



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การใช้อัลตราโซนิกช่วยสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากกระเทียมเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ

Escherichia Coli

Ultrasonic-assisted Extraction of Bioactive Compounds from Garlic for Growth

Inhibition of *Escherichia Coli*

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย

ประจำปี 2559

จำนวน 272,500 บาท

หัวหน้าโครงการ

นางสาวหยาดฝน ทนงการกิจ ✓

ผู้ร่วมโครงการ

นายพูนพัฒน์ พูนน้อย

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

21 ส.ค. 60



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การใช้อัลตราโซนิกช่วยสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากกระเทียมเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ
Escherichia Coli
Ultrasonic-assisted Extraction of Bioactive Compounds from Garlic for Growth
Inhibition of *Escherichia Coli*

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2559

จำนวน 272,500 บาท

หัวหน้าโครงการ

นางสาวหยาดฝน ทนงการกิจ

ผู้ร่วมโครงการ

นายพูนพัฒน์ พูนน้อย

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

21 สค. 61

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การใช้อัลตราโซนิกช่วยสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากกระเทียมเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia Coli* (Ultrasonic-assisted Extraction of Bioactive Compounds from Garlic for Growth Inhibition of *Escherichia Coli*) ได้สำเร็จลุล่วง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2559 ผู้วิจัยขอขอบคุณ สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ที่อนุเคราะห์เรื่องสถานที่ และอุปกรณ์บางอย่างที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยให้เสร็จสมบูรณ์

คณะผู้วิจัย



สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
ขอบเขตของงานวิจัย	5
การตรวจเอกสาร	6
อุปกรณ์และวิธีการ	17
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย	23
สรุปผลวิจัย	27
เอกสารอ้างอิง	28

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	ปริมาณของสารฟีนอลิกรวมและสารอัลลิซินที่สกัดได้ด้วยวิธีดั้งเดิม
ตารางที่ 2	ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งของสารสกัดต่อเชื้อ <i>E.coli</i>



สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1	ลักษณะต้นและหัวกระเทียม
รูปที่ 2	ปฏิกิริยาการเกิดอัลลิซิน
รูปที่ 3	การสกัดทางอ้อมโดยใช้อ่างน้ำอัลตราโซนิก
รูปที่ 4	การสกัดโดยