลวหากมีมากจะทำให้เกิดฟองก๊าซที่ใหญ่ ดังนั้นจึงทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซมากจึงทำให้ฟองอากาศแตกตัวได้ง่าย

- อุณหภูมิ การเพิ่มอุณหภูมิทำให้เกิดการแตกตัวของฟองก๊าซได้ง่าย

คลื่นอัลตราโซนิค (ultrasonics) หรือคลื่นอัลตราซาวน์ (ultrasound) ที่ใช้ในการสกัดนั้นเป็นคลื่นเสียงในช่วงความถี่ที่มนุษย์ไม่สามารถได้ยิน เดิมคลื่นอัลตราโซนิคมีบทบาทสำคัญทางด้านการแพทย์หรือด้านสมุทรศาสตร์ ต่อมาจึงมีการนำมาประยุกต์ใช้ด้านอื่นๆ รวมถึงการสกัดสารประกอบฟีนอลิกด้วย ความถี่ที่ใช้ในการสกัดอยู่ในช่วงพาวเวอร์อัลตราซาวน์ (power ultrasound) ซึ่งมีความถี่เท่ากับ 20–100 kHz (Lorimer และคณะ, 1996)

การสกัดโดยใช้อัลตราโซนิคช่วยในการสกัดมักนิยมใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า อ่างอัลตราโซนิค (ultrasonic baths) ซึ่งนิยมนำมาใช้ โดยเฉพาะในห้องปฏิบัติการเนื่องจากมีราคาไม่แพง โดยมีตัว

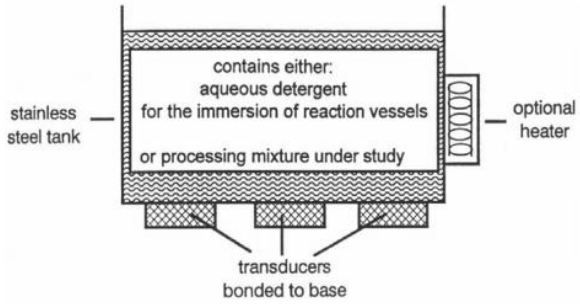
กำเนิดพาวเวอร์อัตราโซนิค ได้แก่ ระบบที่ใช้ไฟฟ้าเพื่อทำให้เกิดคลื่นเสียง (electroacoustic systems) เช่น พีโซอิเล็คตริก หรือ แมกนีโตสตริกทีฟทรานสดิวเซอร์ และใช้อุปกรณ์เพื่อส่งคลื่นอัตราโซนิคไปยังของเหลว โดยสรุประบบอัลตราโซนิคมีอุปกรณ์ที่สำคัญและจำเป็นอยู่ 3 ส่วน ได้แก่

- เครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้า (generator) เพื่อเปลี่ยนไฟฟ้ากระแสตรงไปเป็นกระแสสลับที่มีความถี่ที่ต้องการ แล้วผ่านเข้าสู่ทรานส์ดิวเซอร์

- ทรานส์ดิวเซอร์ (transducer) ทำหน้าที่เปลี่ยนไฟฟ้ากระแสสลับความถี่สูงไปเป็นพลังงานกล

- ระบบส่งถ่ายพลังงาน (delivery systems) ทำหน้าที่ส่งถ่ายพลังงานจากการสะเทือนไปยังของเหลว สำหรับอ่างอัลตราโซนิค (ultrasonic bath) ตัวทรานส์ดิวเซอร์จะอยู่บริเวณฐานตรงด้านล่างของตัวอย่าง และส่งถ่ายพลังงานโดยตรงไปยังของเหลวที่อยู่ภายในอ่าง (Lorimer และคณะ, 1996)

โดยทั่วไปทรานส์ดิวเซอร์จะติดอยู่กับบริเวณฐานด้านล่างของอ่างดังภาพที่ 2.9 ความถี่ที่ใช้งานทั่วไปประมาณ 40 กิโลเฮิร์ต โดยมีอุปกรณ์เสริมต่างๆ เพื่อทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานดีขึ้น เช่น อุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (thermostatically controlled heating) อุปกรณ์กระจายคลื่น (frequency sweeps) ที่ทำให้คาวิเตชันเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอ อุปกรณ์ปรับระดับพลังงาน และ นาฬิกาจับเวลา เป็นต้น อ่างอัลตราโซนิคทั่วไปมักให้พลังงานต่ำ เพื่อหลีกเลี่ยงความเสียหายจากคาวิเตชันบริเวณผนังด้านในของอ่าง (Vinatoru, 2001)

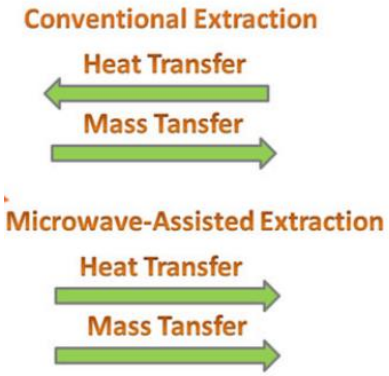


ภาพที่ 2.9 ทรานส์ดิวเซอร์บริเวณฐานอ่างอัตราโซนิค (Lorimer และคณะ, 1996)

2.3.1.3 การใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด (microwave-assisted extraction, MAE)

การสกัดด้วยวิธีแบบเดิมมักมีการให้ความร้อนเพื่อเพิ่มการถ่ายโอนมวลแต่เป็นการให้ความร้อนผ่านตัวกลางหรือแหล่งให้ความร้อน เช่น อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เกิดจากการถ่ายเทความร้อนจากภายนอกสู่ภายใน จึงทำให้เกิดการถ่ายเทมวลเอาสารออกมาสู่ตัวทำละลายได้ ทำให้ต้องใช้ระยะเวลานานในการสกัด เสี่ยงต่อการสลายสารประกอบฟีนอลิกบางตัวที่ไม่ทนความร้อน ดังนั้นจึงมี

การใช้คลื่นไมโครเวฟ (microwave) เพื่อช่วยในการสกัด เป็นการให้ความร้อนโดยตรงกับตัวอย่างและสารละลาย การให้ความร้อนของการสกัดแบบเดิมและการให้ความร้อนของการใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัดแสดงดังภาพที่ 2.10 (Chemat และ Cravotto, 2013)



ภาพที่ 2.10 ความร้อนที่เกิดขึ้นด้วยวิธีการสกัดแบบเดิมและความร้อนที่เกิดขึ้นจากการใช้ไมโครเวฟช่วยในการสกัด (Chemat และ Cravotto, 2013)

การใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัดร่วมกับตัวทำละลาย เกิดจากคลื่นไมโครเวฟซึ่งเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าชนิดหนึ่งจึงสามารถสร้างสนามไฟฟ้าได้ ดังนั้นเมื่อคลื่นไมโครเวฟผ่านตัวทำละลายซึ่งมีสมบัติเป็นไดอิเล็กทริก จึงดูดซับคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าแล้วเปลี่ยนเป็นพลังงานความร้อน ดังนั้นการเลือกตัวทำละลายจึงมีความสำคัญในการสกัด โดยคุณสมบัติไดอิเล็กทริกของสารต่างๆ ขึ้นอยู่กับค่า dielectric constant เป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถในการดูดซับคลื่นไมโครเวฟ และค่า loss tangent เป็นค่าที่แสดงถึงการเปลี่ยนพลังงานไฟฟ้าเป็นพลังงานความร้อน ค่า dielectric constant และ ค่า loss tangent ของตัวทำละลายบางชนิดแสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ค่า dielectric constant และค่า loss tangent ของตัวทำละลายบางชนิด (Chemat และ Cravotto, 2013)

ตัวทำละลาย	dielectric constant	loss tangent
เอทานอล	24.3	2,555
น้ำ	78.3	1,570

ความร้อนที่เกิดขึ้นเกิดจากตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปมาอย่างรวดเร็ว ด้วยการหมุนของขั้วของตัวทำละลายเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้า จึงเกิดการชนกันทำให้เกิดความร้อนสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ตัวทำละลายจึงสามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ได้มากและเร็วกว่าการสกัดแบบเดิม โดยตัวทำละลายที่อยู่ในเซลล์เกิดความร้อนจากไมโครเวฟทำให้เกิดไอและมีแรงดันขึ้นภายในเซลล์ แรงดันจะเพิ่มขึ้นจนมากพอที่จะทำให้เซลล์แตกได้ในที่สุด จึงมีการปลดปล่อยสารสำคัญที่อยู่ภายในออกมาผสมกับตัวทำละลายที่ใช้

สกัด กระบวนการสกัดนี้จึงใช้ระยะเวลาสั้นๆ ไม่นานพอที่จะทำให้เกิดการสลายตัวขององค์ประกอบของสารที่สกัดได้เนื่องจากความร้อนที่เกิดขึ้น (Orsat และ Routray, 2012)

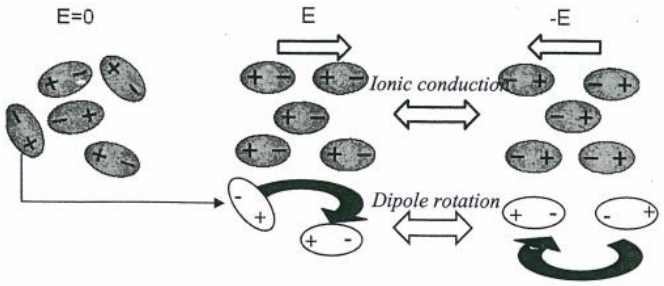
คลื่นไมโครเวฟที่ใช้ในการสกัดเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic Wave) ชนิดหนึ่งที่มีความยาวคลื่นอยู่ระหว่างคลื่นวิทยุ (radio wave) กับอินฟราเรด (infrared) มีความถี่ตั้งแต่ 300 MHz ถึง 300 GHz โดยทั่วไปจะใช้ความถี่เท่ากับ 2,450 MHz จากการที่วัตถุดูดซับพลังงานไมโครเวฟได้เนื่องจากการมีคุณสมบัติไดอิเล็กทริก ทำให้เกิดพลังงานความร้อนจากกลไก 2 ประการ ได้แก่ การเคลื่อนที่ของอิออนเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้า (ionic polarization) และ การหมุนของสารประกอบที่มีขั้ว (dipole rotation) (วราภรณ์ วิทยสินธนา, 2550) ดังภาพที่ 2.11

- การเคลื่อนที่ของอิออนเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้า (ionic polarization)

ภายในเตาไมโครเวฟ (microwave oven) จะมีอุปกรณ์ที่เรียกว่าแม็กนีตรอน (magnetron) ทำหน้าที่สร้างสนามไฟฟ้ากระแสสลับ เมื่ออนุภาคที่มีประจุสัมผัสกับคลื่นไมโครเวฟจะทำให้การสั่นจึงเกิดการชน (collisions) หรือเสียดสีกับอนุภาคที่อยู่ข้างเคียงเป็นผลทำให้เกิดความร้อน โดยโมเลกุลที่สามารถแตกตัวได้ เช่น โซเดียม โปตัสเซียม หรือ แคลเซียมคลอไรด์ เป็นต้น จะแตกตัวให้อิออนบวก (cations) และ อิออนลบ (anions) ดังนั้นอนุภาคที่มีประจุจึงสามารถที่จะมีอันตรกิริยา (interactions) กับสนามไฟฟ้าได้

- การหมุนของสารประกอบที่มีขั้ว (dipole rotation)

โมเลกุลมีขั้ว (polar molecule) เช่น น้ำ เป็นต้น ซึ่งในสภาพปกติจะเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ (random oriented) เมื่อผ่านสนามไฟฟ้ากระแสสลับ ประจุบวกและประจุลบในโมเลกุลเกิดการหมุนตัวเพื่อเปลี่ยนทิศทางตามทิศของสนามไฟฟ้าสลับนั้นๆ โดยการหมุนตัวกลับไปมาจะเกิดอย่างรวดเร็วตามความถี่ของไมโครเวฟคือ 915 หรือ 2,450 พันล้านครั้งต่อวินาที ทำให้เกิดความร้อนขึ้นและกระจายไปยังโมเลกุลข้างเคียง เนื่องมาจากการชนระหว่างโมเลกุล ในส่วนของโมเลกุลที่อยู่ในสถานะของแข็ง เช่น น้ำแข็ง โมเลกุลน้ำจะถูกยึดติดกับโครงสร้างที่มีลักษณะเฉพาะของผลึกและไม่สามารถหมุนตัวเองเพื่อที่จะทำให้เกิดความร้อนได้ ส่วนโมเลกุลที่อยู่ในสถานะแก๊สหรือไอ จะมีโมเลกุลข้างเคียงจำนวนน้อยไม่พอที่จะทำให้เกิดความร้อนได้เช่นกัน โดยอันตรกิริยาชนิดนี้มีความสำคัญที่สุด (Orsat และ Routray, 2012; วราภรณ์ วิทยสินธนา, 2550)



ภาพที่ 2.11 การเคลื่อนที่ของอิออน (ionic polarization) และ การหมุนของสารประกอบที่มีขั้ว (dipole rotation) เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้า (ผดุงศักดิ์ รัตนเดโช, 2551)

ปัจจัยที่มีผลต่อการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ

- ความถี่ของคลื่น คลื่นไมโครเวฟที่มีความถี่ต่ำกว่า 816 และ 915 MHz จะทะลุผ่านได้ดีและมีความสม่ำเสมอในการให้ความร้อนมากกว่า

- ความเข้มของสนามไฟฟ้า เมื่อความเข้มของสนามไฟฟ้ามากขึ้น การให้ความร้อนจะใช้เวลาน้อยลง

- ความชื้น หากมีความชื้นจะทำให้อุณหภูมิเพิ่มได้เร็วขึ้น

- อุณหภูมิ จะมีผลต่อสัมประสิทธิ์การเปลี่ยนแปลงพลังงาน และมีผลต่อสถานะขององค์ประกอบที่ดูดกลืนพลังงานได้ดี เช่น น้ำ ดังนั้นอุณหภูมิจึงมีผลต่อการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ

- ขนาด ตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่หรือมีความหนามาก การใช้ไมโครเวฟที่มีความถี่สูงเกินไปอาจทำให้ไมโครเวฟไม่สามารถทะลุผ่านเข้าไปถึงกึ่งกลางได้ ทำให้อุณหภูมิไม่สม่ำเสมอ

- การนำไฟฟ้า เนื่องจากการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟจะเกิดการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีประจุจึงมีความสัมพันธ์กับการนำไฟฟ้า เมื่อเพิ่มการนำไฟฟ้าด้วยสารที่สามารถแตกตัวให้ประจุจะทำให้อัตราการให้ความร้อนสูงขึ้น

- การนำความร้อน (thermal conductivity) ระหว่างการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟจะเกิดการถ่ายเทความร้อนโดยการนำความร้อน หากตัวอย่างมีความหนามากไมโครเวฟไม่สามารถทะลุเข้าไปถึงกึ่งกลางได้ จึงต้องมีการลดขนาดเพื่อเกิดการนำความร้อนได้ดี

- ความร้อนจำเพาะ (specific heat) ความร้อนจำเพาะของตัวอย่างมีผลต่ออัตราเร็วในการเพิ่มอุณหภูมิ สารที่มีความร้อนจำเพาะสูงกว่าจะมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิช้ากว่า (ผดุงศักดิ์ รัตนเดโช, 2551)

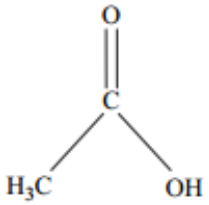
2.4 กรดอินทรีย์ (organic acid)

การใช้กรดอินทรีย์ซึ่งเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติและมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเช่นกัน มาใช้ลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร การเลือกใช้กรดในอาหารจะต้องคำนึงถึงวัตถุประสงค์ในการใช้ ชนิดกรด คุณสมบัติของกรด การอนุญาตให้ใช้ตามกฎหมาย (ศิวาพร ศิวเวชช, 2529) โดยกรดอินทรีย์เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดและยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และได้รับการยอมรับจากองค์การอนามัยโลก (WHO) ให้ใช้เป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ (กานต์ แย้มพงษ์ และ อรอินทุ์ ประไชโย, 2554) ตัวอย่างกรดอินทรีย์ที่ใช้ในอาหารได้แก่ กรดแอซีติก และกรดแลกติก เป็นต้น

2.4.1 กรดแอซีติก (acetic acid)

กรดแอซีติก(acetic acid) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ กรดเอทาโนอิก (ethanoic acid) ค่า pKa ของกรดแอซีติกเท่ากับ 4.70 มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 60.05 กรัมต่อโมล (López และคณะ, 2011) โครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.12 มีลักษณะเป็นของเหลวใส หรือผลึก มีกลิ่นฉุนเฉพาะตัว เป็นส่วนประกอบหลักของน้ำส้มสายชู มีการใช้มากในอุตสาหกรรมอาหาร โดยวัตถุประสงค์ในการใช้เพื่อเป็นสารให้กลิ่นรส เพิ่มความเป็นกรด รวมทั้งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จึงมีการนำมาใช้ยืดอายุการเก็บของอาหาร

การเตรียมกรดแอซีติก สามารถเตรียมได้โดยการหมักน้ำตาลในน้ำผลไม้ให้เป็นแอลกอฮอล์ แล้วจึงหมักต่อด้วยเชื้อ *Acetobactor* จึงได้กรดแอซีติกหรืออาจหมักแอลกอฮอล์ด้วยเชื้อ *Acetobactor* (ศิวาพร ศิวเวชช, 2529)

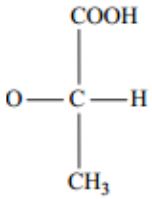


ภาพที่ 2.12 โครงสร้างของกรดแอซีติก (Lues และ Theron, 2007)

2.4.2 กรดแลกติก (lactic acid)

กรดแลกติก (lactic acid) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ 2-Hydroxypropanic acid ค่า pKa ของกรดแลกติกเท่ากับ 3.86 มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 90.08 กรัมต่อโมล (López และคณะ, 2011) โครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.13 อาจจะอยู่ในรูปเป็นผลึกหรือของเหลวข้น ไม่มีสี มีกลิ่นครีมอ่อนๆ ละลายน้ำได้ดี ให้รสเปรี้ยวปานกลาง ในอุตสาหกรรมอาหารจะใช้กรดแลกติกทำหน้าที่เป็นสารเพิ่มความเป็นกรด สารให้กลิ่นรส และใช้ช่วยป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่จะทำให้เกิดการเน่าเสีย

การเตรียมกรดแลกติก สามารถเตรียมได้โดยการหมักน้ำตาลทรายบริสุทธิ์โดยการเปลี่ยนให้เป็นแคลเซียมแลคแตด จากนั้นมาทำปฏิกิริยากับกรดกำมะถัน เพื่อให้ได้สารละลายกรดแลกติกบริสุทธิ์ นอกจากนั้นอาจใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* หมักแป้งมันฝรั่ง กากน้ำตาล และยังสามารถใช้เชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* ผลิตได้อีกด้วย (ศิวาพร ศิวเวชช, 2529)



ภาพที่ 2.13 โครงสร้างของกรดแลกติก (Lues และ Theron, 2007)

2.4.3 การใช้กรดอินทรีย์ในการยับยั้งเชื้อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

Lin และคณะ (2004) ได้ทดสอบกรดต่างๆ ได้แก่ กรดแอซีติก กรดแลกติก และ กรดซิตริก เทียบกับกรดไฮโดรคลอริกซึ่งเป็นกรดแก่ เพื่อลดจำนวนของแบคทีเรีย *S.* Typhimurium โดยการใช้กรดอินทรีย์ซึ่งเป็นกรดอ่อนสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้โดยส่วนที่ไม่แตกตัวในกรดอ่อนแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย แล้วเกิดการแตกตัวเป็นไฮโดรเจนอิออน (hydrogen ion) จำนวนมาก ทำให้ค่า pH ภายในเซลล์ต่ำ ไฮโดรเจนอิออนที่เกิดขึ้นนั้นจะรบกวนเมแทบอลิซึ่มต่างๆ ภายในเซลล์แบคทีเรีย เช่น เกิดการยับยั้งเอนไซม์ เป็นต้น ทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด ส่วนที่ไม่แตกตัวของกรดอินทรีย์นั้นขึ้นอยู่กับค่า pKa ดังนั้นกรดแอซีติกมีค่า pKa สูงสุดจึงลดจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ได้มากสุด ตามด้วย กรดแลกติก และกรดซีตริก ตามลำดับ โดยการใช้กรดไฮโดรคลอริกซึ่งเป็นกรดแก่มีการแตกตัวมากสุด จึงมีความสามารถในการลดจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ได้น้อยสุด นอกจากนั้น Barros และคณะ (2009) ได้ใช้กรดแอซีติก และ กรดแลกติก ทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อเชื้อ *S. aureus* พบว่า กรดแอซีติกใช้ความเข้มข้นต่ำกว่ากรดแลกติกในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* แสดงให้เห็นว่ากรดแอซีติกมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตได้มากกว่ากรดแลกติก เนื่องจากความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของกรดอินทรีย์ขึ้นอยู่กับค่าpH ค่าคงที่การแตกตัว (pKa) และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ ในสภาวะพีเอชต่ำ กรดแอซีติกซึ่งมีค่า pKa (pKa = 4.74) สูงกว่ากรดแลกติก (pKa = 3.85) สามารถยับยั้งเชื้อได้ดีกว่ากรดแอซีติก

2.6 สะระแหน่ (mint)

2.6.1 ลักษณะทั่วไปของสะระแหน่

สะระแหน่เป็นพืชสมุนไพรที่อยู่ในอาณาจักร Plantae สกุล Melissa ในวงศ์ Labiatae สะระแหน่ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Mentha cordifolia* Opiz ชื่อสามัญที่เรียกทั่วไปคือ mint สะระแหน่มีถิ่นกำเนิดจากแถบยุโรปตอนใต้แถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ในไทยมีชื่อเรียกแตกต่างกันตามท้องถิ่น ได้แก่ สะระแหน่ หอมด่วน (ภาคเหนือ) สะแหน่ มักเงาะ (ภาคใต้) เป็นต้น โดยสะระแหน่เป็นพืชในวงศ์เดียวกับกะเพรา มินต์ แมงลัก และโหระพา ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสะระแหน่เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี เมื่อโตเต็มที่จะมีความสูงประมาณ 70 - 150 เซนติเมตร ลำต้นแผ่ทอดคลุมพื้นดิน แตกกิ่งก้านมาก กิ่งตั้งขึ้น มีกลิ่นหอมทุกส่วน ช่อดอกแบบช่อกระจุกรอบออกที่ซอกใบ ผลแห้งไม่แตกขนาดเล็ก ลำต้น ค่อนข้างมีสีแดงเข้ม ดอก มีสีขาวออกในช่วงปลายฤดูร้อน ใบ เป็นใบเดี่ยว เรียงตรงข้ามสลับตั้งฉาก ใบรูปรีกว้าง ผิวใบยับย่น ขอบใบหยักฟันเลื่อย มีขนาดเล็กประมาณเท่ากับหัวแม่มือผู้ใหญ่ ใบของพืชในตระกูลมินต์ มีกลิ่นหอมคล้ายกับในมะนาว สามารถเก็บเกี่ยวได้ในช่วงก่อนเดือนพฤศจิกายน โดยลำต้นจะเริ่มตายลงในช่วงฤดูหนาวและจะเริ่มงอกใหม่ในช่วงต้นฤดูใบไม้ผลิ สะระแหน่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางอาหารได้หลากหลาย โดยใบอ่อน และยอดอ่อนมีกลิ่นหอม นิยมนำมาบริโภคโดยตรงหรือเป็นเครื่องเคียงรับประทานกับอาหารพื้นเมือง รวมทั้งนำมาปรุงแต่งรสและกลิ่นของอาหาร เช่น ยำหมูย่าง ยำเบคอน ยำปูม้า กุ้งแช่น้ำปลา พล่ากุ้ง พล่าเนื้อ พล่าหมู น้ำตกหมูหรือเนื้อ แกล้มกับน้ำพริก ฯลฯ (ศศิวิมล แสวงผล และคณะ, 2546) โดยธรรมชาติของผักสดอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ การบริโภคโดยตรงจึงเสี่ยงต่อการเกิดโรคได้ มีการ

รายงานหลายครั้งเกี่ยวกับการตรวจพบแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิดในผักสดของประเทศไทย (ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์ และ สุภา อโนธารมณ์, 2548) จากการสำรวจการปนเปื้อนจุลินทรีย์ทั้งหมดในผักบริโภคสด วราภา มหากาญจนกุล และคณะ (2544) ได้รายงานว่า สะระแหน่ มีปริมาณ *E. coli* ปนเปื้อนมากที่สุด (4.9-5.8 log CFU/ml) รองมาคือ ผักชี ผักกาด หอมและกะหล่ำปลี (4.1-5.5, 4.3-4.5 และ 4.6-4.8 log CFU/ml) ตามลำดับ

2.6.2 ปัญหาของผักส่งออก

ด้วยสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมของประเทศไทย จึงสามารถเพาะปลูกผักผลไม้ได้หลากหลายชนิดและเป็นที่นิยมบริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ ดังนั้นการเพาะปลูกจึงไม่เพียงแต่ปลูกเพื่อการบริโภคภายในประเทศเท่านั้น แต่ยังปลูกเพื่อการส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศด้วย ซึ่งผักสดเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยที่มีการส่งออกไปยังประเทศต่างๆ ได้แก่ ญี่ปุ่น สหภาพยุโรป จีน และฮ่องกง แต่ตลาดอาหารที่ใหญ่มากและสำคัญต่อประเทศไทยคือสหภาพยุโรป ซึ่งเป็นตลาดนำเข้าผักผลไม้สดที่มีศักยภาพของไทย เนื่องจากสินค้าไทยสามารถส่งไปยังประเทศสมาชิกในกลุ่มสมาชิกยุโรปได้ และผู้บริโภคในกลุ่มสหภาพยุโรปมีกำลังในการซื้อ ทำให้ไทยต้องรักษาส่วนแบ่งตลาดนี้ไว้ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าผักและผลไม้สดของไทยจะมีมูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นในแต่ละปี แต่มักประสบปัญหาในกระบวนการผลิตและการส่งออกหลายประการ ได้แก่ ปัญหาด้านภาษี ปัญหาสินค้าไม่ได้ คุณภาพตามมาตรฐาน (ปริมาณสารพิษตกค้าง และ ด้านจุลินทรีย์) ปัญหาด้านสุขอนามัย, ปัญหามาตรการกีดกันทางการค้า ปัญหาการแข่งขัน และปัญหาการขนส่ง เป็นต้น โดยเฉพาะในด้านสุขอนามัยและความปลอดภัยของสินค้าอาหารสด รวมทั้งผักสด โดยที่ผ่านมาสหภาพยุโรปเข้มงวดกับการตรวจสอบสินค้าผักสดที่จะส่งออกไปยังตลาดสหภาพยุโรปมาก โดยเฉพาะการตรวจสอบปริมาณสารพิษหรือยาฆ่าแมลงตกค้าง รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ (สิรินาฏ พรศิริประทาน, 2554)

แม้ว่าภาครัฐได้ออกมาตรการเพิ่มเติมเพื่อรองรับการตรวจสอบที่เข้มงวดของสหภาพยุโรป แต่การนำสินค้าส่งออกไปขายในตลาดสหภาพยุโรปจะต้องผ่านการสุ่มตรวจที่ด่านซึ่งเป็นการตรวจสอบและควบคุมซ้ำอีกครั้ง โดยจะมีระบบเตือนภัยเร่งด่วน rapid alert system for food and feed (RASFF) เพื่อแจ้งเตือนปัญหาความปลอดภัยอาหารด้านพืช เป็นการควบคุมความปลอดภัยของอาหารที่เข้ามาในสหภาพยุโรป แต่ผักสดที่นำเข้าจากไทยถูกตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในปี 2547 ประเทศนอร์เวย์ได้ประกาศห้ามนำเข้าพืชสมุนไพรบางชนิดจากประเทศไทยเนื่องจากตรวจพบปัญหาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* และ *Salmonella* spp. มากกว่า 50 ครั้ง จึงมีการแจ้งเตือนในระบบ ประเทศไทยจึงถูกขึ้นบัญชีทำให้มีการเรียกคืนสินค้าจากท้องตลาดในสหภาพยุโรปหรือปฏิเสธการนำเข้าสินค้า และมีการตรวจสอบอย่างเข้มงวดมากขึ้น ดังนั้นเพื่อให้ผู้นำเข้าในสหภาพยุโรปเชื่อมั่นในสินค้าของไทย ผู้ประกอบการไทยที่จะส่งออกสินค้าประเภทผักไปสหภาพยุโรปต้องควบคุมกระบวนการผลิตให้มีมาตรฐานเพิ่มขึ้น (สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตรและสำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช กรมวิชาการเกษตร, 2554)

จากสถิติการแจ้งเตือนปัญหาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในสะระแหน่ระหว่างปี 2551 – 2553 ดังตารางที่ 2.4 พบว่าสะระแหน่เป็นผักที่มีการแจ้งเตือนปัญหาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ 2, 4 และ 1 ครั้งตามลำดับ (สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตรและสำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช กรมวิชาการเกษตร, 2554) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานการตรวจติดตามเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* spp. ในผักส่งออก จากตัวอย่างผักที่เก็บจากด่านท่าอากาศยานกรุงเทพฯระหว่างเดือนสิงหาคมถึงเดือนธันวาคม พบว่าผลการวิเคราะห์ สะระแน่จำนวนทั้งหมด 7 ตัวอย่าง พบว่า *E. coli* เกินมาตรฐานจำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งคิดเป็น 85.71% พบอีโคไลแต่ไม่เกินมาตรฐาน 1 ตัวอย่างคิดเป็น 14.29% และพบ *Salmonella* spp. จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 14.29% จากตัวอย่างทั้งหมด (พจนา สุภาสูรย์ และคณะ, 2549) จากปัญหาดังกล่าวกรมวิชาการเกษตรจึงได้กำหนดมาตรการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* และ *Salmonella* spp. ในผักสดก่อนส่งออกไปนอกราชอาณาจักร โดยกำหนดให้สะระแหน่ซึ่งเป็นหนึ่งในสินค้าผักสด 23 ชนิด (ผักชีไทย ผักชีฝรั่ง ใบกระเพรา ใบโหระพา ผักแขยง สะระแหน่ ผักแพรว ต้นหอม ผักคื่นไช่ ใบกุยไช่ ดอกกุยไช่ ชะอม ตะไคร้ ผักบุ้ง ผักแว่น ผักกระเฉด ใบบัวบก ใบชะพลู ผักโขมแดง ถั่วฝักยาว หน่อไม่ฝรั่ง พริกขี้หนู และผักปลัง) ที่ส่งออกไปประเทศนอร์เวย์ ไอซ์แลนด์ และประเทศสมาชิกสหภาพยุโรปเป็นสินค้าที่ผู้ส่งออกต้องปฏิบัติตามเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556) ดังนั้นกรมวิชาการเกษตรจึงได้กำหนดเกณฑ์การตรวจเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในผักส่งออกดังกล่าว โดยพบเชื้อ *E. coli* ได้ไม่เกิน 100 CFU/g และจะต้องไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp. (ประกาศกรมวิชาการเกษตร, 2558)

ตารางที่ 2.4 สถิติการแจ้งเตือนปัญหาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในสะระแหน่ระหว่างปี 2551 – 2553 (สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตรและสำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช กรมวิชาการเกษตร, 2554)

ผักที่มีการแจ้งเตือนปัญหาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์	ปี 2551	ปี 2552	ปี 2553
	จำนวนครั้ง	จำนวนครั้ง	จำนวนครั้ง
สะระแหน่	2	4	1

2.6.3 การล้างผัก

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคต่างๆ มีการปนเปื้อนในผักตั้งแต่ขั้นตอนการเพาะปลูก การขนส่ง ตลอดจนถึงการบริโภค หากไม่มีการล้างผักจะทำให้จำนวนเชื้อแบคทีเรียเกิดการสะสมทำให้มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น ผู้บริโภคเสี่ยงต่อการได้รับแบคทีเรียดังกล่าว ดังนั้นขั้นตอนล้างผักเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญในการลดจำนวนแบคทีเรียที่ปนเปื้อน ในการควบคุมจำนวนแบคทีเรียของผักทั้งระดับครัวเรือนและระดับอุตสาหกรรม มักใช้สารประกอบคลอรีน (chlorine compound) ในการล้าง ถึงแม้สารประกอบคลอรีนจะมีประสิทธิภาพในการลดจำนวนแบคทีเรีย แต่การใช้สารประกอบคลอรีนทำให้มีสารข้างเคียงตกค้างที่เป็นอันตรายคือ คลอรามีนและไตรฮาโลมีเธนซึ่งจัดเป็นสารก่อมะเร็ง ทำให้เกิดพิษต่อผู้บริโภคได้ นอกจากนั้นยังมีกลิ่นตกค้างของสารประกอบคลอรีนอีกด้วย (บุษกร ทองใบ,

2556; มัลลิกา ปัญญาคะโป และ ผ่องศรี เผ่าภูรี, 2550) จากปัญหาดังกล่าวและพฤติกรรมของผู้บริโภคในปัจจุบันซึ่งมีแนวโน้มหลีกเลี่ยงอาหารที่มีการใช้สารเคมี ทำให้มีการใช้สารจากธรรมชาติเพื่อควบคุมจำนวนเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากมีสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งแทนการใช้สารเคมีเพื่อเพิ่มความปลอดภัยในอาหาร (มนต์จันท์ คำยา และ วราภา มหากาญจนกุล, 2548) เช่น สารสกัดจากพืช หรือ กรดอินทรีย์ เป็นต้น

2.6.3.1 การใช้สารสกัดจากพืชในการล้างผัก

ข้อเสียของสารประกอบคลอรีนซึ่งเป็นสารเคมีที่นิยมใช้ลดจำนวนแบคทีเรียในผัก รวมทั้งค่านิยมของผู้บริโภคที่มีแนวโน้มในการบริโภคผักอินทรีย์เพิ่มขึ้น ทำให้มีการใช้สารสกัดจากพืชซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติมาเป็นทางเลือกหนึ่งในการล้างผัก โดยมีการรายงานว่าการใช้สารสกัดจากพืชลดจำนวนแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมี 2 ชั้น โดยชั้นนอกมีไกลโคลิปิดช่วยป้องกันสารจากภายนอกไปทำลายเซลล์ จึงถูกทำลายได้ยากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งมีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นเดียวซึ่งไม่มีไกลโคลิปิดอยู่ในโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ สารสกัดจากพืชและตัวอย่างของผักที่แตกต่างกันมีผลทำให้ลดจำนวนแบคทีเรียในผักได้แตกต่างกัน นอกจากนั้นการใช้ระยะเวลาที่สารสกัดจากพืชสัมผัสกับผัก (contact time) นานขึ้น หรือ ความเข้มข้นของสารสกัดจากพืชที่ใช้เพิ่มขึ้นนั้นทำให้ลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียได้มากขึ้นด้วย (Tirpanalan และคณะ, 2011)

2.3.6.2 การใช้กรดอินทรีย์ในการล้างผัก

กรดอินทรีย์เป็นสารกลุ่มหนึ่งที่สามารถใช้ในการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียได้ รวมทั้งเป็นสารเจือปนอาหารที่ยอมรับว่าปลอดภัย (generally recognized as safe: GRAS) จึงถูกนำมาใช้เป็นทางเลือกในการลดจำนวนแบคทีเรียในผัก (บุษกร ทองใบ, 2556) กรดอินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียได้แตกต่างกัน โดยมีการรายงานว่า การใช้กรดอินทรีย์สามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้งในกลุ่มของแกรมลบและแกรมบวกได้ (Tirpanalan และคณะ, 2011) อย่างไรก็ตามการใช้กรดอินทรีย์ในการล้างผัก ทำให้คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ซึ่งมีสีเขียวเกิดการสูญเสียแมกนีเซียมอิออนในโครงสร้าง แล้วถูกแทนที่ด้วยไฮโดรเจนอิออนของกรดอินทรีย์เกิดเป็นฟีโอไฟติน (pheophyin) ซึ่งมีสีเขียวมะกอก จึงทำให้เกิดการช้ำของผัก (burning effect) ซึ่งเป็นข้อเสียของการล้างผักด้วยกรดอินทรีย์ (Erge และคณะ, 2008)

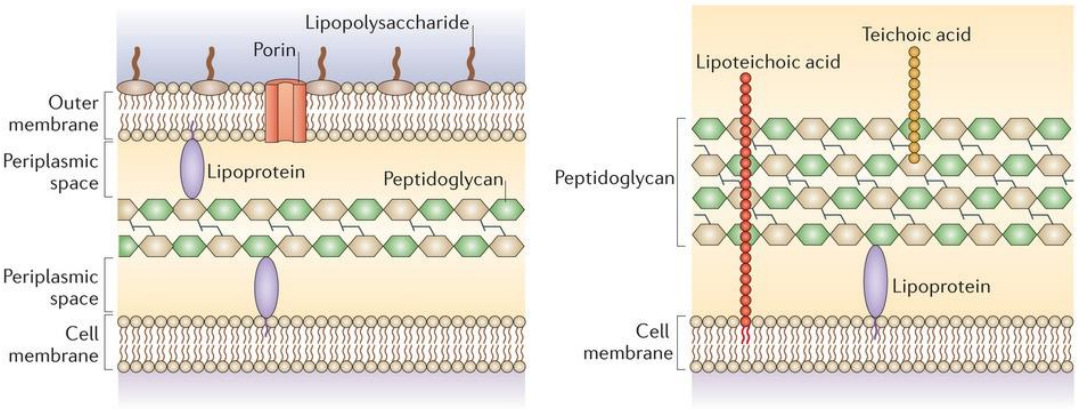
2.3.6.3 การใช้สารสกัดจากพืชร่วมกับกรดอินทรีย์ในการล้างผัก

การใช้สารสกัดจากพืชหรือกรดอินทรีย์เพียงอย่างเดียวทำให้ลดจำนวนแบคทีเรียได้ในระดับหนึ่ง แต่มีการรายงานว่าการใช้สารสกัดจากพืชสามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียได้มากขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับกรดอินทรีย์ โดยสารสกัดจากพืชสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ได้ จึงทำให้ส่วนที่ไม่แตกตัวของกรดอินทรีย์สามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้ง่าย เกิดการแตกตัวเป็นไฮโดรเจนอิออน ค่า pH

ภายในลดลง จึงไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ กรดนิวคลีอิกภายในเซลล์แบคทีเรีย แบคทีเรียเกิดการบาดเจ็บและตายในที่สุด (บุษกร ทองใบ, 2556)

2.7 แบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria)

แบคทีเรียก่อโรคสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียที่แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) มีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นเดียวประกอบด้วยเปปติโดไกลแคนซึ่งมีความหนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative) มีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียทั้งสองกลุ่มแสดงดังภาพที่ 2.14 โดยเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอก (outer membrane layer) ประกอบด้วยฟอสโฟไลปิด (phospholipid) และลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide: LPS) มีคุณสมบัติในการป้องกันอันตรายของสารต่างๆ จากภายนอกไม่ให้เข้าไปทำลายเซลล์ได้ แต่มีโครงสร้างโปรตีนช่องเปิดที่แทรกตัวในเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกที่เรียกว่าพอริน (porin) ทำให้สารสามารถผ่านเข้าในเซลล์แบคทีเรียแกรมลบได้ (Borges และคณะ, 2013) และมีชั้นเปปติโดไกลแคนบางกว่าแบคทีเรียแกรมบวก หน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์คือ ป้องกันเซลล์จากสภาพแวดล้อมภายนอก ช่วยควบคุมเกี่ยวกับแรงดันออสโมติก และอาจช่วยในการคัดเลือกสารเข้าเซลล์ ถัดจากเยื่อหุ้มเซลล์จะพบส่วนที่เรียกว่า โปรโตพลาซึม (protoplasm) ซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือไซโทพลาซึม (Cytoplasm) โดยส่วนใหญ่จะเป็นน้ำซึ่งเป็นตัวกลางช่วยในการเกิดปฏิกิริยา นอกจากนั้นยังเป็นที่อยู่ของออร์กาเนลต่างๆ ได้แก่ กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ซึ่งเป็นออร์กาเนลที่สำคัญซึ่งเกี่ยวข้องกับสารพันธุกรรม เป็นต้น โดยทั่วไปแบคทีเรียก่อโรคสามารถพบได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบเช่น *E. coli*, *S.* Typhimurium และ *S. aureus* เป็นต้น (Brown และคณะ, 2015)



(ก) (ข)

ภาพที่ 2.14 โครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (ก) และ แบคทีเรียแกรมบวก (ข) (Brown และคณะ, 2015)

2.7.1 เอสเชอริเชีย โคไล (*Escherichia coli*: *E.coli*)

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เจริญได้ในสภาพที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่นทั่วไป เนื่องจาก

E.coli พบในอุจจาระของมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นการพบเชื้อ *E.coli* ในอาหารหรือน้ำจึงเป็นการบ่งบอกถึงการปนเปื้อนจากการขับถ่าย (Kornacki, 2010)

สุมณฑา วัฒนสินธุ์ (2549) ได้อธิบายการแบ่งกลุ่มตามความรุนแรงของการเกิดโรค ลักษณะการเจริญเติบโตและลักษณะทางพันธุกรรมออกเป็น 5 กลุ่มดังนี้

- กลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในทางเดินอาหาร (Enterophathogenic *E .coli*) หรือ EPEC

สามารถทำให้ทารกที่มีอายุต่ำกว่าหนึ่งปีเกิดอาการท้องร่วง โดยการเกาะติดกับเซลล์ของเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดการรวมตัวกับเยื่อเมือกในลำไส้ จากนั้นเกิดการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนในเยื่อเมือกของลำไส้

- กลุ่มที่ทำลายเซลล์ในระบบทางเดินอาหาร (Enteroinvasive *E. coli*) หรือ EIEC

ไม่สร้างเอนเทอโรทอกซิน แต่ทำลายเซลล์โฮสต์ แล้วกระจายไปยังเซลล์ใกล้เคียงกับเชื้อบิด สามารถแพร่จากคนหนึ่งไปยังอีกคนหนึ่งได้

- กลุ่มที่สร้างสารพิษขึ้นในทางเดินอาหาร (Enterotoxigenic *E. coli*) หรือ ETEC

สร้างเอนเทอโรทอกซิน 2 แบบคือแบบที่ทนความร้อน (heat stable toxin – ST) จำแนกออกเป็น 2 ขนิด คือ ST-I และ ST-II และแบบไม่ทนความร้อน (heat labile toxin – LT) จำแนกออกเป็น 2 ขนิด คือ LT_A และ LT_B

- กลุ่มที่ทำให้เกิดเลือดออกในทางเดินอาหาร (Enterohemorrhagic *E. coli*) หรือ EHEC

สร้างสารพิษประเภทเวอโรทอกซินหรือเวอโรไซโตทอกซิน (verotoxin, verocytotoxin)

- กลุ่มที่ทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์บุผนังลำไส้ (Enteroaggregative *E. coli*) หรือ EAggEC เป็นสายพันธุ์ที่เพิ่งค้นพบใหม่ยังไม่พบความรุนแรง

2.7.2 ซัลโมเนลลา (*Salmonella* Typhimurium: *S.* Typhimurium)

ลักษณะทั่วไปของ *S.* Typhimurium เป็นแบคทีเรียแกรมลบ อยู่ในแฟมมิลี Enterobacteriaceae มีรูปร่างเป็นแท่ง (Rod shape) เคลื่อนไหวด้วยหนวดหรือแส้ที่มีอยู่รอบเซลล์ (Peritrichous flagella) ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างแคปซูล รวมทั้งไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสและเอนไซม์ออกซิเดส เจริญได้ในที่มีหรือไม่มีอากาศ (Facultative anaerobe) โดยสามารถหมักน้ำตาลกลูโคสและแมนโนส แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสและซูโครสได้ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต 8-45 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ 6.5-7.5 (Kornacki, 2010)

S. Typhimurium ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือ 60 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที หรือ 62 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ส่วนที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส ไม่สามารถทำลายเชื้อซัลโมเนลาได้ เพียงแต่เป็นการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อซัลโมเนลาเท่านั้น

S. Typhimurium เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่มีความรุนแรง โดยแหล่งที่อยู่อาศัยลำดับแรกของเชื้อ *S.* Typhimurium คือลำไส้ของสัตว์ หรืออาจพบตามร่างกายมนุษย์และสัตว์ จากนั้นแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อม ดิน น้ำ ปุ๋ย ซากสัตว์ที่เน่าเปื่อย วนเวียนเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารเดิมเป็นวัฏจักรทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อ *S.* Typhimurium (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2549)

2.7.3 แสตปฟิลโลคอกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*: *S. aureus*)

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก อยู่ในวงศ์ Micorococcaceae มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ประมาณ 0.5 – 1.0 ไมโครเมตร โดยทั่วไปเจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง 7.0 - 47.8 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 7.0 - 7.5 แต่สามารถเจริญได้ที่ค่า pH ตั้งแต่ 4.5 – 9.3 มักอยู่รวมกันเป็นสายสั้น หรือเกาะกลุ่มคล้ายพวงองุ่น ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ สร้างแคปซูล และสามารถสร้างเอนไซม์โคแอกกลูเลส (coagulase) และเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส (heat stable endonuclease) ที่ทนความร้อน เจริญได้ในที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) (Kornacki, 2010)

เชื้อ *S. aureus* สร้างสารพิษประเภท enterotoxin ที่เป็น single-chain globular protein ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 28000 – 35000 ดาลตัน โดยมีทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ A, B, C_1, C_2, D, E และ toxin shock toxin (TST) สารพิษทุกชนิดยกเว้น TST ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ สำหรับชนิดที่พบบ่อยที่สุดได้แก่ enterotoxin A และ D

เชื้อ *S. aureus* ถูกทำลายได้ง่ายโดยความร้อน ดังนั้นการตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้หรือสารพิษของแบคทีเรียชนิดนี้ในอาหารแปรรูปหรือบนอุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหาร บ่งบอกถึงสุขลักษณะการผลิตที่ไม่ดี สาเหตุทั่วไปของการปนเปื้อนเชื้อ *S. aureus* เกิดจากการสัมผัสของคน เนื่องจากคนเป็นแหล่งสำคัญของเชื้อชนิดนี้โดยเฉพาะตามผิวหนังและรูจมูกของคน ดังนั้นโรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* จึงมีสาเหตุมาจากการสัมผัสจากคนปนเปื้อนสู่อาหารทั้งทางตรงและทางอ้อมโดยผ่านอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการประกอบอาหารเช่น เขียง มีด และอุปกรณ์อื่นๆ นอกจากนี้ยังเกิดจากสาเหตุร่วมกับสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น การให้ความร้อนไม่เพียงพอ การเตรียมอาหารนานเกินไป เป็นต้น (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2549)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Chandrasekaran และ Venkatesalu (2004) สารสกัดจากเมล็ดหว้ามีสมบัติต้านการเจริญของของแบคทีเรียซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *S. aureus* ได้ดีกว่า *S.* Typhimurium, *P. aeruginosa, Klebsiella pneumonia* และ *E. coli*

Gao และ Liu (2005) ได้ทดลองสกัดฟลาโวนอยด์จาก *Saussurea medusa* ด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ การแช่สารละลาย การสกัดด้วย heat reflux การสกัดด้วย Soxhlet การสกัดด้วยคลื่นอัตราโซนิคและการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ พบว่า การสกัดด้วยคลื่นอัตราโซนิคและการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ ให้ปริมาณฟลาโวนอยด์สูงโดยใช้เวลาในการสกัดที่น้อยกว่าวิธีอื่นๆ

บุษกร ทองใบ (2556) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของกรดแอซีติกและสารสกัดข่าต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *S. aureus* ที่สร้างสภาพให้ปนเปื้อนบนผักชี แล้วจึงนำมาล้างด้วยกรดแอซีติก (1%v/v) สารสกัดข่า (10 mg/ml) และกรดแอซีติก (1%v/v) ร่วมกับสารสกัดข่า (10 mg/ml) เปรียบเทียบกันโดยมีน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุม พบว่ากรดแอซีติก (1%v/v) สารสกัดข่า (10 mg/ml) และกรดแอซีติก (1%v/v) ร่วมกับสารสกัดข่า (10 mg/ml) ลดปริมาณ *S. aureus* ได้ 1.26, 2.33 และ

3.17 log CFU/g ตามลำดับ และเมื่อศึกษาระยะเวลาในการแช่โดยแปรที่ระยะเวลา 5, 10, 20 และ 30 นาที พบว่าปริมาณ *S. aureus* ลดลงเหลือเพียง 1.04, 1.32, 1.78 และ 2.27 log CFU/g ตามลำดับ ดังนั้นระยะเวลาในการแช่ที่เหมาะสมคือ 30 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่3
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ จุลินทรีย์ วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

1. เมล็ดหว้าอบแห้ง ได้รับความเอื้อเฟื้อจากสถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จังหวัดลำปาง
2. สะระแหน่สด ไม่มีรอยช้ำ จากตลาดสดสามย่าน

3.1.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

Salmonella Typhimurium ATCC 13311, *Escherichia coli* ATCC 2592 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 2593 จากห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำแบคทีเรียมาเขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18±2 ชั่วโมง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส ทำการต่อเชื้อทุก 3 สัปดาห์

3.1.3 วัสดุและอุปกรณ์

1. กระดาษกรอง (paper filter) ยี่ห้อ Whatman เบอร์4
2. กระดาษกรอง เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 mm (Paper disc)
3. กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 20, 50 และ 100 มิลลิลิตร
4. เข็มเขี่ยเชื้อปลายกลม (loop)
5. ขวดก้นกลม (round bottom flasks)
6. ขวด duran ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
7. ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10, 100, 250 และ 1,000 มิลลิลิตร
8. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250, 500 มิลลิลิตร
9. ขวดสีชาสำหรับเก็บสาร (dark bottle)
10. คิวเวต (cuvett) ชนิดแก้ว
11. คีมคีบ (forceps)
12. จานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติก (plastic petri dish)
13. ช้อนตักสารเคมี (spatula)
14. ตะแกรงร่อน (sieve) ขนาด 40 เมช
15. ถุงตีตัวอย่าง (stomacher bag)
16. ถุงพลาสติกชนิดปิดผนึก (plastic bag)

17. ที่คีบ (tong)
18. ที่วางหลอดทดลอง (tube rack)
19. ทิป (tip) ที่ใช้กับไมโครปิเปต ขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
20. แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)
21. บีกเกอร์ (beager) ขนาด 50, 100, 250 มิลลิลิตร
22. พาราฟิล์ม (parafilm)
23. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20-200 และ 100-1,000 ไมโครลิตร
24. พาราฟิล์ม (parafilm) หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร
25. สเปรดเดอร์ (spreader)
26. สำลี (absorbent cotton)
27. อะลูมิเนียมฟอยล์ (aluminium foil)

3.1.4 เครื่องมือ

1 เครื่องวัดกรด ด่าง (pH meter, Metter Toledo AG8603, Switzerland)
2. เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator, Buchi, Switzerland)
3. เครื่องเขย่าสาร (shaker, New bruns wisk sciencetific, USA)
4. เครื่องปั๊มสุญญากาศ (vacumm pump, Gast, USA)
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันไอ (autoclave, Tomy SX 700, USA)
6. เครื่องบดตัวอย่าง (stomacher, Seward, 400 Circulator, England)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (centrifuge, KUBOTA 5310, Japan)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge, Micro22R Hettich, Germany)
9. เครื่องผสมสาร (vortex mixer, Vortex-2 Genie, USA)
10. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (analytical balance, Metter Toledo ML1602/01, Switzerland)
11. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytical balance, Metter Toledo ML204/01, Switzerland)
12. เครื่องโม่แห้ง (grinding mill, Lita, Thailand)
13. เครื่องไมโครเวฟ (microwave, LG, MS2127CW, Thailand)
14. เครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator, Buchi, Switzerland)
15. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer, Genesys, Thailand)
16. เครื่องอัตราโซนิค (ultrasonic bath, elmasonic, Switzerland)
17. ตู้บ่ม (incubator, WTC Binder, Germany)
18. ตู้ปลอดเชื้อ (biological safety cabinet, Telstar bioultra, USA)

19. ตู้เย็น (refrigerator, Whirlpool WRN-57HGG3, Korea)
20. ตู้อบลมร้อน (hot air oven, WTB Binder FD 115, Germany)

3.1.5 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. กรดแกลลิก (gallic acid, Sigma – Aldrich, Germany)
2. กรดแลกติก ความเข้มข้น 88.5 % w/v (lactic acid, Purac®, Netherlands)
3. กรดเกลเซียลแอซีติกความเข้มข้น 98.85 % w/v (glacial acetic acid, QREC, Malasia)
4. เควอซิทิน แอนไฮดรัส (quercetin, Sigma – Aldrich, USA)
5. โซเดียม คลอไรด์ (sodium chloride, Univar, Austraria)
6. โซเดียม แอนไฮดรัส คาร์บอเนต (sodium carbonate, Univar, Austraria)
7. นิวเทรียน อาการ์ (nutrient agar (NA), Himedia, India)
8. เปปโตนวอเตอร์ (peptone water, Himedia, India)
9. เพลทเคานท์ อาการ์ (plate count agar (PCA), Himedia, India)
10. โพแทสเซียมอะซิเตต (potassium acetate, QREC, Malasia)
11. โฟลิน-ซิโอแคลทู (Folin-Ciocaltau reagent, Merck, Germany)
12. มูลเลอร์ ฮินตัน บรอท (mueller hinton broth (MHB), Himedia, India)
13. มูลเลอร์ ฮินตัน อาการ์ (mueller hinton agar (MHA), Himedia, India)
14. อะลูมิเนียม คลอไรค์ เฮกซะไฮเดรต (aluminium chloride hexahydrate, QREC, Malasia)
15. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดสำเร็จรูปแบบแห้งสำหรับตรวจ *E. coli* และ *coliform* (EC Compact dry, Nissui, Japan)
16. เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 (ethanol 95%) จากห้างหุ้นส่วนจำกัด เอิร์ต เคมีแล็บประเทศไทย (ethanol 95%)

3.2 ขั้นตอนการวิจัย

3.2.1 เตรียมตัวอย่าง

นำเมล็ดหว้ามาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในตู้อบลมร้อนแบบถาด (tray dry) นำมาบดเป็นผงด้วยเครื่องโม่แห้งและร่อนด้วยตะแกรงขนาด 40 เมช (Modi และคณะ, 2010) เก็บบรรจุในถุงปิดสนิทไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพที่ 3.1 ผงเมล็ดหว้า

3.2.2 การสกัดเมล็ดหว้า

3.2.2.1 การสกัดสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากเมล็ดหว้าด้วยวิธีต่างๆ

นำผงเมล็ดหว้าและตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 ในอัตราส่วนเท่ากับ 1 กรัม ต่อ 5 มิลลิลิตร (Acharyya และคณะ, 2009) มาสกัดด้วยวิธีต่างกัน 4 วิธี วิธีแรกใช้ไมโครเวฟช่วยในการสกัด (microwave assisted extraction; MAE) ที่ความยาวคลื่น 600 วัตต์ โดยให้ความร้อนเป็นรอบเวลา (cycle) รอบแรกเปิดเป็นเวลา 40 วินาที แล้วปิดเป็นเวลา 40 วินาที รอบต่อไปให้เปิดเป็นเวลา 10 วินาที ปิดเป็นเวลา 40 วินาที แล้วทำต่อจนครบ 5 รอบ ดังตารางที่ 3.1 โดยรอบสุดท้ายเมื่อให้ความร้อนแล้วนำไปทำให้เย็น (Gupta และคณะ, 2009) วิธีที่ 2 ใช้คลื่นอัลตราโซนิคช่วยในการสกัด (ultrasonic assisted extraction; UAE) โดยใช้อ่างอัตราโซนิคซึ่งมีความถี่เท่ากับ 37 กิโลเฮิรตซ์ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (Chen และคณะ, 2011) วิธีที่ 3 สกัดด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อวินาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (shaker at 80 ;HT) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และวิธีสุดท้ายสกัดด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อวินาที (rpm) ที่อุณหภูมิห้อง (shaker at room temperature; RT) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (เพ็ญวิภา บัลลังโพธิ์, 2556) หลังจากสกัดด้วยวิธีต่างๆ ดังกล่าว นำตัวอย่างที่ได้มาเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกกากที่ความเร็ว 3500 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 15 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 (Bermudez และคณะ, 2012) เพื่อแยกส่วนของแข็งและของเหลว โดยนำส่วนของเหลวที่ได้นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Duodu และ Sikwese, 2007) ได้สารสกัดหยาบ นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อในอัตราส่วน 1 กรัม ต่อ 5 มิลลิลิตร แล้วจึงนำสารสกัดหยาบที่ละลายน้ำแล้วมาตรวจวิเคราะห์ค่าต่างๆ

ตารางที่ 3.1 การให้ความร้อนเป็นรอบเวลา (cycle) ในการใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด

	รอบเวลา (cycle)				
	1	2	3	4	5
เปิด (วินาที)	40	10	10	10	10
ปิด (วินาที)	40	40	40	40	-

3.2.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

3.2.3.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content; TPC)

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดหรือค่า TPC (total phenolic content) ด้วยวิธี โฟลิน-ซิโอแคลทู (Folin-Ciocalteu) ตามวิธีของ Damianova E. และคณะ (2013) โดยปิเปตสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ตามด้วยสารละลายโฟลิน-ซิโอแคลทู ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องผสมสาร แล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 1.4 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร รายงานผลการทดลองเป็นค่าสมมูลมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า 1 กรัม (mg GAE/g dried extract) โดยคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกจากภาคผนวก ก วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (Cochran และ Cox, 1992)

3.2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid content; TFC)

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดหรือค่า TFC (total flavonoid content) ด้วยวิธีอะลูมิเนียมคลอไรด์ คัลเลอริเมทริก (aluminum chloride colorimetric method) ตามวิธีของ Chang และคณะ (2002) โดยปิเปตสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร สารละลายโพแทสเซียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร รายงานผลการทดลองเป็นค่าสมมูลมิลลิกรัมของเควอซิทินต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า 1 กรัม (mg QE /g dried extract) โดยคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานเควอร์ซิทินจากภาคผนวก ก

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราห์ความแตกต่างทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (Cochran และ Cox, 1992)

3.2.3.3 ปริมาณสารสกัดแห้ง

สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าเมื่อระเหยเอาตัวทำละลายออกแล้ว นำมาชั่งเพื่อบันทึกน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า แล้วนำมาคำนวณดังนี้

น้ำหนักของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าแห้ง (กรัม) × 100/น้ำหนักผงเมล็ดหว้า (กรัม) โดยรายงานเป็นหน่วย ร้อยละ (%) (Gao และ Liu, 2005)

3.2.3.4 การตรวจวิเคราะห์ HPLC (High-performance liquid chromatography)

ส่งตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (Dukić และคณะ, 2011) ดังนี้

เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)	A = เมทานอล (methanol)
	B = กรดฟอร์มิกความเข้มข้นร้อยละ 1 (formic 1%)
เกรเดียนท์ (gradient)	0-10 นาที = A ร้อยละ 10
	10-25 นาที = A ร้อยละ 10-20%
	25-30 นาที = A ร้อยละ 20-30%
	30-45 นาที = A ร้อยละ 60-70%
อัตราการไหล (flow rate)	1 มิลลิลิตรต่อนาที
เตาอบ (oven)	30 องศาเซลเซียส
คอลัมน์ (column)	Eslip XDB-C18 (4.6x50 มิลลิเมตร)
ตัวตรวจวัดสัญญาน (detector)	DAD
	ใช้ความยาวคลื่นที่ 280 นาโนเมตร สำหรับกรดแกลลิก
	ใช้ความยาวคลื่นที่ 330 นาโนเมตร สำหรับเควอซิทิน, กรดเฟอรูลิก และกรดคลอโรจีนิก
ปริมาณสารตัวอย่าง (sample)	10 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
สารมาตรฐาน	กรดแกลลิก, เควอซิทิน, กรดเฟอรูลิก และกรดคลอโรจีนิก

3.2.4 การตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย

3.2.4.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมแบคทีเรียทั้ง *S. aureus*, *S.* Typhimurium และ *E. coli* โดยถ่ายเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร MHB บ่มสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18±2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากแบคทีเรีย แล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 ที่ผ่านการ ฆ่าเชื้อ จำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้นปรับค่าความขุ่นด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 ให้มีค่าประมาณ 0.08-0.13 ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร จะได้จำนวนเชื้อแบคทีเรียประมาณ 8 log CFU/ml (CLSI, 2006) นำไปเจือจาง 100 เท่าด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 % w/v เพื่อให้ได้จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ของจุลินทรีย์ประมาณ 6 log CFU/ml

3.2.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ด้วยวิธีดีสก์ ดิฟฟิวชัน (disc diffusion method; DDM)

ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ด้วยวิธีดีสก์ ดิฟฟิวชัน (disc diffusion method; DDM) ดัดแปลงจาก Chandrasekaran และ

Venkatesalu (2004) เขียนระบุตำแหน่งของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ด้านล่างของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate) หลังจากนั้นปิเปตสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA เกลี่ยให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเทคนิคสเปรดเพลท (spread plate) ทิ้งไว้ให้ส่วนของผิวหน้าอาหารแห้ง แล้วจึงปิเปตสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ใส่ลงบนแผ่นกระดาษกรองปลอดเชื้อ (sterile paper disc) เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามตำแหน่งที่ระบุไว้ โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร เป็นชุดควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์เจริญหรือโซนใส (inhibition zone) ด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์รายงานเป็นหน่วย มิลลิเมตร (mm)

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราห์ความแตกต่างทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (Cochran และ Cox, 1992)

3.2.4.3 การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากเมล็ดหว้าที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ หรือค่า MIC (minimum inhibitory concentration)

นำสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่ได้จากการสกัดทุกวิธีมาทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หรือค่า MIC (minimum Inhibitory concentration) กับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธีมาโครบรอทไดลูชัน(macro broth dilution technique) ตามวิธีของ CLSI (2006) ดังนี้

เตรียมหลอดทดลอง 12 หลอด โดยหลอดที่ 1 ไม่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดที่ 2 ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ความเข้มข้น 4 เท่า และหลอดต่อไปใส่อาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้น 2 เท่าถึงหลอดที่ 11 ส่วนในหลอดที่ 12 ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นปกติหรือความเข้มข้น 1 เท่าเป็นชุดควบคุมเชิงลบ โดยทุกหลอดทดลองมีปริมาตร 1 มิลลิลิตร

หลังจากนั้นปิเปตสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ 1 และหลอดที่ 2 ดังนั้น ในหลอดทดลองที่ 1 ไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่จึงมีความเข้มข้นของสารเท่าเดิมปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมเชิงบวก แต่ในหลอดที่ 2 มีอาหารเลี้ยงเชื้อรวมกับสารสกัดหยาบ ดังนั้นความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบลดลงครึ่งหนึ่ง มีปริมาตรรวมเท่ากับ 2 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร หลังจากนั้นจึงปิเปตหลอดที่ 2 ลงในหลอดที่ 3 ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และทำต่อถึงหลอดที่ 11 โดยในหลอดที่ 11 ปิเปตทิ้ง 1 มิลลิลิตร เพื่อให้มีปริมาตรเท่ากับ 1 มิลลิลิตรทุกหลอดทดลอง ดังนั้น ทุกหลอดทดลองยกเว้นหลอดควบคุมเชิงบวกและลบมีความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบเป็น 2 เท่าก่อนเติมเชื้อแบคทีเรียลงไป หลังจากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมตามขั้นตอนที่ 3.2.4.1 ลงในหลอดทดลองทุกหลอด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ดังนั้นปริมาตรสุดท้ายในหลอดทดลองทุกหลอดเท่ากับ 2 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อและสารสกัดหยาบแสดงดังตารางที่ 3.2 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รายงานค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการทดสอบที่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่นเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้หรือค่า MIC ในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml)

ตารางที่ 3.2 ความเข้มข้นของสารในหลอดทดลองเพื่อหาค่า MIC

หลอดที่	ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (เท่า)	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบรวมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิกรัมต่อมิลลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดหยาบหลังเติมเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	-	200	100
2	4	100	50.00
3	2	50.00	25.00
4	2	25.00	12.5
5	2	12.5	6.25
6	2	6.25	3.13
7	2	3.13	1.56
8	2	1.56	0.78
9	2	0.78	0.39
10	2	0.39	0.20
11	2	0.20	0.10
12	1	-	-

3.2.4.4 ทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ หรือค่า MBC (minimum bactericidal concentration)

ทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้หรือค่า MBC (minimum bactericidal concentration) กับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารทั้ง 3 ชนิด โดยปิเปตสารในหลอดที่ยังใสแต่ละหลอดในข้อ 3.2.4.1 ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA เกลี่ยให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเทคนิคสเปรดเพลท (spread plate) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยพิจารณาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบที่ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้หรือค่า MBC รายงานในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml) (CLSI, 2006)

3.2.5 การทดสอบสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติกและกรดแลกติกในการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย

3.2.5.1 ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด (MBC) ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า กรดแอซีติก และ กรดแลกติก

ทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หรือค่า MIC (minimum inhibitory concentration) และทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้หรือค่า MBC (minimum bactericidal concentration) ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) กรดแลกติก (L) กรดแอซีติก (A) กับเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารทั้ง 3 ชนิดเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 3.2.4.

3.2.5.2 การลดจำนวนแบคทีเรียด้วยสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า กรดแอซีติก กรดแลกติก สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติก และสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแลกติก

การทดสอบการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า กรดแอซีติก กรดแลกติก สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติกและสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแลกติก ดัดแปลงจาก Afolayan และ Olajuyigbe (2012) เตรียมขวดรูปชมพู่ 6 ขวด แต่ละขวดมีอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ความเข้มข้นเป็น 4 เท่า ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วผสมกับสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) ในขวดแรก กรดแอซีติก (A) ในขวดที่สอง กรดแลกติก (L) ในขวดที่สาม สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติก (EA) ในขวดที่สี่ สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแลกติก (EL) ขวดที่ห้า และขวดสุดท้ายผสมน้ำกลั่น (DI) โดยแต่ละขวดใส่สารที่ทดสอบความเข้มข้นเท่ากับ 4 MBC ยกเว้นน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร รวมทั้งวัดค่า pH ของสารต่างๆ ด้วย หลังผสมความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าและอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB จะถูกลดลงครึ่งหนึ่ง โดยมีความเข้มข้นเท่ากับ 2 MBC และอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB มีความเข้มข้นเท่ากับ 2 เท่า มีปริมาตรรวมเท่ากับ 10 มิลลิลิตร แล้วเติมเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมตามขั้นตอนที่ 3.2.4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลังเติมเชื้อแบคทีเรียอาหารเลี้ยงเชื้อและสารจะถูกลดลงอีกครึ่งหนึ่ง ดังนั้นสารจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 1 MBC แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส วิเคราะห์จำนวนเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคซีเรียลไดลูชั่น โดยปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร แล้วเจือจางต่อจนเหมาะสม หลังจากนั้นปิเปตสารในหลอดทดลองปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA เกลี่ยให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิคสเปรดเพลท (spread plate) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวิเคราะห์จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เวลา 0, 3, 6, 9 ชั่วโมง นำผลที่ได้สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและจำนวนแบคทีเรีย (log CFU/ml)

วางแผนการทดลองแบบ RCBD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (Cochran และ Cox, 1992)

3.2.6 การใช้สารสกัดหยาบจากเมล็ดหว้า กรดอินทรีย์ และสารสกัดหยาบร่วมกับกรดอินทรีย์เพื่อลดจำนวนของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด และ แบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในสะระแหน่

จัดสิ่งทดลองแบบ Mixture design โดยแปร 2 ตัวแปร ได้แก่ ความเข้มข้นสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า และความเข้มข้นกรดแอซีติก โดยมีความเข้มข้นรวมกันเท่ากับ 1 MBC หรือ ความเข้มข้นทั้งสองตัวแปรรวมกันเท่ากับร้อยละ 100 ใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงจำนวนสิ่งทดลองของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าและกรดแอซีติกแบบ mixture design

สิ่งทดลอง	ความเข้มข้นของกรดแอซีติก (ตัวแปรที่ 1)		ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (ตัวแปรที่ 2)	
	MBC	ร้อยละ	MBC	ร้อยละ
1	1	100	0	0
2	0.5	50	0.5	50
3	0.25	25	0.75	75
4	0.125	12.5	0.875	87.5
5	0	0	1	100
ควบคุม (น้ำกลั่น)	0	0	0	0

นำสะระแหน่แบ่งออกส่วนหนึ่งเพื่อวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น และแบ่งออกอีกเป็น 6 ส่วน โดยส่วนที่ 1 นำมาแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (DI) ส่วนที่ 2 นำมาแช่สารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) ความเข้มข้นเท่ากับค่าเท่ากับ 1 MBC ส่วนที่ 3 แช่กรดอินทรีย์ (A) ความเข้มข้นเท่ากับค่าเท่ากับ 1 MBC ส่วนที่ 4 แช่ในสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้นเท่ากับค่าเท่ากับ 0.5 MBC ร่วมกับกรดอินทรีย์ ความเข้มข้นเท่ากับค่าเท่ากับ 0.5 MBC (EA1) ส่วนที่ 5 แช่ในสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้นเท่ากับค่าเท่ากับ 0.75 MBC ร่วมกับกรดอินทรีย์ความเข้มข้นเท่ากับค่าเท่ากับ 0.25 MBC (EA2) และส่วนสุดท้ายแช่ในสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้นเท่ากับค่าเท่ากับ 0.875 MBC ร่วมกับกรดอินทรีย์ความเข้มข้นเท่ากับค่าเท่ากับ 0.125 MBC (EA3) โดยแต่ละส่วนมีอัตราส่วนของสะระแหน่ (กรัม) ต่อสารละลาย (มิลิลิตร) เท่ากับ 1:20 แช่เป็นเวลา 10 นาที (เพ็ญวิภา บัลลังโพธิ์, 2556) สะเด็ดน้ำให้แห้งบนตะแกรงที่ปลอดเชื้อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 30 นาที (วราภา มหากาญจนกุล และคณะ, 2544) แบ่งใส่ถุงที่มีรูด้านละ 6 รู ถุงละ 25 กรัม เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส

โดยนำสะระแหน่มาตรวจวิเคราะห์หลังการแช่ และวันที่ 1, 3, 6, 9, 12 โดยนำตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ถุงตีตัวอย่าง (stomacher bag) เติมสารละลายเปปโตนวอเตอร์ 225 มิลลิลิตร บดผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องตีตัวอย่างที่อัตราเร็วสูงสุดเป็นเวลา 2 นาที ทำการเจือจางด้วยเทคนิคซีเรียลไดลูชันก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณการปนเปื้อนของแบคทีเรียทั้งหมด (TBC) ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA บ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตรีอุบล แก้วหย่อง และบวรศักดิ์ ลีนานนท์, 2553) ตรวจแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *E. coli* ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ EC compack dry ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงตรวจนับโคโลนีสีน้ำเงิน (AOAC Research Institute, 2013) และตรวจวิเคราะห์หาค่าการช้ำของสะระแหน่ ตามวิธี Cao และคณะ (2014) โดยใช้เกณฑ์กำหนดระดับความช้ำ (ภาพที่ 3.2) ดังต่อไปนี้

0 = ผักมีลักษณะสด ไม่มีการช้ำ (คุณภาพดี)
1 = ผักมีจุดช้ำบนใบพื้นที่ไม่เกิน 10% ของใบ
2 = ผักมีจุดช้ำบนใบพื้นที่ไม่เกิน 10-30% ของใบ
3 = ผักมีจุดช้ำบนใบพื้นที่ไม่เกิน 30-50% ของใบ
4 = ผักมีจุดช้ำบนใบพื้นที่เกิน 50% ของใบ

แล้วคำนวณโดย ∑(ระดับการช้ำ×จำนวนใบที่มีการช้ำ)/จำนวนใบทั้งหมด

วางแผนการทดลองแบบ RCBD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราห์ความแตกต่างทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (Cochran และ Cox, 1992)

(ก) (ข) (ค) (ง) (จ)

ภาพที่ 3.2 ระดับการช้ำของใบสะระแหน่ (ก) ระดับที่ 0 (ข) ระดับที่1 (ค) ระดับที่ 2 (ง) ระดับที่ 3 และ (จ) ระดับที่ 4

3.2.7 อายุการเก็บของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีแตกต่างกัน

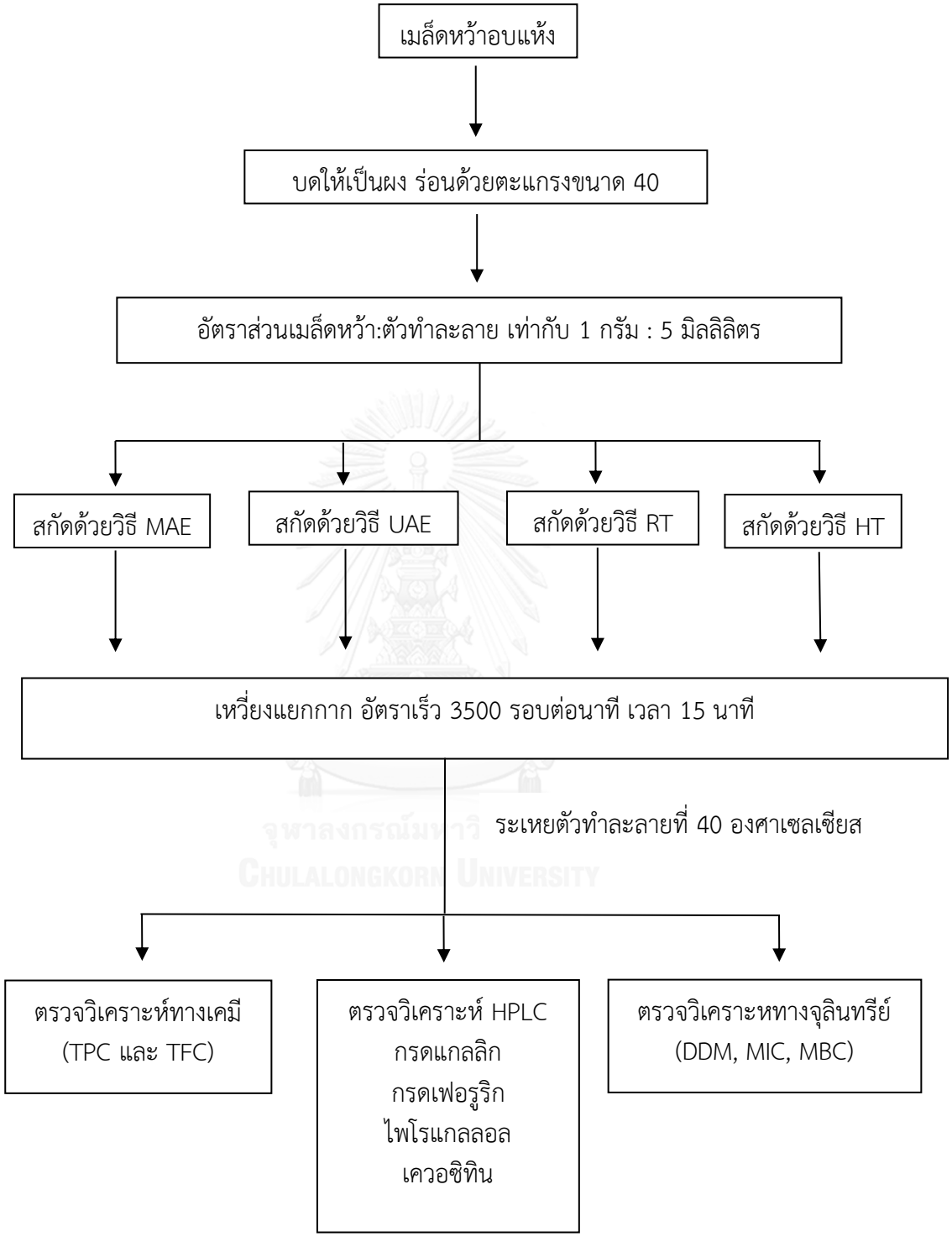
เตรียมสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธี MAE, UAE, RT และ HT ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 6 MBC ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บรักษาสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าในขวดสีชาปิดสนิทขนาด 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธีเดียวกับข้อที่ 3.2.2 และตรวจหาวิเคราะห์หาค่า MIC และ MBC ด้วยวิธีเดียวกับข้อที่ 3.2.4.3-3.2.4.4 ทุกเดือน เป็นเวลา 8 เดือน วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการ

ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (Cochran และ Cox, 1992)

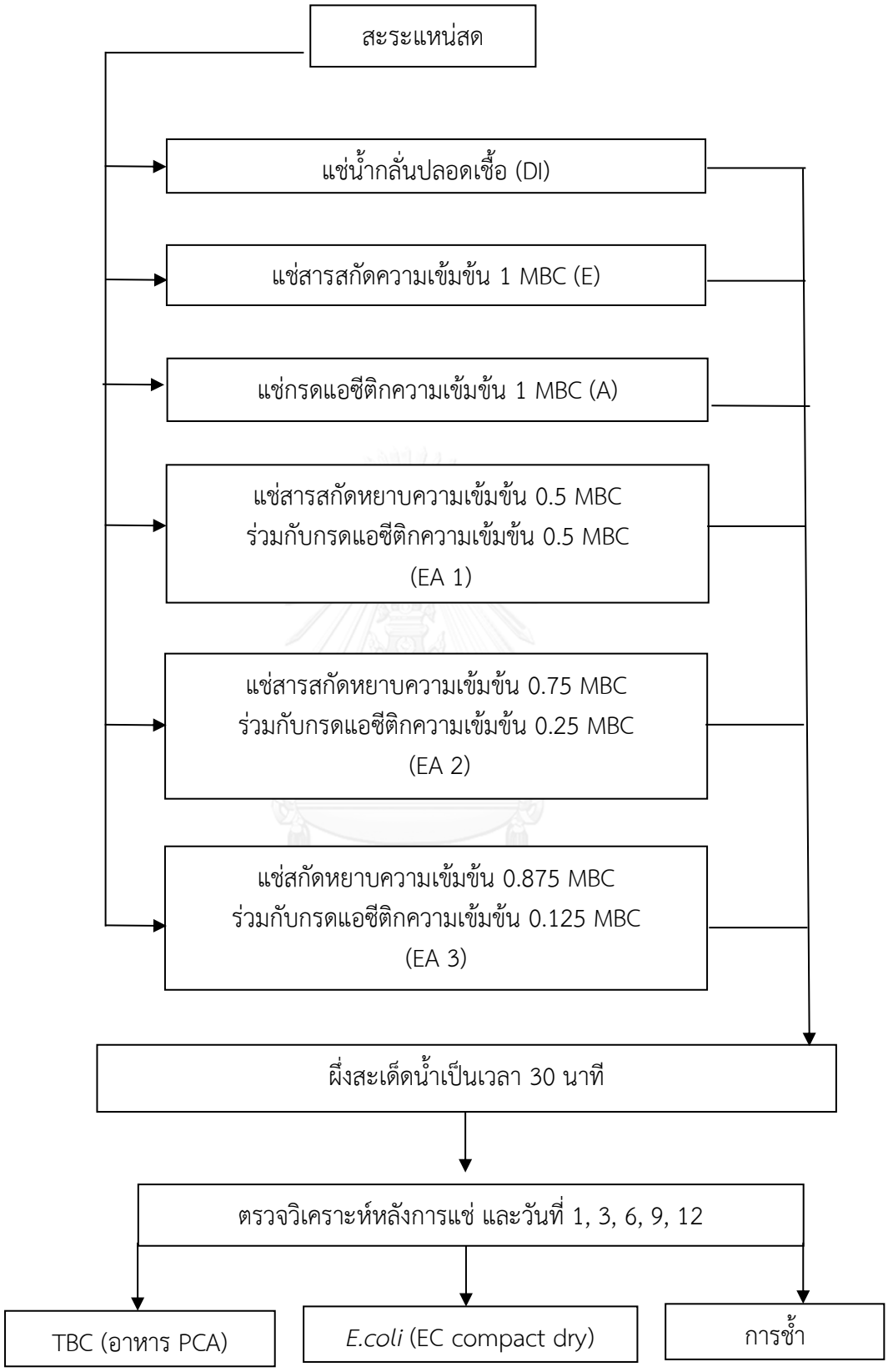
3.2.8 อายุการเก็บของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า และสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติก

แบ่งขวดสีชาออกเป็น 2 ขวด ขวดแรก ละลายสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีเหมาะสมในขั้นตอนที่ 3.2.2 ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 6 MBC (E) ขวดที่ 2 เตรียมสารละลายผสมระหว่างกรดแอซีติกความเข้มข้นเท่ากับ 3 MBC และสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้นเท่ากับ 3 MBC (EA) โดยเก็บสารละลายทั้ง 2 ชนิด ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดสีชาปิดสนิทขนาด 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธีเดียวกับข้อที่ 3.2.3 ตรวจหาค่าทางจุลินทรีย์ได้แก่ค่า MIC และ MBC ด้วยวิธีเดียวกับข้อที่ 3.2.4.3-3.2.4.4 ทุกเดือน เป็นเวลา 5 เดือน วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (Cochran และ Cox, 1992)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 3.3 แผนผังแสดงสรุปการสกัดเมล็ดหว้าด้วยวิธีต่างๆ



ภาพที่ 3.4 แผนผังแสดงสรุปการแช่สะระแหน่ด้วยสารต่างๆ

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1. ความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ

ผงเมล็ดหว้าถูกนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 โดยใช้วิธีการสกัดต่างๆ ได้แก่ การสกัดด้วยการใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด (MAE) การสกัดด้วยการใช้คลื่นอัตราโซนิคช่วยในการสกัด (UAE) การสกัดด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (RT) และที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (HT) หลังจากแยกส่วนของแข็งออกแล้วนำไประเหยตัวทำละลายเพื่อวัดปริมาณสารสกัดแห้งที่ได้ พบว่าการสกัดด้วยวิธี MAE ให้ปริมาณสารสกัดแห้งสูงสุด เท่ากับ 17.40 ± 0.69% ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) กับการสกัดด้วยวิธี UAE RT และ HT ผลแสดงดังตารางที่ 4.1 ผลดังกล่าวสอดคล้องกับ Gao และ Liu (2005) ได้รายงานว่าการสกัดด้วยวิธี MAE ได้ปริมาณสารสกัดแห้งมากกว่าวิธี UAE HT และ RT แต่การสกัดด้วยวิธี MAE มีการทำลายเซลล์ตัวอย่างทำให้เกิดการปลดปล่อยสารต่างๆ ที่ละลายได้รวมทั้งสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ออกมามากกว่าการสกัดด้วยวิธีอื่นๆ (Orsat และ Routray, 2012)

ตารางที่ 4.1 อิทธิพลของวิธีการสกัดต่อปริมาณสารสกัดแห้ง (%) ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า

วิธีการสกัด	ปริมาณสารสกัดแห้ง (ร้อยละโดยน้ำหนักของสารสกัดหยาบแห้งต่อผงเมล็ดหว้า)
MAE	17.40 ± 0.69[a]
UAE	16.28 ± 0.19[b]
RT	16.22 ± 0.45[b]
HT	16.27 ± 0.51[b]

หมายเหตุ a-b หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวตั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.05)

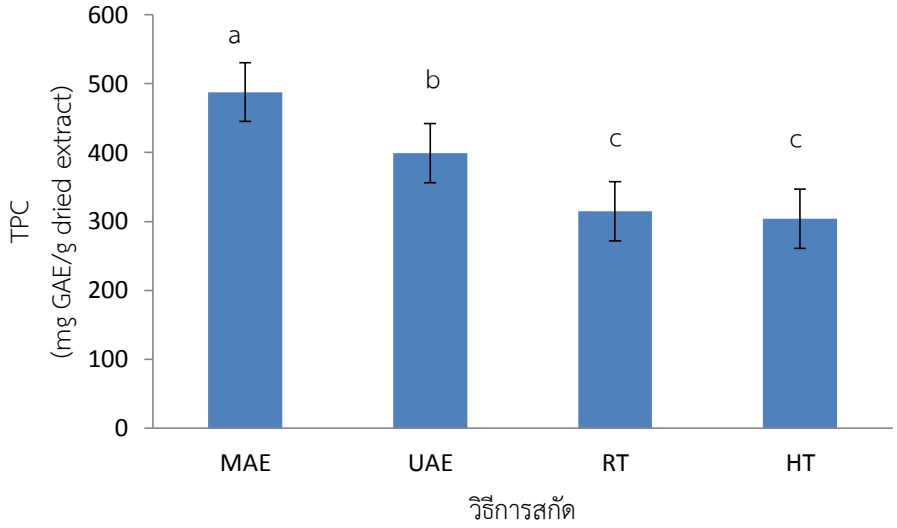
เมื่อนำสารสกัดแห้งที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีต่างๆ มาละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพื่อวัดความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ พบว่าการสกัดทุกวิธีให้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่มีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากเมล็ดหว้าแตกต่างกัน โดยการสกัดด้วยวิธี RT เป็นการใช้แรงเขย่าทำให้ตัวทำละลายการแพร่เข้าสู่เซลล์ แล้วละลายเอาสารต่างๆ รวมทั้งสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ออกมาได้ (Chemat และ Cravotto, 2013) การสกัดด้วยวิธีนี้ให้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่มีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TPC และ TFC) เท่ากับ 304.06±10.17 mg GAE/g dried extract และ 14.59±0.90 mg QE/g dried extract ตามลำดับ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการเขย่าเท่ากับ 80 องศาเซลเซียส (HT) โดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเป็นตัวกลางในการให้ความร้อน พบว่ามีค่า TPC และ TFC ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) กับการสกัดด้วยวิธี RT โดยมีค่า TPC เท่ากับ 314.89±40.12 mg GAE/g dried extract

และมีค่า TFC เท่ากับ 14.44±1.10 mg QE/g dried extract ตามลำดับ สาเหตุที่การสกัดทั้งสองวิธีได้สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่ไม่แตกต่างนั้นไม่ชัดเจน เนื่องจากมีการรายงานว่าการเพิ่มอุณหภูมิทำให้เกิดการถ่ายเทมวลของสารออกมาได้มากขึ้นจึงสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้มากขึ้น แต่การเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นถึง 80 องศาเซลเซียส เกิดการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดที่ไม่ทนความร้อนได้ (Akowuah และคณะ, 2009) จึงอาจเป็นไปได้ว่าการสกัดด้วยวิธีนี้ทำให้ตัวอย่างได้รับความร้อนที่สูงและนานเกินไป ทำให้เกิดการสลายของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์บางชนิดที่ไม่ทนความร้อนเกิดขึ้น (Himanshu และคณะ, 2015) ดังนั้นความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จึงไม่ต่างจากการสกัดด้วยวิธี HT จึงไม่แตกต่างกับ RT

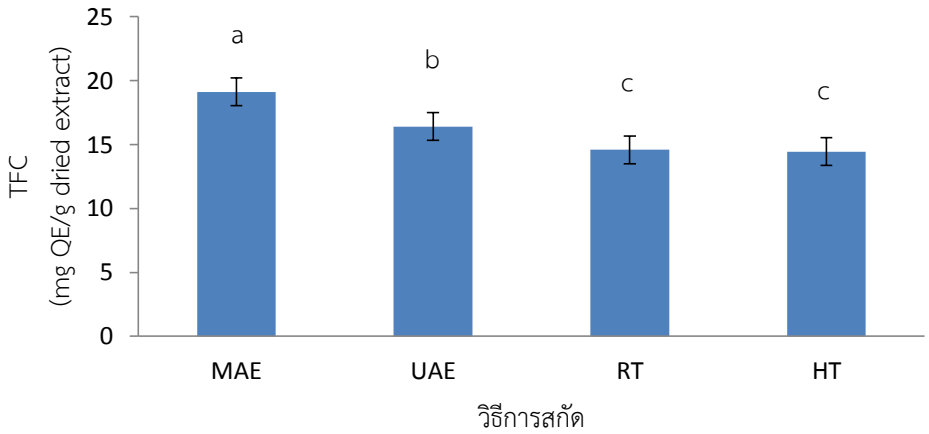
สกัดสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ได้ความเข้มข้นที่สูงขึ้นเมื่อใช้วิธี UAE ในการสกัด เนื่องจากคลื่นอัตราโซนิคที่ใช้จะช่วยให้ตัวทำละลายสกัดสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ได้มากขึ้นจากการเกิดปรากฏการณ์คาวิเตชั่น (cavitation) โดยทำให้ตัวทำละลายเกิดคลื่นกระแทกซึ่งมีความแรงมากจึงมีการถ่ายเทมวลสารเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการชะสารต่างๆ ออกจากเซลล์พืชได้มากขึ้น (Vinatoru, 2001) การสกัดด้วยวิธีนี้จึงได้ TPC และTFC มากกว่า RT และ HT โดยมีค่า TPC และ TFC เท่ากับ 399.22±29.87 mg GAE/g dried extract และ 16.40±1.84 mg QE/g dried extract

ส่วนการสกัดด้วยวิธี MAE ได้ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มากที่สุด เนื่องจากคลื่นไมโครเวฟทำให้เซลล์ฉีกขาด สารต่างๆ รวมทั้งสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่อยู่ภายในเซลล์จึงถูกปลดปล่อยออกมากับตัวทำละลายเอทานอลที่ใช้สกัด (Ince และคณะ, 2014) ได้มากกว่าวิธีอื่น ดังนั้นการสกัดด้วยวิธี MAE จึงสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ได้มากสุด โดยมีค่า TPC และ TFC เท่ากับ 487.71± 30.15 mg GAE/g dried extract และ 19.12±1.23 mg QE/g dried extract ตามลำดับ อิทธิพลของวิธีการสกัดต่อความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์แสดงดังภาพที่ 4.1 และ 4.2

ผลที่ได้สอดคล้องกับ Annegowda และคณะ (2012) ได้รายงานว่า การใช้วิธี UAE และ RT การสกัดใบ *Bauhinia purpurea* ด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่าการสกัดด้วยวิธี UAE ได้ค่า TPC และ TFC มากกว่าการสกัดด้วยวิธี RT และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Gao และ Liu, 2005) ซึ่งได้รายงานการสกัด *Saussurea medusa* Maxim แห้งด้วยเอทานอล โดยใช้วิธีต่างๆ ได้แก่ MAE UAE และ RT พบว่าการสกัดด้วยวิธี MAE ได้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุด ตามด้วยการสกัดด้วยวิธี UAE และการสกัดด้วยวิธี RT ตามลำดับ



ภาพที่ 4.1 อิทธิพลของวิธีการสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด (MAE) การใช้คลื่นอัตราโซนิคช่วยในการสกัด (UAE) การสกัดด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (RT) และที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (HT) ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC)



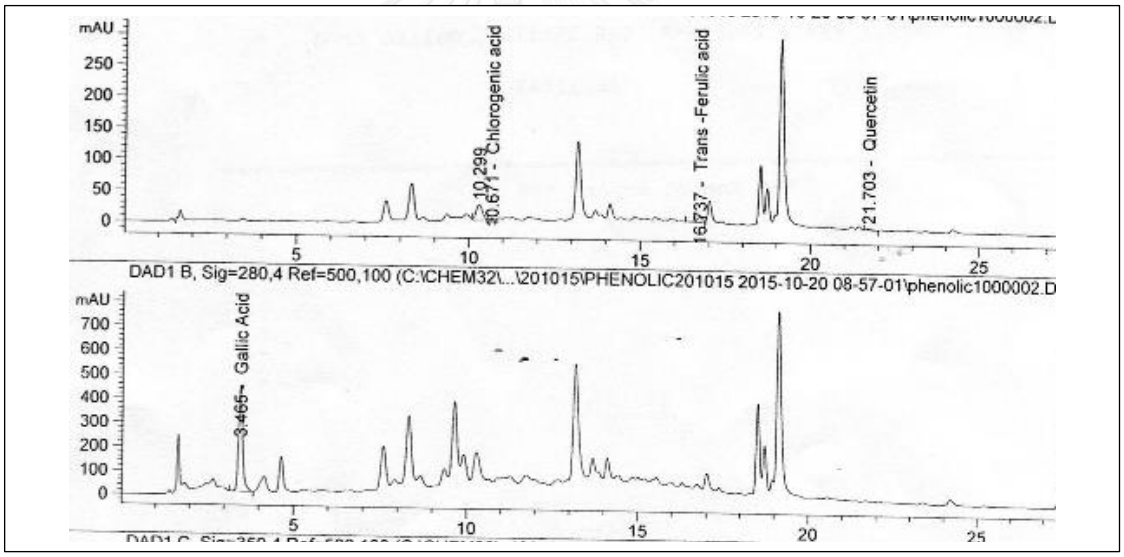
ภาพที่ 4.2 อิทธิพลของวิธีการสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด (MAE) การใช้คลื่นอัตราโซนิคช่วยในการสกัด (UAE) การสกัดด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (RT) และที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (HT) ต่อปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC)

สารสกัดจากเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ซึ่งมีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ต่างกัน ถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC เพื่อหาชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ พบว่าสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดจากทุกวิธีตรวจพบสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในกลุ่มกรดฟีนอลิก ได้แก่ กรดแกลลิกสูงสุดเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน ตามด้วยกรดคลอโรจินิก กรดเฟอร์รูลิก ตามลำดับ โดยพบเควอซิทิน ซึ่งอยู่ในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ปริมาณต่ำสุด แสดงให้เห็นว่ากรดแกลลิกเป็นสารประกอบฟีนอลิกชนิดหนึ่งที่พบมากในสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า ผลที่ได้สอดคล้องกับ Kothari และคณะ (2011) ได้รายงานว่ากรดแกลลิกเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากในสารสกัดหยาบจากเมล็ดหว้า โดย Abdalla และคณะ (2011) ได้รายงานว่าสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธี reflux โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายพบว่ามีกรดแกลลิกเท่ากับ 2.63% และมีกรดคลอโรจินิกเท่ากับ 0.057% โดยปริมาณกรดแกลลิกที่รายงานสูงกว่าการสกัดด้วยวิธี RT และ HT แต่น้อยกว่าการสกัดด้วยวิธี MAE และ UAE อาจเป็นผลจากวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน โดยการสกัดด้วยวิธี reflux สามารถสกัดได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยวิธี RT และ HT แต่วิธีดังกล่าวสามารถสกัดได้น้อยกว่า MAE และ UAE (Gao และ Liu, 2005) อย่างไรก็ตามพบว่ากรดคลอโรจินิกของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่ได้มีค่าต่ำกว่าการสกัดด้วยวิธี reflux อาจเป็นผลจากตัวอย่างเมล็ดหว้าที่นำมาสกัดนั้นมาจากช่วงระยะเวลาการเก็บเกี่ยวที่ต่างกันทำให้มีองค์ประกอบต่างกัน (Ahmad และคณะ, 2012) นอกจากนั้นสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดต่างกันทั้ง 4 วิธีพบว่ากรดเฟอรูลิกมีปริมาณน้อยกว่า Shah และคณะ (2012) ซึ่งได้รายงานว่าสกัดเมล็ดหว้ามีกรดเฟอรูลิกเท่ากับ 1.27% เมื่อใช้เมทานอลในการสกัด อาจเป็นเพราะตัวทำละลายเมทานอลสามารถสกัดได้มากกว่าการใช้ตัวทำละลายเอทานอล (Ahmad และคณะ, 2012)

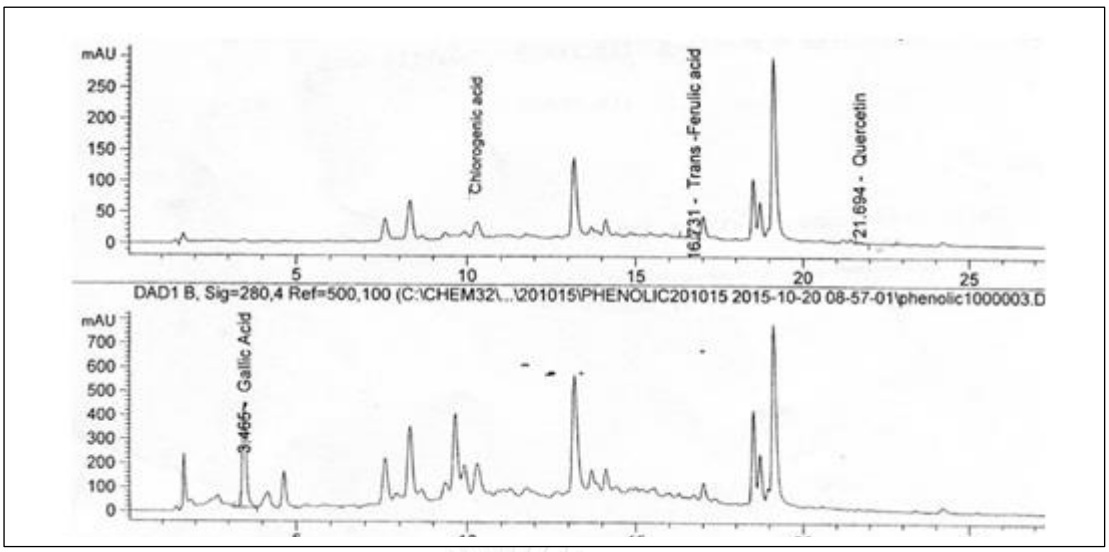
เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆพบว่า การสกัดด้วยวิธี MAE และ UAE พบในปริมาณมากกว่าสารสกัดที่สกัดอีก 2 วิธี ยกเว้น กรดคลอโรจินิก ซึ่งตรวจพบในสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดจากทุกวิธีปริมาณไม่ต่างกัน ผลดังกล่าวสอดคล้องกับค่า TPC และ TFC ที่สกัดด้วยวิธี MAE และ UAE ซึ่งมีค่าสูงกว่าสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธี RT และ HT อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาโครมาโตรแกรมของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ จะเห็นว่ายังมีสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์อื่นๆ อีก ดังนั้นสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธี MAE ซึ่งมีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มากกว่าสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าจากวิธี UAE แต่ตรวจพบกรดแกลลิก กรดเฟอรูลิก กรดคลอโรจินิก และเควอซิทินปริมาณไม่ต่างกัน อาจเพราะการสกัดด้วยวิธี MAE สกัดสารประกอบฟีนอลิกอื่น ๆ นอกจากกรดแกลลิก กรดเฟอรูลิก และเควอซิทินได้อีก ทำให้ได้ค่า TPC และ TFC มากกว่าการสกัดด้วยวิธี UAE ผลแสดงดังตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.3-4.6

ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแกลลิก กรดเฟอรูริก กรดคลอโรจินิก และเควอซิทิน ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ด้วยเครื่อง HPLC

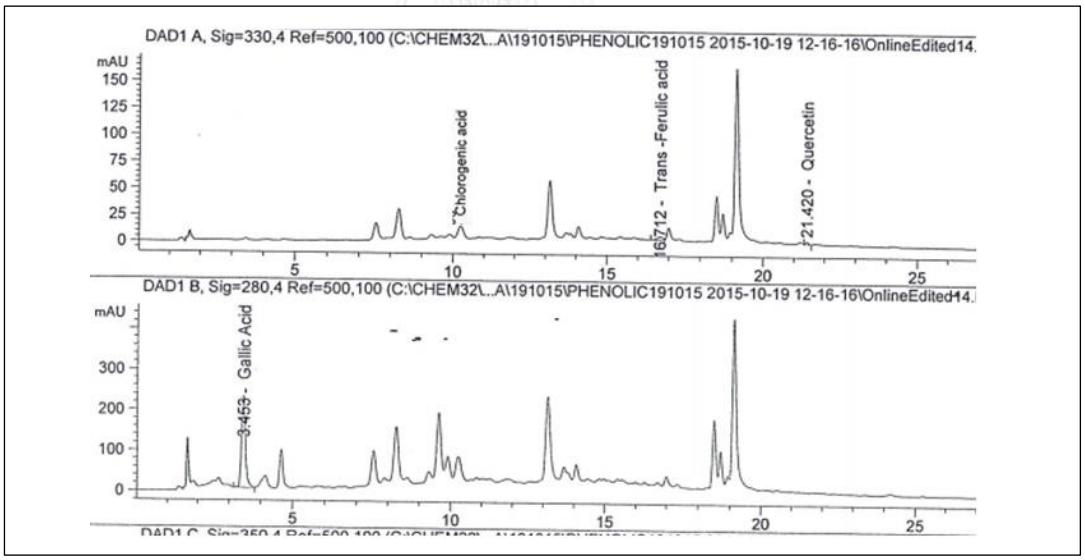
วิธีการสกัด	กรดแกลลิก (%)	กรดเฟอรูลิก (%)	กรดคลอโรจินิก (%)	เควอซิทิน (%)
MAE	3.18	0.076	0.12	0.04
UAE	3.38	0.079	0.12	0.04
RT	1.92	0.039	0.12	0.025
HT	1.93	0.038	0.12	0.021



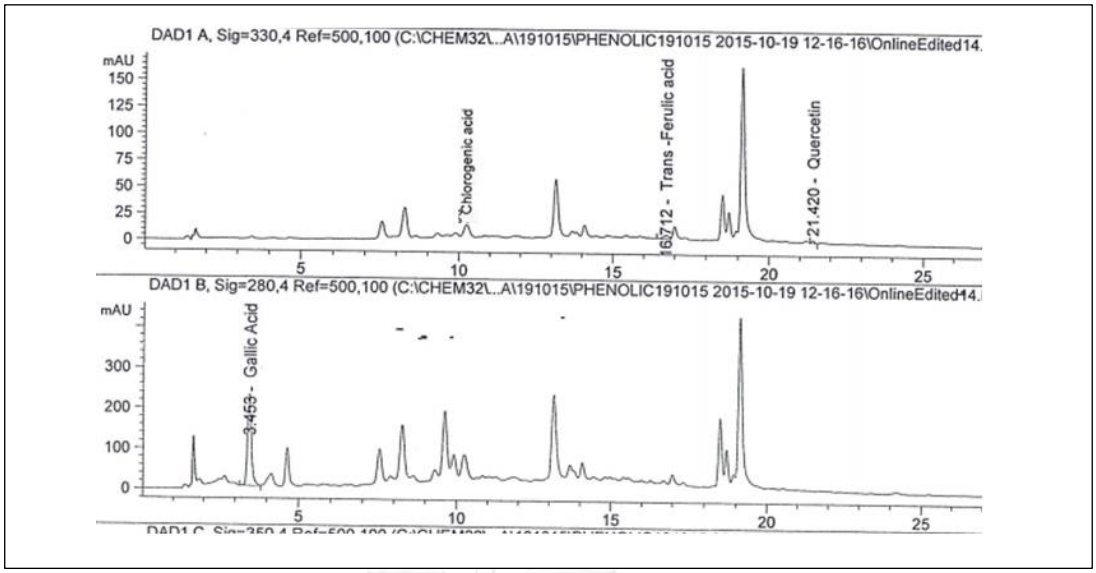
ภาพที่ 4.3 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่ใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด (MAE)



ภาพที่ 4.4 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่ใช้คลื่นอัตราโซนิคช่วยในการสกัด (UAE)



ภาพที่ 4.5 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยการแช่ที่อุณหภูมิห้อง (RT)



ภาพที่ 4.6 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ของตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (HT)

เมื่อทราบความเข้มข้น รวมทั้งชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าแล้ว นำสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่ได้จากการสกัดทุกวิธีความเข้มข้น 100 mg/ml มาทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี DDM ซึ่งเป็นการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หากขนาดของโซนใสใหญ่บ่งชี้ถึงฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ดี ในการทดลองนี้จะทดสอบสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ กับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ที่แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียแกรมบวกมีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นเดียว ส่วนแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (Borges และคณะ, 2013) พบว่าสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีแตกต่างกันทั้ง 4 วิธีมีโซนใสเกิดขึ้น เนื่องจากสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ มีสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ซึ่งสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก รวมทั้งยับยั้งเมทาบอลิซึมของเชื้อแบคทีเรียได้ จึงทำให้เชื้อแบคทีเรียถูกยับยั้งและทำลายในที่สุด ดังนั้นสารสกัดเมล็ดหว้าจึงมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ (Cushnie และ Lamb, 2005) แต่เส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่ได้ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) เมื่อทดสอบกับเชื้อ *S.* Typhimurium และ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โดยสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า ได้แก่ เควอซิทินมีการรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้มากสุด (0.125%) ตามด้วยกรดเฟอรูริก (1.1%) กรดแกลลิก (1.74%) คลอโรจินิกมากกว่า (4%) ตามลำดับ (Kabir และคณะ, 2014; Ma และคณะ, 2014) ซึ่งกรดแกลลิก กรดเฟอรูลิก กรดคลอโรจินิก และเควอซิทิน ที่พบในสารสกัดเมล็ดหว้าจากการสกัดทุกวิธีมีความเข้มข้นสูงกว่าปริมาณที่ของสารดังกล่าวที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อได้ อาจเป็นเพราะในสารสกัดหยาบมีสารอื่นๆอยู่รวมด้วยทำให้ต้องใช้สารความเข้มข้นสูงกว่าในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Khoddami และคณะ,

2013) นอกจากนั้นมีการรายงานว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตมากกว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด รวมทั้งเควอซิทินที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ดีนั้นเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ชนิดหนึ่งที่พบในสารสกัดเมล็ดหว้าแต่พบในสารสกัดที่สกัดด้วยวิธี MAR และ UAE สูงกว่าการสกัดด้วย RT และ HT อย่างไรก็ตามนอกจากเควอซิทินที่พบในสารสกัดเมล็ดหว้าแล้วยังมีสารประกอบฟลาโวนอยด์อื่นอีกทำให้ความเข้มข้นของสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่สกัดจากทุกวิธีมีความเข้มข้นไม่แตกต่างกันมาก (Kabir และคณะ, 2014) จากผลดังกล่าวจึงอาจทำให้ฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S.* Typhimurium และ *E. coli* ไม่แตกต่างกัน

ส่วนการทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก พบว่าการใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธี MAE และ UAE ทำให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าจากการสกัดทั้งสองวิธีให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสใหญ่กว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$) เมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธี RT และ HT แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้ามีผลต่อฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. aureus* เนื่องจากมีชั้นเพปทิโดไกลแคนหนาในโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ แต่ไม่มีเยื่อหุ้มชั้นนอกเหมือนแบคทีเรีย *S.* Typhimurium และ *E. coli* (Brown และคณะ, 2015) สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าจึงเข้าไปทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ดังนั้นสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธี MAE และ UAE ซึ่งมีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงกว่าการสกัดอีกสองวิธีจึงมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียมากกว่าทำให้ได้ขนาดโซนใสใหญ่กว่า อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธี MAE และ UAE มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ไม่แตกต่างกัน อาจเป็นผลจากปริมาณของกรดแกลลิก กรดเฟอรูลิก คลอโรจินิก และ เควอซิทินที่ไม่ต่างกันกับสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธี UAE ผลแสดงดังตารางที่ 4.3 ซึ่งสอดคล้องกับ Annegowda และคณะ (2012) ได้รายงานว่าสารสกัดหยาบจากใบ *Bauhinia Purpure* ที่สกัดด้วยวิธี UAE ได้ค่า TFC มากกว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยวิธี RT แต่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบไม่แตกต่างกัน แต่สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี UAE มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ดีกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยวิธี RT เมื่อทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก

นอกจากการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยวิธี DDM แล้วยังสามารถทดสอบจากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหรือค่า MIC และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียหรือค่า MBC ซึ่งเป็นอีกค่าหนึ่งที่บ่งชี้ถึงฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย หากมีค่าดังกล่าวต่ำแสดงว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดี เนื่องจากใช้ความเข้มข้นต่ำในการยับยั้งและทำลายเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 4.3 ฤทธิต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (100 mg/ml) ที่ตรวจวัดด้วยวิธี disc difusion method (DDM)

แบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส (mm)			
	MAE	UAE	RT	HT
S. Typhimurium ^{ns}	9.75±0.23	9.60±0.27	9.47±0.32	9.43±0.37
E. coli ^{ns}	9.70±0.29	9.69±0.27	9.50±0.33	9.46±0.33
S. aureus	13.06±0.72^{a}	12.87±0.89^{a}	11.67±0.21^{b}	11.06±0.45^{b}

หมายเหตุ a-b หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวนอนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ns หมายถึง ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ในการทดลองหาค่า MIC และ MBC พบว่ามีผลเช่นเดียวกับการทดสอบด้วยวิธี DDM เมื่อทดสอบสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าจากการสกัดทุกวิธีกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* และ *S.* Typhimurium มีค่า MIC และ MBC ไม่ต่างกัน โดยมีค่าเท่ากับ 3.13 และ 6.25 mg/ml ตามลำดับ ส่วนการทดสอบสารสกัดหยาบเมล็ดหว้ากับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยวิธี MAE และ UAE ซึ่งมีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มากกว่าสารสกัดหยาบจากการสกัดอีกสองวิธี จึงใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.39 และ 0.78 mg/ml ตามลำดับ) ต่ำกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยวิธี RT และ HT (ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.78 และ 1.56 mg/ml ตามลำดับ) ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.4 และ 4.5

แม้ว่าสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธี MAE และ UAE ได้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียไม่ต่างกัน แต่การสกัดด้วยวิธี MAE ได้ค่า TPC และ TFC มากกว่าวิธีอื่น รวมทั้งมีปริมาณสารสกัดแห้งมากสุด แสดงให้เห็นว่าการสกัดด้วยวิธี MAE สามารถสกัดสารสกัดหยาบเมล็ดหว้ามาใช้ได้มากกว่าวิธีอื่นจึงเลือกวิธีการสกัด MAE มาใช้ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย (MIC, mg/ml) ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ

แบคทีเรีย	MAE	UAE	RT	HT
S. Typhimurium	3.13	3.13	3.13	3.13
E. coli	3.13	3.13	3.13	3.13
S. aureus	0.39	0.39	0.78	0.78

ตารางที่ 4.5 ความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC, mg/ml) ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ

แบคทีเรีย	MAE	UAE	RT	HT
S. Typhimurium	6.25	6.25	6.25	6.25
E. coli	6.25	6.25	6.25	6.25
S. aureus	0.78	0.78	1.56	1.56

4.2 การเพิ่มประสิทธิภาพในการลดจำนวนแบคทีเรียด้วยสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติกหรือกรดแลกติก

การสกัดด้วยวิธี MAE เป็นวิธีที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดหยาบจากเมล็ดหว้า แต่สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่ได้นั้นมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในระดับหนึ่ง จึงนำสารสกัดหยาบเมล็ดหว้ามาใช้ร่วมกับกรดอินทรีย์เพื่อเพิ่มฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยทดสอบกับกรดอินทรีย์ 2 ชนิด ได้แก่ กรดแอซีติก และ กรดแลกติก โดยนำสารแต่ละชนิดมาหาค่า MIC และ MBC พบว่ากรดแอซีติก มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.78 %w/v (pH เท่ากับ 2.76) และ 1.56 %w/v (pH เท่ากับ 2.62) ตามลำดับ ซึ่งมีความเข้มข้นต่ำกว่ากรดแลกติก โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 1.56 %w/v (pH เท่ากับ 2.11) และ 3.13 %w/v (pH เท่ากับ 1.98) ตามลำดับ เมื่อทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *S.* Typhimurium และ *E. coli*

ส่วนการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* มีค่า MIC และ MBC ต่ำกว่า *S.* Typhimurium และ *E. coli* โดยพบว่ามีค่า MIC และ MBC ของกรดแอซีติกเท่ากับ 0.39 %w/v (pH เท่ากับ 2.91) และ 0.78 %w/v (pH เท่ากับ 2.76) ตามลำดับ และกรดแลกติก มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.78 %w/v (pH เท่ากับ 2.27) และ 1.56 %w/v (pH เท่ากับ 2.11) ตามลำดับ เห็นได้ว่าใช้ความเข้มข้นของกรดแอซีติกในการยับยั้งและทำลายเชื้อ *S.* Typhimurium *E. coli* และ *S. aureus* ต่ำกว่ากรดแลกติก ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Barros และคณะ (2012) ได้รายงานค่า MIC และ MBC ของกรดแลกติกสูงกว่าของกรดแอซีติกสองเท่า เนื่องจากความสามารถของกรดอินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียขึ้นอยู่กับส่วนที่ไม่แตกตัวของกรดอินทรีย์ ในสภาวะที่ pH ต่ำกว่าค่า pKa กรดอินทรีย์จะอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวมากกว่า ดังนั้นกรดแลกติกมีค่า pKa เท่ากับ 3.85 ซึ่งต่ำกว่ากรดแอซีติก (pKa เท่ากับ 4.74) จึงต้องใช้ปริมาณมาก ในการปรับให้มีสภาวะ pH ต่ำ ให้กรดแลกติกอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวเพื่อยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

อย่างไรก็ตามกลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของกรดอินทรีย์แตกต่างกับสารสกัดหยาบจากเมล็ดหว้า โดยกลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าเกิดจากสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบ ทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก รบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ ยับยั้งเมทาบอลิซึมของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียถูกทำลายในที่สุด (Cushnie และ Lamb, 2005) ดังนั้นสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าจึงมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียต่างจากกรดอินทรีย์ โดยสารสกัดหยาบเมล็ดหว้ามีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 3.13

และ 6.25 mg/ml ตามลำดับ เมื่อทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *S.* Typhimurium และ *E. coli* และมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.39 และ 0.78 mg/ml เมื่อทดสอบกับเชื้อ *S. aureus*

การที่สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าและกรดอินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งและทำลายเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ จึงมีค่า MIC และ MBC มากกว่าเชื้อ *S.* Typhimurium และ *E. coli* เนื่องจากความแตกต่างของโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ได้กล่าวไปก่อนหน้า ผลแสดงดังตารางที่ 4.6 และ 4.7

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า กรดแอซีติก และกรดแลกติก

แบคทีเรีย	สารสกัดหยาบ (mg/ml)	กรดแอซีติก (% w/v)	กรดแลกติก (% w/v)
S. Typhimurium	3.13	0.78	1.56
E. coli	3.13	0.78	1.56
S. aureus	0.39	0.39	0.78

ตารางที่ 4.7 ความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย MBC ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า กรดแอซีติก และกรดแลกติก

แบคทีเรีย	สารสกัดหยาบ (mg/ml)	กรดแอซีติก (% w/v)	กรดแลกติก (% w/v)
S. Typhimurium	6.25	1.56	3.13
E. coli	6.25	1.56	3.13

เมื่อนำสารต่างๆ มาทดสอบกับเชื้อ *S.* Typhimurium, *E. coli* และ *S. aureus* ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 6.22±0.11, 5.93±0.24 และ 6.23±0.10 log CFU/ml ตามลำดับ พบว่าเมื่อทดสอบกับน้ำกลั่นซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม เชื้อทั้งสามชนิดมีจำนวนเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการบ่ม ในชั่วโมง 9 มีจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium, *E. coli* และ *S. aureus* เท่ากับ 11.36±0.39, 11.38±0.43, 11.44±0.22 log CFU/ml ตามลำดับ

เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่มีสารต่างๆ ความเข้มข้นเท่ากับ 1 MBC ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำลายเชื้อแบคทีเรียได้จึงทำให้จำนวนแบคทีเรียลดลง พบว่าการใช้กรดแลกติกความเข้มข้น 1 MBC ทำให้แบคทีเรียลดลงอย่างช้าๆ มีจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium, *E. coli* และ *S. aureus* เหลือเท่ากับ 3.38±0.12, 4.76±0.12 และ 4.45±0.07 ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 9 เมื่อเทียบกับการใช้กรดแอซีติกความเข้มข้น 1 MBC พบว่าการใช้กรดแอซีติกสามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่ากรดแลกติก โดยไม่พบจำนวน *S.* Typhimurium และมีจำนวนเชื้อ *E. coli* ส่วนเหลือน้อยกว่า 2 log CFU/ml และเชื้อ *S. aureus* เหลือ 2.64±0.20 log CFU/ml ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 9 สอดคล้องกับ Beral และ Ghellai (2015) ได้รายงานว่าการใช้กรดแอซีติกทำให้ลดจำนวน

S. aureus ได้มากกว่าการใช้กรดแลกติก เนื่องจากกลไกในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของกรดแลกติกและกรดแอซีติกซึ่งเป็นกรดอินทรีย์เกิดจากส่วนที่ไม่แตกตัวของกรด โดยส่วนที่ไม่แตกตัวของกรดอินทรีย์นั้นเกี่ยวข้องกับค่า pH และ pKa เมื่อนำกรดทั้งสองชนิดมาวัดค่า pH พบว่า pH ของกรดแลกติก เท่ากับ 1.98 ซึ่งต่ำกว่ากรดแอซีติกที่มีค่า pH 2.62 แต่หากพิจารณาค่า pKa ของกรดแลกติกและกรดแอซีติกมีค่าเท่ากับ 3.85 และ 4.7 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าค่า pH ของกรดแอซีติกห่างกับค่า pKa มากกว่า ทำให้ส่วนที่ไม่แตกตัวของกรดแอซีติกมากกว่า จึงเป็นผลให้ส่วนที่ไม่แตกตัวของกรดแอซีติกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแล้วแตกตัวได้เป็นไฮโดรเจนอิออน (Hydrogen ion) ได้มากกว่ากรดแลกติก จึงลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่ากรดแลกติก

ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้น 1 MBC สามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้มากกว่ากรดแลกติก แต่น้อยกว่ากรดแอซีติก โดยไม่พบจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium และมีจำนวนเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 3.35±0.15 log CFU/ml ส่วนเชื้อ *S. aureus* มีจำนวนเท่ากับ 3.28±0.25 log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 9 สอดคล้องกับ Lin และคณะ (2004) ได้รายงานว่าสารสกัดจาก oregano และ cranberry สามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้มากกว่าการใช้กรดแลกติก อย่างเดียวกับ Peijnenburg (2005) ได้รายงานว่าสารสกัดจาก *BiopHorce* สามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้มากกว่ากรดแอซีติก อาจเป็นผลจากกลไกในการทำลายเชื้อต่างกัน โดยเชื้อแบคทีเรียจะถูกทำลายด้วยสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบ ซึ่งจะไปรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการสูญเสียการควบคุมการเข้าออกของสารต่างๆ เชื้อแบคทีเรียจึงถูกทำลายในที่สุด โดยช่วงแรกจะเกิดการรั่วไหลของอิออนหรือโมเลกุลเล็กๆ ก่อน จึงทำให้จำนวนเชื้อแบคทีเรียมีการลดลงอย่างช้าๆ (Henie และคณะ, 2009) แต่ระยะเวลานานขึ้นจึงทำให้เซลล์แบคทีเรียถูกทำลายได้มากขึ้น (Beral และ Ghellai, 2015) ทำให้เชื้อแบคทีเรียลดลงอย่างรวดเร็ว

เมื่อพิจารณาการใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดอินทรีย์ พบว่าการใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้น 0.5 MBC ร่วมกับกรดแลกติกความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 MBC ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ทำให้เชื้อ *S.* Typhimurium ลดจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ได้มากกว่าการใช้กรดแลกติกอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แม้ว่าการใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแลกติกจะทำให้ค่า pH สูงกว่ากรดแลกติกความเข้มข้น 1 MBC แต่สารสกัดหยาบเมล็ดหว้ามีสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ซึ่งสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ ทำให้ส่วนที่ไม่แตกตัวของกรดแลกติกเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้นแล้วเกิดการแตกตัวเป็นไฮโดรเจนอิออน ทำให้แบคทีเรียถูกทำลายได้มากขึ้น (Barros และคณะ, 2012) ดังนั้นเชื้อ *S.* Typhimurium จึงมีจำนวนลดลงมากกว่าการใช้กรดแลกติกเพียงอย่างเดียว โดยมีจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium เท่ากับ 2.58±0.18 log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 9 สอดคล้องกับ Lin และคณะ (2004) ได้รายงานว่าสารสกัดจาก oregano และ cranberry สามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้มากขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับกรดแลกติก อย่างไรก็ตามการใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้น 0.5 MBC ร่วมกับกรดแลกติกความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 MBC ทำให้จำนวนเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ลดลงอย่างช้าๆ ตลอดระยะเวลาการบ่ม 9 ชั่วโมง กับการใช้กรดแลกติกที่ความเข้มข้น 1 MBC โดยมีจำนวนเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* เท่ากับ 4.46±0.18 และ 4.31±0.19 log CFU/ml ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 9 แสดงให้เห็นว่าการใช้สารสองชนิดร่วมกันไม่ทำให้จำนวนเชื้อ

แบคทีเรียลดลงได้มากขึ้น อาจเพราะนิวเคลียสของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ถูกทำลายได้ยากกว่าเชื้อ *S.* Typhimurium (Henie และคณะ, 2009)

ส่วนการใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้น 0.5 MBC ร่วมกับกรดแอซีติกความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 MBC ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB สามารถลดจำนวนเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ได้มากกว่าการใช้กรดแอซีติกอย่างมีนัยสำคัญ แม้ว่าการใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติก (pH เท่ากับ 2.9) ทำให้ค่า pH สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกรดแอซีติกความเข้มข้น 1 MBC (pH เท่ากับ 2.62) แต่ยังคงต่ำกว่าค่า pKa ของกรดแอซีติก รวมทั้งการใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่ซึ่งมีสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ทำให้เซลล์เกิดการสูญเสียการควบคุมการเข้าออกของสารต่างๆ (Cushnie และ Lamb, 2005) ส่วนของกรดที่ไม่แตกตัวสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น เกิดการสะสมและแตกตัวของไฮโดรเจนอิออนอย่างรวดเร็วจนแบคทีเรียถูกทำลาย จำนวนเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* จึงลดลงได้มากขึ้น และ ไม่พบเชื้อ *E. coli* ในชั่วโมงที่ 9 แต่ยังคงพบเชื้อ *S. aureus* น้อยกว่า 2 log CFU/ml ผลดังกล่าวสอดคล้องกับ Khanaq (2014) ได้รายงานการใช้สารสกัดเปลือกมะนาวด้วยน้ำร่วมกับกรดแอซีติกสามารถลดจำนวนเชื้อ *E. coli* ได้ดีกว่าการใช้กรดแอซีติกหรือสารสกัดจากเปลือกมะนาวเพียงอย่างเดียว

การใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติกสามารถทำให้เชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ลดลงได้มากกว่าการใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้น 0.5 MBC ร่วมกับกรดแลกติกความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 MBC สอดคล้องกับ Barros และคณะ (2012) ได้รายงานการใช้สารสกัดจาก *Origanum vulgare* L. ร่วมกับกรดแอซีติก หรือ กรดแลกติกเพื่อลดจำนวนแบคทีเรีย *S. aureus* พบว่า การใช้สารสกัด *Origanum vulgare* L. ร่วมกับกรดแอซีติกสามารถลดจำนวนเชื้อ *S. aureus* ได้มากกว่าการใช้สารสกัด *Origanum vulgare* L. ร่วมกับกรดแลกติก อาจเป็นเพราะส่วนที่ไม่แตกตัวของกรดแอซีติกมากกว่ากรดแลกติก ทำให้กรดแอซีติกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้มากกว่าจึงทำลายเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่า

อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้น 1 MBC กรดแอซีติกความเข้มข้น 1 MBC และ สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้น 0.5 MBC ร่วมกับกรดแอซีติกความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 MBC ซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium มากกว่าการใช้สารสกัดความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 MBC ร่วมกับกรดแลกติกความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 MBC และการใช้กรดแลกติกเพียงอย่างเดียว แต่นิวเคลียสของเชื้อ *S.* Typhimurium ถูกทำลายได้ง่าย (Henie และคณะ, 2009) จึงมีการลดลงอย่างรวดเร็วโดยไม่พบจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ในชั่วโมงที่ 6

จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการใช้กรดแลกติกความเข้มข้นเท่ากับ 1 MBC ลดจำนวนเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ได้น้อยสุด แต่ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) กับการใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้น 0.5 MBC ร่วมกับกรดแลกติกความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 MBC และสามารถลดได้มากขึ้นเมื่อใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้น 1 MBC กรดแอซีติกความเข้มข้น 1 MBC ตามลำดับ โดยการใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้น 0.5 MBC ร่วมกับกรดแอซีติกความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 MBC มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *S. aureus* ได้มากสุด แต่การทดสอบกับเชื้อ S. Typhimurium พบว่าการใช้กรดแลกติกความเข้มข้นเท่ากับ 1 MBC ลดจำนวนเชื้อ S. Typhimurium ได้น้อยสุด แต่ลดได้มากขึ้นเมื่อใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้น 0.5

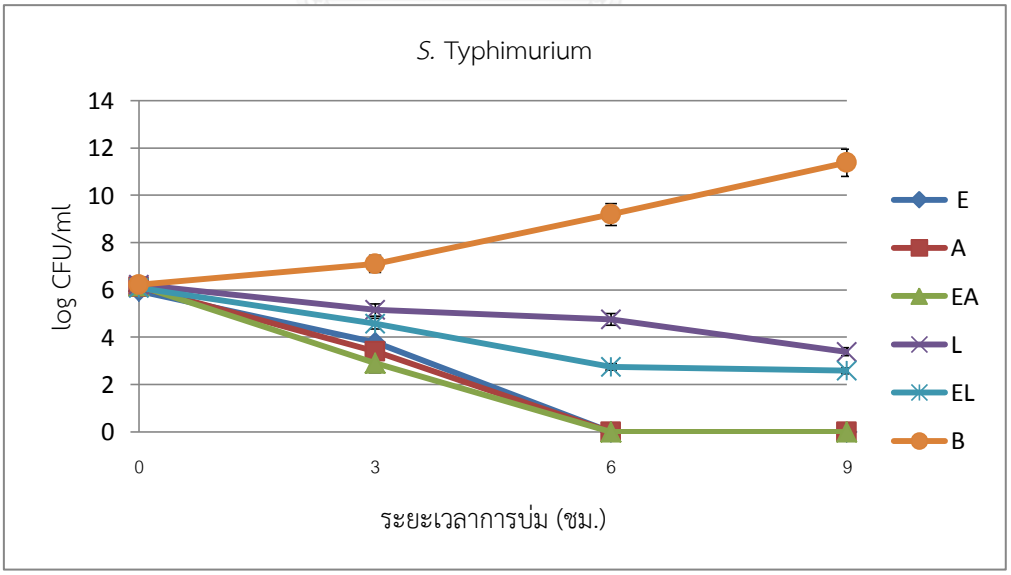
MBC ร่วมกับกรดแลกติกความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 MBC และลดได้มากสุดเมื่อใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้น 0.5 MBC ร่วมกับกรดแอซีติกความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 MBC แต่ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) กับการใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้น 1 MBC และ กรดแอซีติกความเข้มข้น 1 MBC โดยค่า pH ของสารต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.8 และการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อแบคทีเรียแสดงดังภาพที่ 4.7-4.9

แม้ว่าการใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับแลกติกทำให้เชื้อ *S.* Typhimurium ลดลงได้มากขึ้น แต่การใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติกสามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* ได้มากกว่าการทดลองอื่น จึงเลือกสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธี MAE ใช้ร่วมกับกรดแอซีติกใช้ในขั้นตอนต่อไป

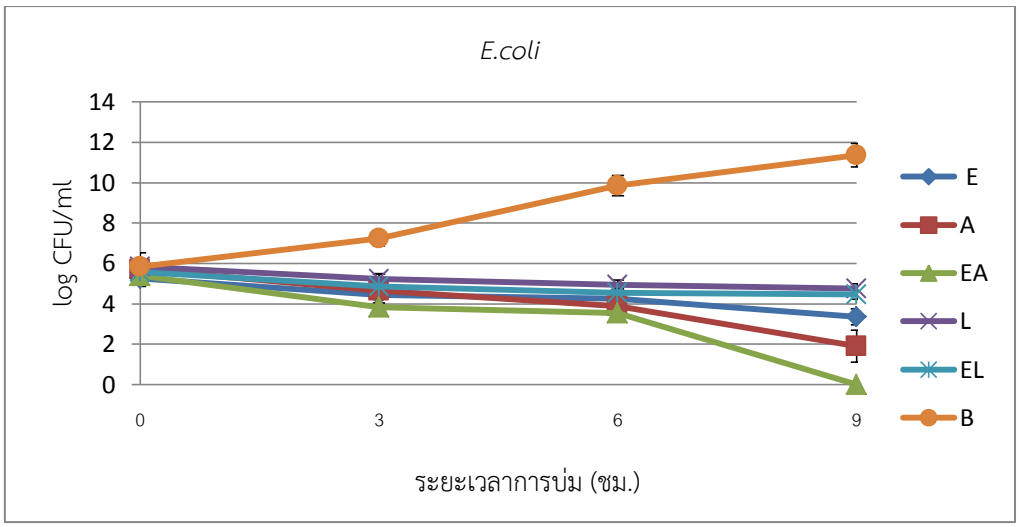
ตารางที่ 4.8 ค่า pH ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) กรดแอซีติก (A) กรดแลกติก (L) สารสกัดหยาบร่วมกับกรดแอซีติก (EA) และ สารสกัดหยาบร่วมกับกรดแลกติก (EL)

สาร	E	A	L	EA	EL
pH	3.95±0.07^{a}	2.66±0.06^{c}	2.04±0.08^{e}	2.95±0.07^{b}	2.39±0.02^{d}

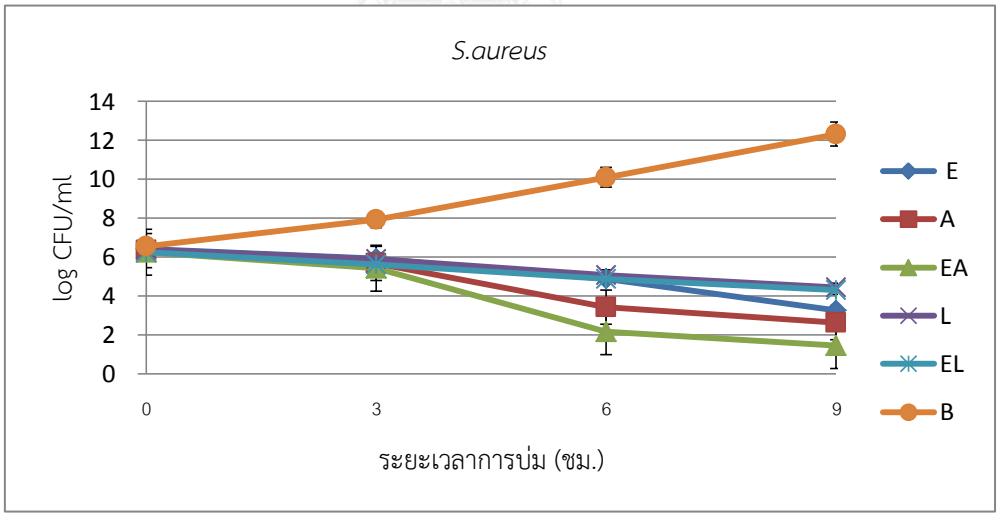
หมายเหตุ a-e หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวนอนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.05)



ภาพที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรีย *S.* Typhimurium ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่มีสารสกัดหยาบ (E) กรดแอซีติก (A) กรดแลกติก (L) สารสกัดหยาบร่วมกับกรดแอซีติก (EA) และสารสกัดหยาบร่วมกับกรดแลกติก (EL) ระหว่างการบ่ม 9 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรีย *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่มีสารสกัดหยาบ (E) กรดแอซีติก (A) กรดแลกติก (L) สารสกัดหยาบร่วมกับกรดแอซีติก(EL) และสารสกัดหยาบร่วมกับกรดแลกติก (EL) ระหว่างการบ่ม 9 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรีย *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่มีสารสกัดหยาบ (E) กรดแอซีติก (A) กรดแลกติก (L) สารสกัดหยาบร่วมกับกรดแอซีติก (EA) และสารสกัดหยาบร่วมกับกรดแลกติก (EL) ระหว่างการบ่ม 9 ชั่วโมง

4.3 การใช้สารสกัดหยาบจากเมล็ดหว้า กรดแอซีติก และสารสกัดร่วมกับกรดแอซีติกในการแช่สะระแหน่เพื่อลดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย

สะระแหน่ ซึ่งเป็นผักส่งออกมีการรายงานเกี่ยวกับปัญหาการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียเกินเกณฑ์ที่กำหนด โดยกรมวิชาการเกษตรได้กำหนดจำนวนเชื้อ *E. coli* ที่พบในผักส่งออกได้ไม่เกิน 100 CFU/g หรือ 2 log CFU/g และไม่พบเชื้อ *Samonella* spp. ในผัก 25 กรัม (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556) ในตัวอย่างสะระแหน่ที่ใช้ตรวจไม่พบเชื้อ *Samonella* spp จึงไม่ได้ติดตามผลการยับยั้งในการทดลองนี้ เมื่อใช้สารในการทดลองนี้ ได้แก่ สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้น 1 MBC (E) (6.25 mg/ml) กรดแอซีติกความเข้มข้น 1 MBC (A) (1.56 %w/v) และสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติก ได้แก่ สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้น 0.5 MBC (3.13 mg/ml) ร่วมกับกรดแอซีติกความเข้มข้น 0.5 MBC (0.78 %) (EA1) สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้น 0.75 MBC (4.69 mg/ml) ร่วมกับกรดแอซีติกความเข้มข้น 0.25 MBC (0.39%w/v) (EA2) และสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้น 0.875 MBC (5.47 mg/ml) ร่วมกับกรดแอซีติกความเข้มข้น 0.125 MBC (0.195 %w/v) (EA3) และน้ำกลั่นปลอดเชื้อซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม (DI) มาแช่สะระแหน่เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่อีกครั้งด้วยน้ำกลั่นเป็นระยะเวลา 2 นาที เพื่อลดการซ้ำจากการใช้กรดแอซีติก หลังจากนั้นนำสะระแหน่มาวิเคราะห์จำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด เชื้อ *E.coli* รวมทั้งการซ้ำของสะระแหน่ แล้วเก็บรักษาสะระแหน่ที่แช่ด้วยสารต่างๆ ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด จำนวนเชื้อ *E.*coli รวมทั้งการซ้ำของสะระแหน่ในระหว่างการเก็บรักษา

จากการวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเริ่มต้นพบว่ามีจำนวนเท่ากับ 6.26 ± 0.24 log CFU/g และมีจำนวน *E*. coli เท่ากับ 2.53±0.11 log CFU/g แต่หลังจากนำสะระแหน่มาแช่ด้วย DI เป็นระยะเวลา 10 นาที พบว่าหลังการแช่และผึ่งให้แห้งมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และ *E*. coli หลังการแช่เท่ากับ 5.55±0.39 log CFU/g และ 2.36±0.20 log CFU/g ตามลำดับ เนื่องจากแบคทีเรียที่อยู่บนผิวผักบางส่วนหลุดรอดไปกับน้ำ สะระแหน่ที่แช่ด้วย DI ไม่พบการซ้ำดังภาพที่ 4.13 (ค่าการซ้ำเท่ากับ 0) เนื่องจากน้ำกลั่นไม่มีฤทธิ์ในการกัดกร่อน อย่างไรก็ตามการแช่สะระแหน่ด้วย E พบว่ามีจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและเชื้อ *E*. coli เหลือรอดน้อยกว่าการแช่ด้วย DI แต่ไม่ต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) และไม่พบการซ้ำหลังการแช่เช่นกัน ดังภาพที่ 4.14 (ค่าการซ้ำเท่ากับ 0) อย่างไรก็ตามจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและ *E*. coli ลดลงได้มากขึ้นเมื่อแช่สะระแหน่ด้วย A โดยมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและเชื้อ *E*. coli เท่ากับ 4.76±0.25 และ 1.84±0.16 log CFU/g ตามลำดับ แต่การแช่สะระแหน่ด้วย A ทำให้เกิดการซ้ำมากที่สุดดังภาพที่ 4.15 โดยมีค่าการซ้ำเท่ากับ 2.71±0.16 ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ กานต์ แย้มพงษ์ และ อรอินทุ์ ประไชโย (2554) พบว่ากรดแอซีติกสามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียได้ แต่ทำให้ผักกะหล่ำปลีเกิดการซ้ำ อาจเป็นผลจากกรดแอซีติกซึ่งมีค่า pH ต่ำกว่าสารอื่นๆ โดยมีค่าเท่ากับ 2.86±0.07 จึงมีฤทธิ์ในการกัดกร่อนมากสุด โดยกรดแอซีติกไปทำลายเซลล์ใบสะระแหน่ และเกิดการซ้ำจากคลอโรฟิลล์ซึ่งเป็นรงควัตถุที่มีสีเขียวเปลี่ยนเป็นสีเขียวมะกอก เนื่องจากแมกนีเซียมในโครงสร้างของคลอโรฟิลล์ถูกแทนที่ด้วยไฮโดรเจนของกรดแอซีติกทำให้คลอโรฟิลล์เปลี่ยนเป็นฟีโอไฟตินซึ่งมีสีเขียวมะกอกได้ (Erge และคณะ, 2008)

ดังนั้นจึงลดความเข้มข้นของกรดแอซีติกที่ใช้ร่วมกับสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า โดยใช้สาร EA1 พบว่าสามารถลดจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและ *E.* coli ได้มากสุด โดยมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและเชื้อ *E.* coli เหลือรอดเท่ากับ 4.55±0.29 และ 1.37±0.25 log CFU/g ตามลำดับ เนื่องจากการใช้กรดแอซีติกร่วมกับสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าในความเข้มข้นดังกล่าวทำสามารถเพิ่มฤทธิ์ในการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียได้ สอดคล้องกับการทดลองที่ 4.2 อย่างไรก็ตามการใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติกที่ความเข้มข้นนี้ยังคงทำให้ผักสะระแหน่ช้ำดังภาพที่ 4.16 เนื่องจากกรดแอซีติกแต่ความเข้มข้นของกรดแอซีติกที่ใช้ต่ำกว่า A จึงมีค่า pH สูงขึ้นเท่ากับ 3.20±0.07 เป็นผลให้เกิดการช้ำน้อยกว่า A โดยมีค่าการช้ำเท่ากับ 1.7±0.10 ส่วนการแช่สะระแหน่ด้วย EA2 และ EA3 เป็นการลดความเข้มข้นของกรดแอซีติกที่ใช้ร่วมกับสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า ทำให้ค่า pH สูงกว่า A และ EA1 การแช่สะระแหน่ที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่ทำให้เกิดการช้ำหรือมีค่าการช้ำเท่ากับ 0 ดังภาพที่ 4.17 และ 4.18 ตามลำดับ จากการใช้ความเข้มข้นของกรดแอซีติกที่ต่ำลงจึงทำให้ค่า pH ที่สูงขึ้นเป็นผลให้มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และ *E.* coli เหลือรอดมากขึ้น โดยการแช่สะระแหน่ด้วยสาร EA2 มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และ *E.* coli เท่ากับ 4.61±0.32 และ 1.74±0.10 log CFU/g ตามลำดับ ส่วนการแช่ด้วย EA3 มีจำนวนจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและ *E.* coli เท่ากับ 4.74±0.22 และ 1.87±0.09 log CFU/g ตามลำดับ

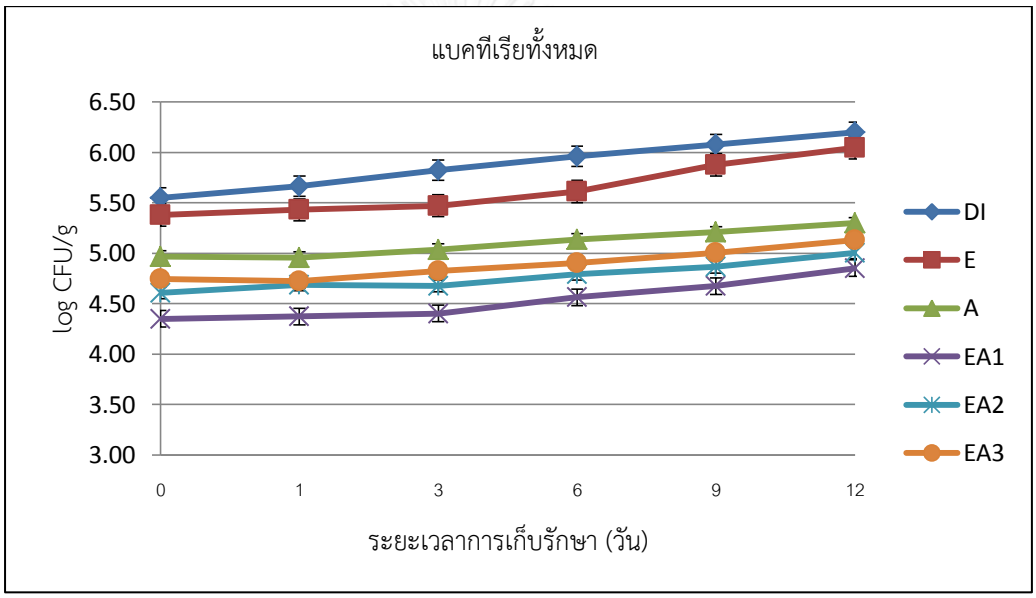
หลังการแช่สะระแหน่ด้วยสารละลายต่างๆ แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิเท่ากับ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน พบว่าสะระแหน่ มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด และ *E.* coli เพิ่มมากขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ผลดังกล่าวสอดคล้องกับ บุษกร ทองใบ และคณะ (2557) ได้รายงานผลของการใช้สารสกัดจากกาบมะพร้าวร่วมกับกรดฟูมาริกต่อจุลินทรีย์ในโหระพาสด พบว่าการใช้สารสกัดจากกาบมะพร้าว 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับกรดฟูมาริก 0.5 % (v/v) ลดเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้ดีกว่าการใช้สารสกัดหรือกรดเพียงอย่างเดียว แต่มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน อาจเป็นผลจากหลังการแช่สะระแหน่ด้วยสารละลายต่างๆ มีการแช่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้ออีกครั้งเพื่อล้างสารที่แช่ออก ทำให้สารมีการเกาะติดที่พื้นผิวของใบผักน้อย ฤทธิ์ของสารไม่เพียงพอต่อการยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรียจึงไม่สามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้ในระหว่างการเก็บรักษา

โดยกรมวิชาการเกษตรได้กำหนดจำนวนเชื้อ *E.coli* ที่พบในผักส่งออกได้ไม่เกิน 100 CFU/g หรือ 2 log CFU/g และไม่พบเชื้อ *Samonella* spp. ในผัก 25 กรัม (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556) และมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดไม่เกิน 5 log CFU/g พบว่าหลังแช่สะระแหน่ด้วยสาร DI, E, A และ EA3 สามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้แต่มีจำนวนแบคทีเรียเหลือรอดเกินเกณฑ์ที่กฎหมายกำหนด แต่การแช่สะระแหน่ด้วย EA2 มีจำนวนแบคทีเรียเกินที่กฎหมายกำหนดในวันที่ 9 มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและ *E.* coli เท่ากับ 4.85±0.32 และ 2.06±0.18 log CFU/g ส่วนสะระแหน่ที่แช่ด้วย EA1 ซึ่งลดจำนวนแบคทีเรียได้มากสุด มีจำนวนแบคทีเรียเกินที่กฎหมายกำหนดในวันที่ 12 โดยมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและ *E.* coli เท่ากับ 4.85±0.32 และ 2.07±0.14 log CFU/g การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด จำนวน *E. coli* แสดงดังภาพที่ 4.10-4.11

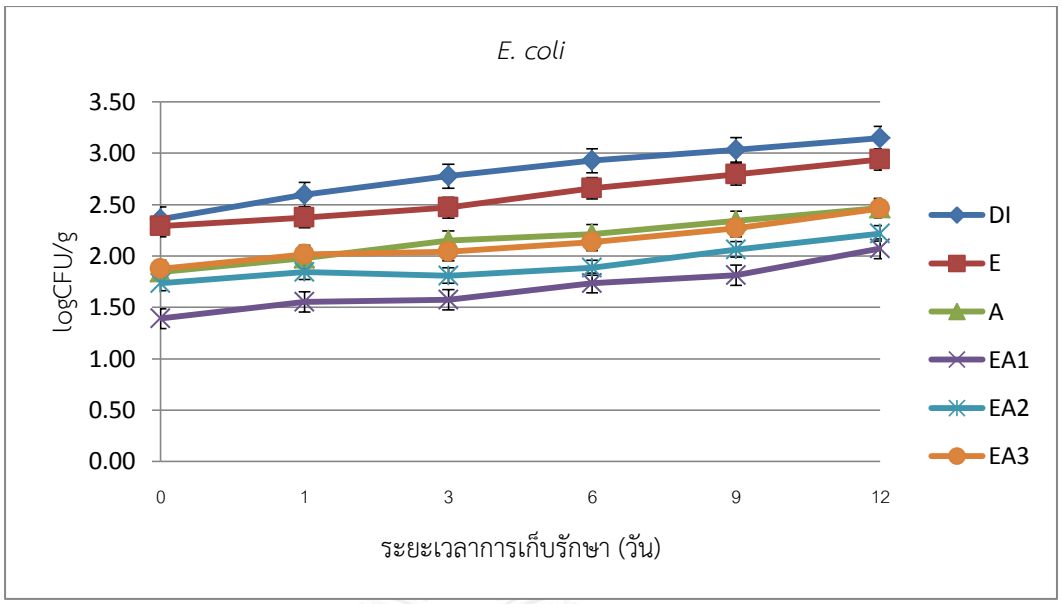
ตารางที่ 4.9 ค่า pH ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) กรดแอซีติก (A) สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติกความเข้มข้น (EA1, EA2 และ EA3)

สารที่แช่ สะระแหน่	E	A	EA1	EA2	EA3
pH	3.84±0.04[a]	2.86±0.07[e]	3.20±0.07[d]	3.34±0.01[c]	3.53±0.06[b]

หมายเหตุ a-e หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวนอนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



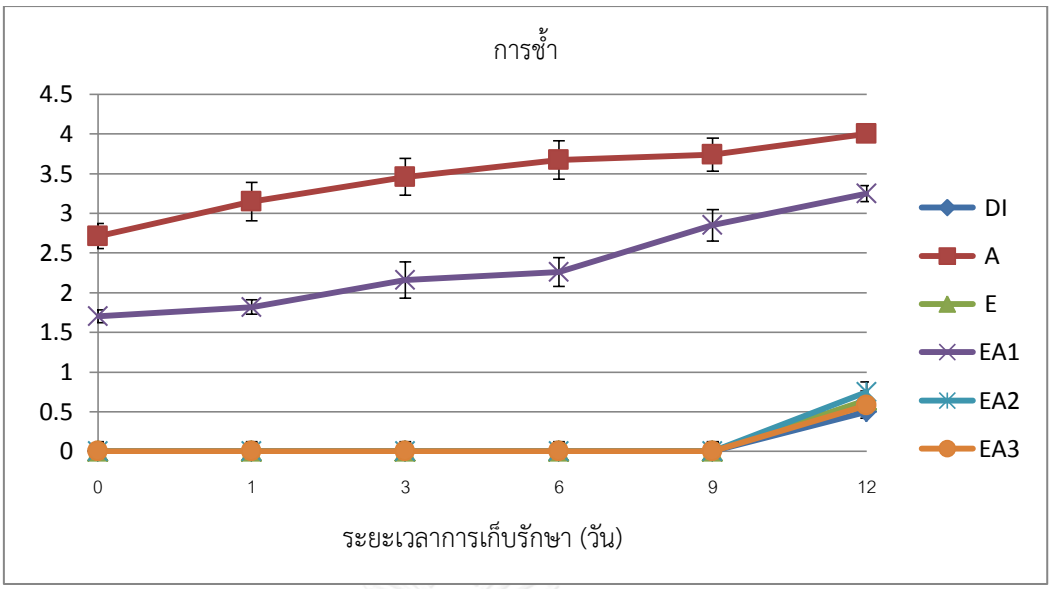
ภาพที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (TPC) ในสะระแหน่ หลังแช่ด้วยสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) กรดแอซีติก (A) สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติก (EA1 EA2 และ EA3) และระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน



ภาพที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในสะระแหน่ หลังแช่ด้วยสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) กรดแอซีติก (A) สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติก(EA1 EA2 และ EA3) และระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

เมื่อพิจารณาการช้ำที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา พบว่าการแช่สะระแหน่ด้วย A ซึ่งมีค่า pH ต่ำสุดทำให้ผักมีการช้ำมากสุด และมีการช้ำทั่วใบสะระแหน่ในวันที่ 12 ดังภาพที่ 4.21 โดยมีค่าการช้ำเท่ากับ 4.00±0.00 เนื่องจากมีการช้ำหลังการแช่มากสุดทำให้เซลล์ของผักสะระแหน่เกิดการช้ำได้ง่ายกว่าการแช่ด้วยสารอื่นๆ (Erge และคณะ, 2008) ตามด้วยผักสะระแหน่ที่แช่ด้วย EA1 ดังภาพที่ 4.22 มีค่าการช้ำเท่ากับ 3.25±0.10 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าสะระแหน่ที่แช่ด้วย A เนื่องจากแช่ด้วยความเข้มข้นของกรดแอซีติกที่น้อยกว่าจึงมี pH สูงขึ้นทำให้เกิดการทำลายเซลล์น้อยลง อย่างไรก็ตามการใช้ EA1 พบว่ามีความชันของกราฟเท่ากับ 0.31 มากกว่า A แสดงให้เห็นว่าการใช้ EA1 ทำให้สะระแหน่ช้ำได้เร็วกว่า A อาจเป็นเพราะการแช่ด้วย EA1 มีการเกาะติดของสารมากกว่า ส่วนการแช่ด้วยสารอื่นๆ ได้แก่ DI, E, EA2 และ EA3 ไม่พบการช้ำระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 9 วัน แต่พบการช้ำในวันที่ 12 ดังภาพที่ 19, 20, 23 และ 24 ตามลำดับ โดยมีค่าการช้ำท่ากับ 0.75 ± 0.13, 0.58 ± 0.08 และ 0.50 ± 0.09 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) ค่า pH ของสารต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงการช้ำแสดงดังภาพที่ 4.10-4.13

จากผลดังกล่าวการแช่สะระแหน่ด้วย EA1 ทำให้เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและเชื้อ *E.* coli ลดลงได้มากสุดแต่มีการช้ำเกิดขึ้น รวมทั้งมีการเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด และเชื้อ *E. coli* ในระหว่างการเก็บรักษาเร็วกว่าการแช่สะระแหน่ด้วย EA2 ดังนั้นการใช้สาร EA2 จึงเหมาะสมต่อการนำมาใช้ลดจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและเชื้อ *E. coli* นอกจากนั้นไม่มีผลทำให้เกิดการช้ำ โดยสามารถเก็บรักษาได้สะระแหน่ที่แช่ด้วย EA2 ได้เป็นระยะเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.12 ค่าการซ้ำของสะระแหน่หลังแช่สารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) กรดแอซีติก (A) สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติก (EA1 EA2 และ EA3) และระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วันด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาพที่ 4.13 การช้ำของสะระแหน่หลังจากแช่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (DI) เป็นเวลา 10 นาที

ภาพที่ 4.14 การช้ำของสะระแหน่หลังจากแช่ด้วยสารสกัดความเข้มข้น 1 MBC (E) เป็นเวลา 10 นาที

ภาพที่ 4.15 การช้ำของสะระแหน่หลังจากแช่ด้วยกรดแอซีติกความเข้มข้น 1 MBC (A) เป็นเวลา 10 นาที

ภาพที่ 4.16 การชำของสะระแหน่หลังจากแช่ด้วยสารสกัดความเข้มข้น 0.5 MBC ร่วมกับกรดแอซีติกความเข้มข้น 0.5 MBC (EA1) เป็นเวลา 10 นาที

ภาพที่ 4.17 การชำของสะระแหน่หลังจากแช่ด้วยสารสกัดความเข้มข้น 0.75 MBC ร่วมกับกรดแอซีติกความเข้มข้น 0.25 MBC (EA1) เป็นเวลา 10 นาที

ภาพที่ 4.18 การชำของสะระแหน่หลังจากแช่ด้วยสารสกัดความเข้มข้น 0.875 MBC ร่วมกับกรดแอซีติกความเข้มข้น 0.125 MBC (EA1) เป็นเวลา 10 นาที

ภาพที่ 4.19 การช้ำของสะระแหน่ที่แช่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (DI) ในวันที่12

ภาพที่ 4.20 การช้ำของสะระแหน่ที่แช่ด้วยสารสกัดความเข้มข้น 1 MBC (E) ในวันที่12

ภาพที่ 4.21 การช้ำของสะระแหน่ที่แช่ด้วยกรดแอซีติกความเข้มข้น 1 MBC (A) ในวันที่12

ภาพที่ 4.22 การชำของสะระแหน่ที่แช่ด้วยสารสกัดความเข้มข้น 0.5 MBC ร่วมกับกรดแอซีติก ความเข้มข้น 0.5 MBC (EA1) ในวันที่12

ภาพที่ 4.23 การชำของสะระแหน่ที่แช่ด้วยสารสกัดความเข้มข้น 0.75 MBC ร่วมกับกรดแอซีติก ความเข้มข้น 0.25 MBC (EA1) ในวันที่12

ภาพที่ 4.24 การชำของสะระแหน่ที่แช่ด้วยสารสกัดความเข้มข้น 0.875 MBC ร่วมกับกรดแอซีติก ความเข้มข้น 0.125 MBC (EA1) ในวันที่12

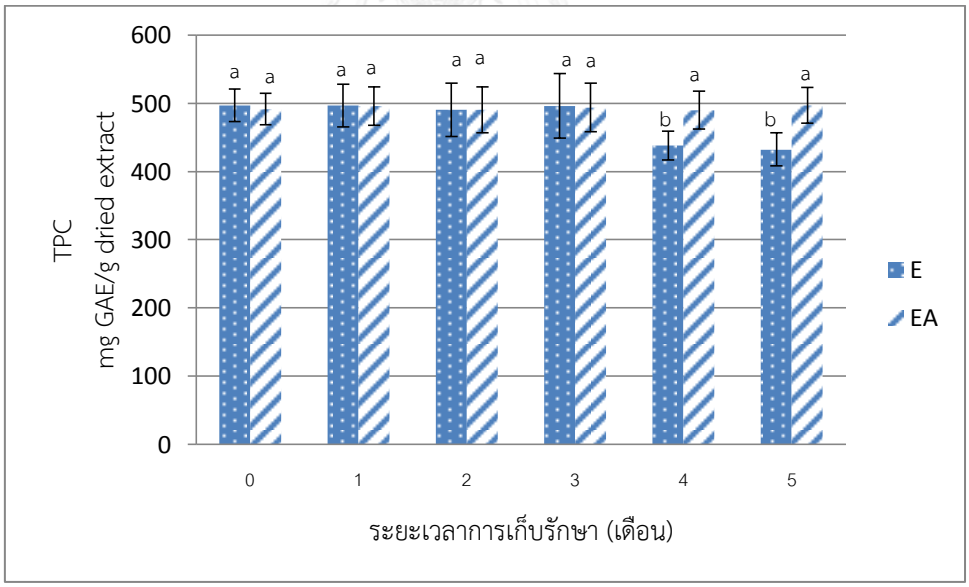
4.4 ศึกษาอายุการเก็บรักษาของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า และสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติก

การใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าหรือการใช้กรดแอซีติกร่วมกับสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า ในการลดจำนวนแบคทีเรียในสะระแหน่ อาจใช้ไม่หมดภายในครั้งเดียวจึงต้องเก็บสารเพื่อใช้ในครั้งต่อไป อย่างไรก็ตามฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าอาจมีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเก็บรักษาได้ ทำให้มีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียลดลง ดังนั้นจึงศึกษาอายุการเก็บสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติกเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า โดยการทดสอบการเปลี่ยนแปลง TPC TFC รวมทั้งฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า และสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติก โดยเก็บในรูปของสารละลายปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดสีชา 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 5 เดือน เมื่อนำสารสกัดเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธี MAE ตรวจวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เริ่มต้นพบว่ามีค่า TPC และ TFC เท่ากับ 497.04±24.09 mg GAE/g dried extract และ 20.38±0.25 mg QE/g dried extract ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) กับสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับแอซีติกซึ่งมี TPC และ TFC เริ่มต้นเท่ากับ 491.66±22.83 mg GAE/g dried extract และ 20.38±0.18 mg QE/g dried extract ตามลำดับเมื่อนำสารทั้ง 2 ชนิดมาทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย *S.* Typhimurium, *E. coli* และ *S. aureus* พบว่าสกัดหยาบเมล็ดหว้ามีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 3.13 และ 6.25 mg/ml ตามลำดับ เมื่อทดสอบกับเชื้อ *S.* Typhimurium และ *E. coli* และมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 3.13 และ 6.25 mg/ml เมื่อทดสอบกับ *S. aureus* แต่ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องมีการเปลี่ยนแปลง พบว่าสารสกัดหยาบเมล็ดหว้ามีค่า TPC และ TFC ลดลง เนื่องจากระยะเวลาที่นานขึ้นทำให้อากาศที่ละลายอยู่ในน้ำซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้ามากขึ้น ทำให้เกิดการสลายตัวของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ได้ (Stintzing และ Turek, 2013) โดยมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (p≤0.05) ในเดือนที่ 4 ซึ่งมีค่า TPC และ TFC เท่ากับ 432.47±24.13 mg GAE/g dried extract และ 17.10±0.18 mg QE/g dried extract เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียพบว่าความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า ที่ลดลงในเดือนที่ 4 ทำให้ต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าเพิ่มขึ้นจากเดิมเท่าตัวในการยับยั้งและการฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิด แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีผลต่อการยับยั้งและการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

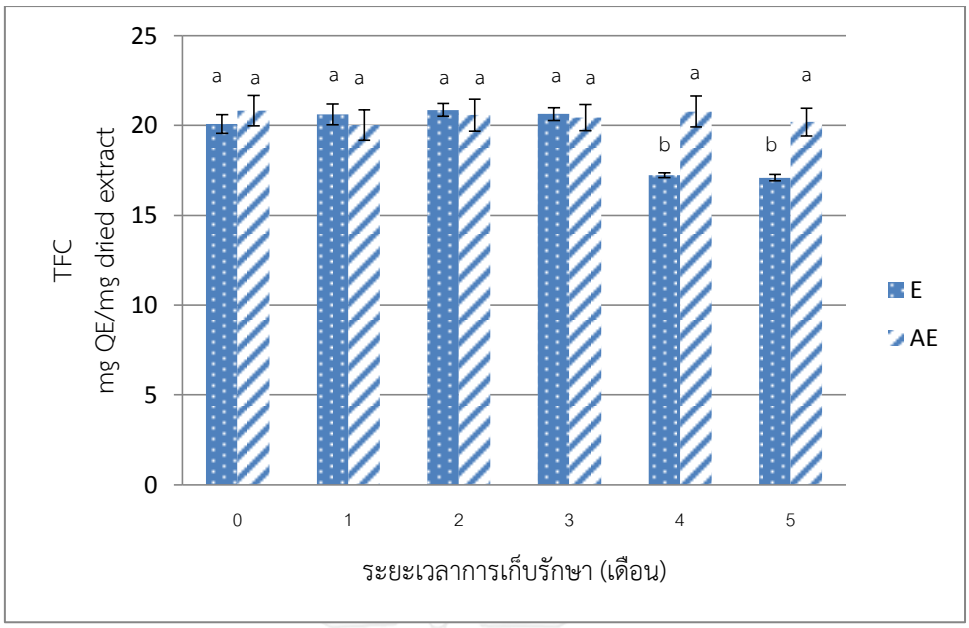
อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติก ซึ่งอยู่ในสภาวะที่มีค่า pH ประมาณ 2.77 ซึ่งมีค่า pH ต่ำกว่าสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (pH เท่ากับ 4.10) พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่า TPC และ TFC อย่างมีนัยสำคัญ (p≥0.05) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาเป็นเวลา 5 เดือนที่อุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียส) โดยมีการรายงานว่า กรดแกลลิก กรดเฟอรูลิก กรดคลอโรจินิก และเควอซิทิน ที่พบในสารสกัดเมล็ดหว้ามีความคงตัวในสภาวะที่มีค่า pH ต่ำ (Himanshu และคณะ, 2015) เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเมื่อละลายน้ำจะอยู่ในรูปของฟีนอล (phenol) และ ฟีโนเลต (phenolates) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่สูญเสียไฮโดรเจนอิออนของฟีนอล โดยสภาวะกรดซึ่งมีค่า pH ต่ำจะอยู่ในรูปของฟีนอลมากกว่า (Boles และคณะ, 1988) เป็นผลทำให้

ความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติกที่ใช้ยับยั้งและการฆ่าเชื้อแบคทีเรียจึงไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาด้วย โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 1.56:0.39 และ 3.13:0.78 (mg/ml:%w/v) ตามลำดับ เมื่อทดสอบกับเชื้อ *S.* Typhimurium และ *E. coli* ส่วนการทดสอบกับ *S. aureus* มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.195:0.195 และ 0.39:0.39 (mg/ml:%w/v) การเปลี่ยนแปลง TPC และ TFC ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าและสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติกแสดงดังภาพที่ 4.25 และ 4.26 รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแสดงดังตารางที่ 4.14-4.16

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นได้ว่าความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีความสัมพันธ์กับการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียในระหว่างการเก็บรักษาทั้งสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าและสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติก หากความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ลดลงทำให้การยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียลดลงด้วย ดังนั้นสามารถเก็บรักษาสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าเพื่อใช้ลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียในสะระแหน่ได้เป็นระยะเวลา 3 เดือน ที่อุณหภูมิห้องก่อนฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียลดลง และสามารถเก็บรักษาสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติกเพื่อใช้ลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียในสะระแหน่ได้เป็นระยะเวลา 5 เดือนที่อุณหภูมิห้อง



ภาพที่ 4.25 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) และสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าผสมกับกรดแอซีติก (EA) ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 5 เดือน



ภาพที่ 4.26 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นสารประกอบฟลาโวนอยด์ (TFC) ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) และ สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าผสมกับกรดแอซีติก (EA) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 5 เดือน

ตารางที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงค่า MIC และ MBC ระหว่างการเก็บรักษาของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) และสกัดหยาบจากเมล็ดหว้าผสมกรดแอซีติก (EA) ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S.* Typhimurium ที่อุณภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 5 เดือน

S. Typhimurium	เดือนที่ 0-3		เดือนที่ 4		เดือนที่ 5	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
E (mg/ml)	3.13	6.25	6.25	12.5	6.25	12.5
EA (mg/ml):(%w/v)	1.56: 0.39	3.13: 0.78	1.56: 0.39	3.13: 0.78	1.56: 0.39	3.13: 0.78

ตารางที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงค่า MIC และ MBC ระหว่างการเก็บรักษาของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) สกัดหยาบจากเมล็ดหว้าผสมกรดแอซีติก (AE) ต่อเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่อุณภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 5 เดือน

E.coli	เดือนที่ 0-3		เดือนที่ 4		เดือนที่ 5	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
E (mg/ml)	3.13	6.25	6.25	12.5	6.25	12.5
EA (mg/ml):(%w/v)	1.56: 0.39	3.13: 0.78	1.56: 0.39	3.13: 0.78	1.56: 0.39	3.13: 0.78

ตารางที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงค่า MIC และ MBC ระหว่างการเก็บรักษาของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า (E) สกัดหยาบจากเมล็ดหว้าผสมกรดแอซีติก (EA) ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่อุณภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 5 เดือน

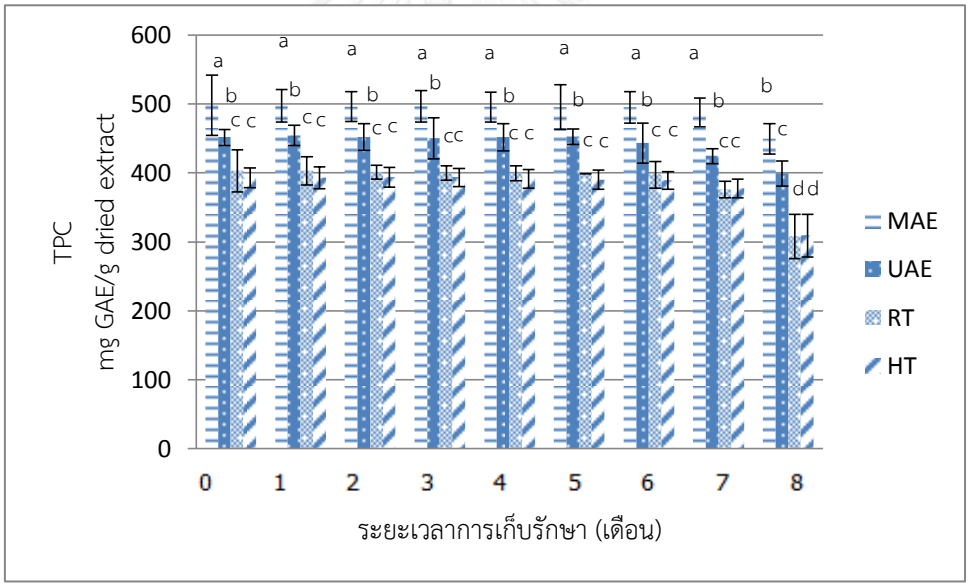
	เดือนที่ 1-3		**เดือนที่ 4**		**เดือนที่ 5**	
S. aureus	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**
E (mg/ml)	0.39	0.78	0.78	1.56	0.78	1.56
EA (mg/ml):(%w/v)	0.195: 0.195	0.39: 0.39	0.195: 0.195	0.39: 0.39	0.195: 0.195	0.39: 0.39

4.5 ศึกษาอายุการเก็บรักษาของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ

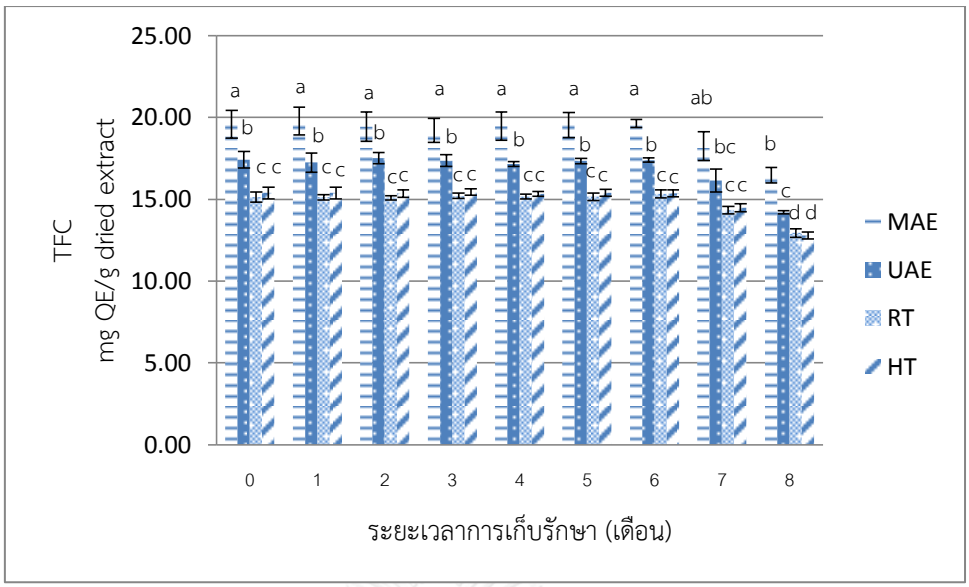
จากการทดลองพบว่าการสกัดด้วยวิธี MAE เป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการสกัดสารสกัดหยาบเมล็ดหว้ามาใช้ร่วมกับกรดอะซิติกเพื่อลดจำนวนแบคทีเรียในสะระแหน่ แม้ว่าวิธีการสกัดมีผลต่อความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ รวมทั้งฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า แต่การสกัดด้วยวิธีอื่นๆ ก็สามารถนำไปใช้ลดจำนวนแบคทีเรียได้เช่นกัน และอาจมีผลต่ออายุการเก็บรักษาด้วย จึงนำสารสกัดเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ มาเก็บในรูปสารละลายปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดสีชาขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 เดือน เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ TPC และ TFC รวมทั้งฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสกัดหยาบจากสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ พบว่าการสกัดทุกวิธีให้ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เริ่มต้นที่แตกต่างกัน โดยการสกัดด้วยวิธี MAE มีค่า TPC และ TFC สูงสุด (498.54±43.72 mg GAE/g dried extracts และ 19.59±0.84 mg QE/g dried extracts) ตามด้วยการสกัดด้วยวิธี UAE (451.54±11.60 mg GAE/g dried extracts และ17.43±0.51 mg QE/g dried extracts) RT (402.81±30.63 mg GAE/g dried extracts และ15.13±0.31 mg QE/g dried extracts) และ HT (392.78±14.21 mg GAE/g dried extracts และ15.39±0.37 mg QE/g dried extracts) อย่างไรก็ตาม RT และ HT มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ในระหว่างการเก็บรักษาสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าจากการสกัดทุกวิธีมีการเปลี่ยนแปลงของค่า TPC และ TFC โดยมีการลดลงแนวโน้มเดียวกันเมื่อเก็บในระยะเวลาที่นานขึ้น แสดงให้เห็นว่าอิทธิพลของวิธีการสกัดไม่มีผลต่ออายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เนื่องจากสารสกัดที่ได้จากทุกวิธีมีชนิดของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่ไม่แตกต่างกัน สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าจากทุกวิธีจึงเกิดการเปลี่ยนแปลงในแนวโน้มเดียวกัน โดยช่วงเดือนที่ 1-6 มีค่า TPC และ TFC ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าจากทุกวิธีลดลงอย่างช้าๆ และในเดือนที่ 7 มีการลดลงมากขึ้น เนื่องจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำสามารถชะลอการเสื่อมสลายของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ได้ (Stintzing และ Turek, 2013) อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบเมล็ดหว้ามีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในเดือนที่ 8 อาจเป็นเพราะจากระยะเวลาที่นานขึ้นอากาศสามารถละลายในน้ำซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าได้มากขึ้น จึงเกิดการสลายตัวของ

สารประกอบฟีนอลิก (Stintzing และ Turek, 2013) ซึ่งสารสกัดเมล็ดหว้ามีระยะเวลาการเก็บที่นานกว่าการรายงานของ Aguilar และคณะ (2015) ซึ่งได้รายงานว่าการลดอุณหภูมิทำให้เก็บรักษาสารสกัดได้นานมากขึ้น โดยการเก็บรักษาสารสกัดจากใบ *Anemopsis californica* ที่อุณหภูมิ 50, 25, 4 และ – 20 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถเก็บรักษาได้นานเป็นระยะเวลา 2, 3, 4 และ 6 เดือน ตามลำดับ เนื่องจากองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่แตกต่างกันจึงมีการเสื่อมสลายได้ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน (Ahmad และคณะ, 2012) โดยสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธี MAE มีค่า TPC และ TFC เท่ากับ 389.34±21.92 mg GAE/g dried extracts และ 16.47±0.51 mg QE/g dried extracts ตามลำดับ ตามด้วยการสกัดด้วยวิธี UAE (372.04±27.91 mg GAE/g dried extracts และ 14.20±0.31 mg QE /g dried extracts), RT 307.84±31.90 mg GAE/g dried extracts และ 12.94±0.37 mg QE/g dried extracts) และ HT (309.16±31.03 mg GAE/g dried extracts และ 12.79±0.51 mg QE/g dried extracts) อย่างไรก็ตาม RT และ HT มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ผลแสดงดังภาพที่ 4.27 และ 4.28



ภาพที่ 4.27 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิก (TPC) ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 เดือน



ภาพที่ 4.28 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (TFC) ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 เดือน

เมื่อพิจารณาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิด พบว่าสารสกัดหยาบจากการสกัดทุกวิธีมีค่า MIC และ MBC เริ่มต้นเท่ากับ 3.13 และ 6.25 mg/ml เมื่อทดสอบกับเชื้อ *S.* Typhimurium และ *E. coli* ส่วนการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยวิธี MAE และ UAE มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.78 และ 1.56 mg/ml ส่วน RT และ HT มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 1.56 และ 3.13 mg/ml ตามลำดับ เนื่องจากความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้ามีผลต่อฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ดังนั้นในระหว่างการเก็บรักษาสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส ทำให้สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดทุกวิธีมีค่า TPC และ TFC ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในเดือนที่ 8 จึงต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าจากทุกวิธีที่สูงขึ้นในการยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ในเดือนที่ 8 ด้วย จึงมีค่า MIC และ MBC เพิ่มขึ้นจากค่าเริ่มต้นเท่าตัวจากค่าเริ่มต้น หรือกล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบเมล็ดหว้ามีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียลดลง ผลแสดงดังตารางที่ 4.17-4.19 ดังนั้นสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าจากการสกัดทุกวิธีสามารถเก็บรักษาได้ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส ได้เป็นระยะเวลา 7 เดือนก่อนฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียลดลง

ตารางที่ 4.13 การเปลี่ยนแปลงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S.* Typhimurium ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 เดือน

	เดือนที่ 1-7		เดือนที่ 8	
S. Typhimurium	MIC	MBC	MIC	MBC
MAE	3.13	6.25	6.25	12.5
UAE	3.13	6.25	6.25	12.5
RT	6.25	12.5	12.5	25
HT	6.25	12.5	12.5	25

ตารางที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ต่อเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 เดือน

	เดือนที่ 1-7		เดือนที่ 8	
E. coli	MIC	MBC	MIC	MBC
MAE	3.13	6.25	6.25	12.5
UAE	3.13	6.25	6.25	12.5
RT	6.25	12.5	12.5	25
HT	6.25	12.5	12.5	25

ตารางที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 เดือน

	เดือนที่ 1-7		เดือนที่ 8	
S. aureus	MIC	MBC	MIC	MBC
MAE	0.39	0.78	0.78	1.56
UAE	0.39	0.78	0.78	1.56
RT	0.78	1.56	1.56	3.13
HT	0.78	1.56	1.56	3.13

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

วิธีการสกัดมีผลต่อความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมทั้งปริมาณสารสกัดแห้ง โดยสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่ใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัด (MAE) มีความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มากสุด นอกจากนั้นยังให้ปริมาณสารสกัดแห้งสูงสุดด้วย แม้ว่าสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียไม่ต่างจากการใช้คลื่นอัตราโซนิคช่วยในการสกัด (UAE) ส่วนการใช้กรดอินทรีย์ร่วมกับสารสกัดหยาบเมล็ดหว้านั้นมีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ในการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย โดยการใช้ร่วมกับกรดแอซีติกสามารถเพิ่มฤทธิ์การลดจำนวนแบคทีเรียได้มากกว่าการใช้ร่วมกับกรดแลกติก เมื่อนำกรดแอซีติกมาใช้ร่วมกับสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าทำให้จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และเชื้อ *E. coli* ในสะระแหน่หลังการแช่ลดลงได้มากสุดแต่มีผลต่อการซ้ำของสะระแหน่ จึงลดความเข้มข้นของกรดแอซีติกเท่ากับ 0.25 MBC แล้วใช้ร่วมกับสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้น 0.75 MBC ทำให้สะระแหน่ไม่ซ้ำรวมทั้งยังลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดและเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ไม่ต่างกันด้วย นอกจากนั้นกรดแอซีติกยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) โดยทำให้สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เสื่อมสลายของได้ช้าลง จึงมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้นานขึ้น โดยสามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลา 5 เดือนก่อนฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียลดลง ส่วนสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ เมื่อนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลา 7 เดือนก่อนฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียลดลงระยะเวลาเดียวกัน ดังนั้นวิธีการสกัดจึงไม่มีผลต่ออายุการเก็บของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้า

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5.2 ข้อเสนอแนะ

สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียได้ในระดับหนึ่ง แต่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพด้วยการใช้ร่วมกับกรดแอซีติก อย่างไรก็ตามกรดแอซีติกมีฤทธิ์กัดกร่อนทำให้เป็นข้อจำกัดในการใช้ จึงควรเลือกใช้กับตัวอย่างที่เหมาะสมเพื่อใช้ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรดแอซีติกได้สูงสุด

หากพิจารณาต้นทุนในการผลิตพบว่าผงเมล็ดหว้า 100 กรัม ให้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าประมาณ 17 กรัม เมื่อนำมาละลายน้ำเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้นเท่ากับ 1 MBC (6.25 มิลลิลิตร) ได้ปริมาตร 2,720 มิลลิลิตร ซึ่งสามารถนำไปใช้กับสะระแหน่ได้ 115 กรัม แต่การใช้กรดแอซีติกซึ่งเป็นสารที่หาได้ง่ายและมีราคาถูก ร่วมกับกับสารสกัดหยาบเมล็ดหว้าความเข้มข้นเท่ากับ 0.75 MBC หรือเท่ากับ 4.69 มิลลิลิตร สามารถเตรียมสารละลายได้ปริมาตรประมาณ 3,625 มิลลิลิตร แล้วนำไปใช้กับสะระแหน่ได้ 181 กรัม ดังนั้นการใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าร่วมกับกรด

แอซีติก นอกจากสามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้มากขึ้นแล้วยังเป็นการลดการใช้สารสกัดหยาบเมล็ดหว้าซึ่งเป็นการลดต้นทุน รวมทั้งใช้กับสะระแหน่ได้มากขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

Afolayan, A. J., and Olajuyigbe, O. O. (2012). Invitro antibacterial and time-kill evaluation of the *Erythrina caffra* Thunb. extract against bacteria associated with diarrhoea. *The Scientific World Journal* **2012**, 1-8.

Aguilar, J. A., Cervantes, E. L., Cruz, S. R., A.García, M., Lomelí, M. G., Medina, P. J., Rio, J. A., Sánchez, C. L., and Zurita, F. (2015). Storage effect on phenols and on the antioxidant activity of extracts from *Anemopsis californica* and inhibition of elastase enzyme. *Journal of Chemistry* **2015**.

Ahmad, I. Z., Ansari, S., Fareed, S., Hussain, S., Rahman, A., and Saeed, M. (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* **4**, 10-20.

Akiyama, H., Fujii, K., Iwatsuki, K., Oono, T., and Yamasaki, O. (2011). Antimicrobial action of several tannin againt *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **48**, 487-491.

Akowuah, G. A., Chin, J. H., and Mariam, A. (2009). The effect of extraction temperature on total phenols and antioxidant activity of Gynura procumbens leaf. *Pharmacognosy Magazine* **5**, 81-85.

Annegowda, H. V., Hamdan, M. R., Mansor, S. M., Mordi, M. N., and Ramanathan, S. (2012). Effect of extraction techniques on phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of *Bauhinia purpurea*: HPTLC determination of antioxidants. *Food Analytical Methods* **5**, 226–233.

AOAC Research Institute (2013). "Certificate of performance tested[sm] status. Certificate no. 110402," AOAC International.

Banerjee, J., and Narendhirakannan, R., T. (2011). Phytochemical analyses antibacterial in vitro antioxidant and cytotoxic activities of ethanolic extract of *Syzygium cumini* (L.) seed extract. *International Journal of food Pharmaceutical Sciences and Research* **2**, 1799-1806.

Barros, J. C., Conceição, M. L., Costa, A. C., Neto, N. J., and Souza, E. L. (2009). Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in food. *Brazilian Journal of Microbiology* **40**, 387-393.

Barros, J. C., Conceição, M. L., Costa, A. C., Neto, N. J., and Souza, E. L. (2012). Combination of *Origanum vulgare* L. essential oil and lactic acid to inhibit

Staphylococcus aureus in meat broth and meat model. *Brazilian Journal of Microbiology* **2012**, 1120-1127.

Beral, Y., and Ghellai, L. (2015). Antibacterial efficacy of essential oil of *Thymus capitatus*, lactic acid and acetic acid against Escherichia coli in craw chicken meat. *International Journal of Advanced Multidisciplinary Research* **2**, 42–47.

Bermudez, K., Cardenas-Sandoval, B. A., Lopez-Laredo, A. R., Mart, B. P., and Trejo, G. (2012). Advances in the phytochemistry of *Cuphea aequipetala, C. aequipetala* var. *hispida* and *C. lanceolata*: Extraction and quantification of phenolic compounds and antioxidant activity. *11* **3**, 401-413

Bigoniya, P., Singh, C., and Srivastava, B. (2012). Pharmacognostical and physico-chemical standardization of *Syzygium cumini* and *Azadirachta indica* seed. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2012**, 290-295.

Boles, J. S., Crerar, D. A., Grissom, G., and Key, T. C. (1988). Aqueous thermal degradation of gallic acid. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **52**, 343-344.

Borges, Ferreira C., Saavedra M.J., and Simões M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance Journal* **19**, 256-65.

Brown, L., Casadevall, A., Rosales, R. P., and Wolf, J. M. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology* **13**, 620–630.

Cao, J., Jiang, W., Lv, Y., and Tian, W. (2014). Retention of iceberg lettuce quality by low temperature storage and postharvest application of 1-methylcyclopropene or gibberellic acid. *Journal of Food Science and Technology* **51**, 943–949

Castro, L. d., and Garcia, L. (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry* **22**, 41-47.

Chairez, I., Poznyak, T., Tapia, R., and Vivero, J. (2006). Effect of pH to the decomposition of aqueous phenols mixture by ozone. *Journal of the Mexican Chemical Society* **50**, 28-35.

Chandrasekaran, M., and Venkatesalu, V. (2004). Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. *Journal of ethnopharmacology* **91**, 105-8.

Chang, C., Chern, J., Wen, H., and Yang, M. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* **10**, 178-182.

Chemat, F., and Cravotto, G. (2013). "Microwave-assisted extraction for bioactive compounds," Springer US.

Chen, F., Lin, J., Wang, Z., and Zheng, N. (2011). Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from Syzygium jambos seeds and optimization by response surface methodology. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **5**, 2411-2419

CLSI (2006). "Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow gerobically; approved standard—seven edition," Clinical and Laboratory Standards Institute USA.

Cochran, W. G., and Cox, G. M. (1992). "Experimental Designs, 2nd Edition."

Cushnie, T., and Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* **26**, 343–356.

Dai, J., and Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313-7352.

Damianova E., Dimitrova M., Hristova L., Kapchina T., Petrova N., and Yordanova Y. (2013). Antioxidant activity and secondary metabolites in different extracts of *Euphrasia officinalis* L. growing in Bulgaria. *Journal Science and Technology* **1**, 128-132.

Dukić, N. M., Mandić, A. I., Milovanović, I. L., Mišana, A. Č., Marijana, B. S., and Sedej, I. J. (2011). Development of a rapid resolution HPLC method for the separation and determination of 17 phenolic compounds in crude plant extracts. *Central European Journal of Chemistry* **9**, 133-142

Duodu, K. G., and Sikwese, F. E. (2007). Antioxidant effect of a crude phenolic extract from sorghum bran in sunflower oil in the presence of ferric ions. *Food Chemistry* **104**, 324–331.

Erge, H. S., Karaden, F., Koca, N., and Soyer, Y. (2008). Effect of heat treatment on chlorophyll degradation and color loss in green peas. *the Journal of Food* **33**, 225-233.

Gao, M., and Liu, C. Z. (2005). Comparison of techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa Maxim*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **21**, 1461–1463.

Gong, X., Ma, F., Xie, Y., Zhao, Y., and Zhou, X. (2014). Optimization of quercitrin and total flavonoids extraction from Herba Polygoni Capitati by response surface methodology. *Pharmacogn Mag* **10**, 57-64.

Guo, N., Hay, J. W., Teh, C. Y., and Wu, T. Y. (2013). "Advances in ultrasound technology for environmental remediation," Springer Netherlands.

Gupta, S., Kothari, V., and Punjabi, A. (2009). Optimization of microwave assisted extraction of *Annona squamosa* seeds. *The IUP Journal of Life Sciences* **3**, 55-60.

Häkkinen, S. (2000). Flavonols and phenolic acids in berries and berry products, Kuopio University, Finland.

Haldankar, P. M., Patil, M. M., Thakor, N. S., and Swami, S. B. (2012). Jamun (*Syzygium cumini* (L.)): a review of its food and medicinal uses. *Food and Nutrition Sciences* **3**, 1100-1117

He, M., Pan, S., Qiu, T., Wu, T., Xu, X., Zang, X., and Zhou, Y. (2013). A structure–activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. *Biochimica et Biophysica Acta* **1828**, 2751–2756.

Henie, Zaiton, H., and Suhaila, M. (2009). Bacterial membrane disruption in food pathogen by *Psidium guajava* leaf extract. *International Food Research Journal* **16**, 297-311.

Himanshu, D., Karishma, R., and Usha, M. (2015). Polyphenols: methods of extraction. *Scientific Review and Chemical Communication* **5**, 1-6.

Ince, A. E., Sahin, S., and Sumnu, G. (2014). Comparison of microwave and ultrasound-assisted extraction techniques for leaching of phenolic compounds from nettle. *The Journal of Food Science and Technology* **51**, 2776–2782.

Kabir, F., Tanji, N., Katayama, S., and Nakamura, S. (2014). Antimicrobial effects of chlorogenic acid and related compounds. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* **57**, 359–365.

Khanaq, H. N. (2014). Antibacterial activity of organic acids and an aqueous lime-peel extract against selected foodborne pathogens University of Plymouth, UK.

Khoddami, A., Roberts, T. H., and Wilkes, M. A. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* **18**, 2328-2375.

Kornacki, J. L. (2010). "Principles of microbiological troubleshooting in the industrial food processing environment," Springer, New York.

Kothari, V., Mehta, P., and Seshadri, S. (2011). Fractionation of antibacterial extracts of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) seeds. *Research in Biotechnology* **2**, 53-63.

Kumar, S., and Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal* **2013**, 1-16.

Lin, Y. T., Labbe, R. G., and Shetty, K. (2004). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. *Appled and Enviromental Microbiology* **70**.

López, E. M., García , H. S., and López, M. A. (2011). Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International* **45**, 713–721.

Lorimer, J. P., Mason, T. J., and Paniwnyk, L. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics sonochemistry* **3**, 253-S260.

Lues, J. F., and Theron, M. M. (2007). Organic acids and meat preservation: a review. *Food Reviews International* **23**, 141-158.

Ma, L., Su, Y., Wang, H., Wen, Y., and Zhang, S. (2014). Studies of the in vitro antibacterial activities of several polyphenols against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules* **19**.

Mandalari, A., Bennett, R. N., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C. B., Gasson, M. J., and Narbad, A. (2007). Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia Risso*) peel, a byproduct of the essential oil industry. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1364-5072.

Modi, D. C., Nayak, B. S., Patel, J. K., and Shah, B. N. (2010). Pharmacognostic studies of the seed of *Syzygium cumini* Linn. *Pharma science monitor an international journal of pharmaceutical sciences* **1**, 20-26.

Orsat, V., and Routray, W. (2012). Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food Bioprocess Technol* **2012**, 409–424.

Özcan, E. (2006). Ultrasound assisted extraction of phenolics from grape pomace, Middle east technical university, Turkish.

Peijnenburg, H. (2005). Development of organic acids and essential oils. *International Pig Topics* **20**, 11-13.

Shah, R. M., Shah, A. S., and Shah, M. B. (2012). Estimation of ferulic acid in Syzygium cumini seed extract by HPLC. *International journal of pharmaceutical and chemical sciences* **1**, 201-204.

Srivastava, A. (2006). Effect of storage conditions on phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry extract and the effect of anthocyanins from selected cultivars of Georgia-grown blueberries on apoptosis and phase-ii enzymes, The University of Georgia, U.S.

Stintzing, F. C., and Turek, C. (2013). Stability of Essential Oils: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **12**, 40–53.

Suslick, K. S. (1994). "The year of book of science and future," Encyclopedia Britannica, Chicago.

Tirpanalan , Ö., Zunabovic, M., Domig, K. J., and Kneifel, W. (2011). Mini review: Antimicrobial strategies in the production of fresh-cut lettuce products.

Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances **1**, 176-188.

Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry* **8**, 303-313.

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2556). "ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์เรื่อง กำหนดพืชเป็นพืชควบคุมเฉพาะ พ.ศ. ๒๕๕๖."" ราชกิจจานุเบกษา 14 พฤศจิกายน 2556.

กานต์ แย้มพงษ์ และ อรอินทุ์ ประไชโย (2554). ประสิทธิภาพของสารละลายกรดอินทรีย์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในผักสลัด : กะหล่ำปลี. ราชภัฏเพชรบูรณ์สาร **13**, 79-87

ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์ และ สุภา อโนธารมณ์ (2548). "รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม ปี 2548," กรมวิชาการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร, กรุงเทพฯ.

ตรีอุบล แก้วหย่อง และ บวรศักดิ์ ลีนานนท์ (2553). ผลของสารฆ่าเชื้อและสารลดแรงตึงผิวในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ดั้งเดิมและ *Salmonella* Typhimurium ในโหระพาระหว่างปฏิบัติการหลังการเก็บเกี่ยว. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร **41**, 345-348.

นิตยา เขียวอ่อน (2550). การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระในลูกหว้า. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาเคมีบัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยศิลปากร.

บุษกร ทองใบ (2556). ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดอะซิติกและสารสกัดขาต่อ *Staphylococcus aureus* ที่ปนเปื้อนผักชี. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร **44**, 307-310.

บุษกร ทองใบ, พิชาภรณ์ แผ้วพลสง และ สาวิตรี ทวีพร (2557). ผลของสารสกัดจากกาบมะพร้าวและกรดฟูมาริกต่อจุลินทรีย์ในโหระพาสด. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ฉบับพิเศษ 530-536.

ประกาศกรมวิชาการเกษตร (2558). "มาตรการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย *Escherichia coli* (*E.coli*) และ Salmonella ในผักสดกอนสงออกไปนอกราชอาณาจักร (ฉบับที่ 3)."ราชกิจจานุเบกษา 19 มกราคม 2559.

ผดุงศักดิ์ รัตนเดโช (2551). "พื้นฐานการทำความร้อนด้วยไมโครเวฟ," พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

พจนา สุภาสูรย์, วฤษณี ขาวเขียว และ อวยชัย สมิตะศิริ (2549). การตรวจติดตามเชื้อ *Escherichia coli* (*E.coli*) และ *Salmonella* ในผักส่งออก ใน "ผลงานฉบับเต็มขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 8ว. ". กลุ่มพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออก สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ

เพ็ญวิภา บัลลังโพธิ์ (2556). ประสิทธิภาพของสารสกัดเมล็ดหว้า Syzygium cumini (L.) Skeels ต่อการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.* และการประยุกต์กับใบโหระพา. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มนต์จันท์ คำยา และ วราภา มหากาญจนกุล (2548). การใช้สารสกัดหยาบจากแบคทีเรียกรดแลคติกลดปริมาณ *Salmonella* Typhimurium ในผักพร้อมบริโภค ใน "การสัมมนาทางวิชาการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวหลังการผลิตแห่งชาติ ครั้งที่ 3 ". สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, เพชรบุรี

มัลลิกา ปัญญาคะโป และ ผ่องศรี เผ่าภูรี (2550). การเกิดสารไตรฮาโลมีเทนในน้ำประปาที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคด้วยคลอรีน กรณีตัวอย่างระบบประปาของเทศบาลนครปฐม. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศิลปากร.

วราภรณ์ วิทยสินธนา (2550). การใช้คลื่นไมโครเวฟช่วยในการสกัดสารต้านมะเร็งแดมนาแคนธัลจากรากของต้นยอ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วราภา มหากาญจนกุล , ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์ และวชิราภรณ์ เทียมพันธ์ (2544). การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *Escherichia coli* ในผักใบ. ใน "การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39", 410-416, กรุงเทพฯ.

วิทยา ทรัพย์เย็น (2550). ผลของการบริบูรณ์ต่อปริมาณฟลาโวนอยด์บางชนิด และคุณสมบัติต้านออกซิเดชันในผลหว้า (*Syzygium cumini*). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศศิวิมล แสวงผล, เชฏฐ์ สาทรกิจ และ ทยา เจนจิตติกุล (2546). "สารานุกรมผลิตผลและผลิตภัณฑ์จากพืชในซุปเปอร์มาร์เก็ต ฉบับคอมพิวเตอร์ " ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

ศิวาพร ศิวเวชช (2529). "วัตถุเจือปนอาหาร," พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตรและสำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช กรมวิชาการเกษตร (2554). "การจัดการผักและผลไม้สดเพื่อส่งออกไปสหภาพยุโรป" พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ บริษัท อาร์ต ควอลิไฟท์ จำกัด.

สิรินาฏ พรศิริประทาน (2554). "การส่งออกผักและผลไม้สดไทยไปสหภาพยุโรป," สถาบันระหว่างประเทศเพื่อการค้าและการพัฒนา, กรุงเทพฯ.

สุปรีณา ศรีใสคำ (2552). ผลของการใช้ใบและก้านสะเดาในอาหารแพะเนื้อต่อกระบวนการหมักในกระเพาะหมักและสมรรถนะการผลิต. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีเทคโนโลยีการผลิตสัตว์มหาวิทยาลัยเทคโนโนยีสุรนารี

สุมณฑา วัฒนสินธุ์ (2549). ตำราจุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมีและวิธีวิเคราะห์

ก.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

ก.1.1 การเตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิก

เตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิก ความเข้มข้นเริ่มต้น1มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ก.1.2 การเตรียมสารละลายโฟลิน-ซิโอแคลทูความเข้มข้นร้อยละ10 โดยปริมาตร

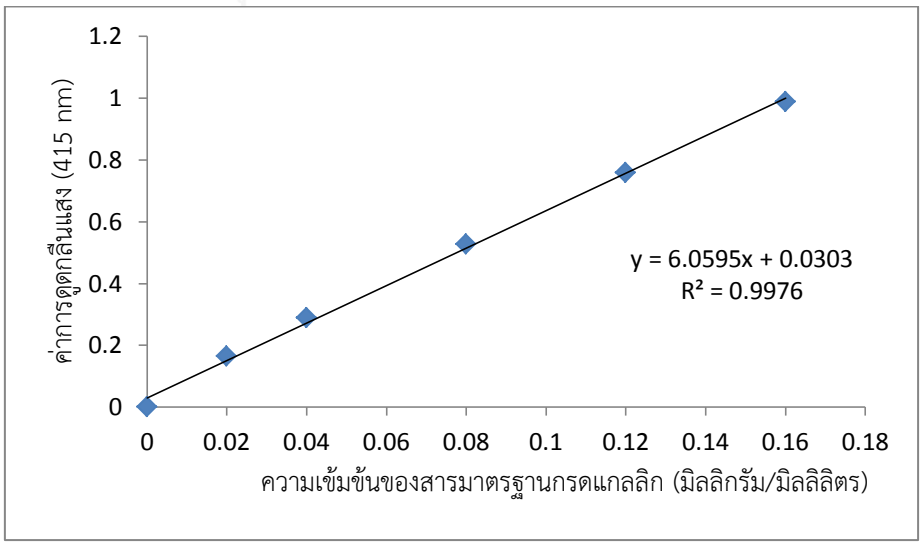
ปิเปตสารละลายโฟลิน-ซิโอแคลทู ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ก.1.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยปริมาตร

ชั่งสารโซเดียมคาร์บอเนต 7.00 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

ก.1.4 การเตรียม

ปิเปตสารมาตรฐานกรดแกลลิก 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโฟลิน-ซิโอแคลทูความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7 ปริมาตร 1.4 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมสารด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เตรียมแบลงก์ (blank) โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารมาตรฐาน



ภาพที่ ก.1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ก.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานเควอร์เซทิน

ก.2.1 การเตรียมสารมาตรฐานเควอร์เซทิน

เตรียมสารมาตรฐานเควอร์เซทิน ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ก.2.2 การเตรียมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 10

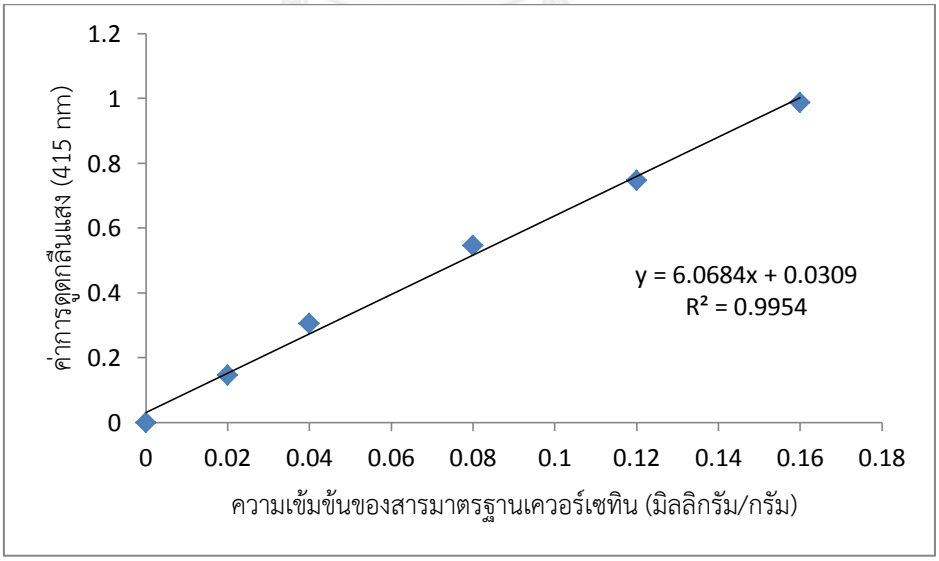
ชั่งสารอะลูมิเนียมคลอไรด์ 10.00 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

ก.2.3 การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ชั่งสารอะลูมิเนียมคลอไรด์ 9.82 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

ก.2.4 การเตรียม

ปิเปตสารละลายมาตรฐานเควอร์เซทินปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเติมเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร สารละลายโพแทสเซียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร (vortex mixer) ตามลำดับ ผสมสารด้วยเครื่องผสม ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร เตรียมแบลงก์ (blank) โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารมาตรฐาน

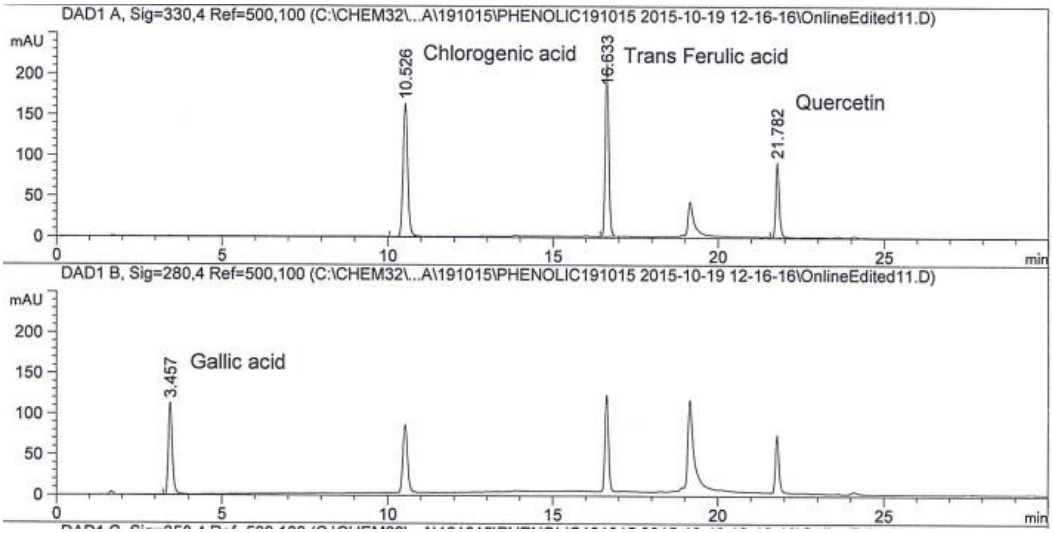


ภาพที่ ก.2 กราฟมาตรฐานเควอร์เซทิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ก.3 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ตารางที่ ก.1 retention time ของสารมาตรฐานที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

สารมาตรฐาน	retention time (นาที)
กรดแกลลิก	3.457
กรดคลอโรจีนิก	10.526
กรดเฟอรูลิก	16.633
เควอซิทิน	21.782



ภาพที่ ก.3 โครมาโตแกรมสารมาตรฐานของกรดแกลลิก, กรดคลอโรจีนิก, กรดเฟอรูลิก และเควอซิทิน ความเข้มข้น 30 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ภาคผนวก ข
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ข.1 มุลเลอร์ ฮินตัน อาการ์ (Mueller Hinton agar; MHA)

ชั่งอาหาร MHA 34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

ข.2 มุลเลอร์ ฮินตัน บรอท (Mueller Hintonbroth; MHB)

ชั่งอาหาร MHB 21 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

ข.3 นิวเทรียน อาการ์ (Nutrient agar; NA)

ชั่งอาหาร NA 23 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

ข.4 เพลทเคานท์ อาการ์ (Plate count agar; PCA)

ชั่งอาหาร PCA 23.5กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

ข.5 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ความเข้มข้นร้อยละ 0.85

ชั่งสารโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

ข.6 เปปโตนวอเตอร์ (peptone water) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

ชั่ง peptone water0.1กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค
สารเคมี

ค.1 กรดแลกติก

Corbion
purac

Product Data
Rev.No.6/0306

PURAC® FCC 88

Description

PURAC FCC 88 is the natural L-Lactic acid, which is produced by fermentation from sugar. It has a mild acid taste and is widely used as an acidulant in the food industry. PURAC#s primary functions are to preserve and flavor.

Specification	Product name	L-Lactic Acid FCC Special 88
	Form	liquid
	Grade	edible special
	Color fresh	max. 50 Apha
	Color after 6 month	max. 50 Apha
	Odor	agreeable
	Assay	87.5-88.5 % (w/w)
	Positive for lactate	*passes test
	Relative density 20 °C	1.20-1.22 g/ml
	Sulfated ash / residue on ignition	max. 0.1 %
	Heavy metals total	max. 10 ppm
	Iron	max. 10 ppm
	Lead	max. 0.5 ppm
	Mercury	max. 1 ppm
	Cyanide	max. 5 mg/kg
	Citric, oxalic, phosphoric, tartaric acid	*passes test FCC
	Arsenic (as As)	max. 1 ppm
	Calcium	max. 20 ppm
	Chloride	max. 10 ppm
	Sulphate	max. 20 ppm
	Reducing sugars	passes test FCC
	Readily carbonizable substances	*passes test
	Volatile fatty acids	*passes test
	Methanol / methylesters (as methanol)	*max. 0.20 (v/w)
	Ether insolubles	*max. 0.7 % (w/w)
Physical-chemical-properties	Molecular formula	$CH_3CHOHCOOH$
	Molecular weight	90
	Chemical name	2-hydroxypropionic acid
Registration	CAS number	79-33-4 (general 50-21-5)
	EEC Additive number	E 270
	GRAS status	21CFR184.1061
	Complies with	FCC, JSFA, 231/2012/EC

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นางสาวอรวรรณ ศิริเวทย์วุฒิ เกิดวันที่ 9 มีนาคม 2532 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วุฒิการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ปีการศึกษา 2553 และได้ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาคปลาย ปีการศึกษา 2554

เข้าร่วมงานประชุมวิชาการ 1st Joint ACS AGFD – ACS ICSCT Symposium on Agricultural and Food Chemistry โรงแรมมณเฑียร ริเวอร์ไซด์ วันที่ 4-5 มีนาคม 2014 ในหัวข้อ The effect of extraction methods on total phenolic content, total flavonoid contentand antimicrobial of Jambolan Syzygium cumini (L.) Skeels seed extracts.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University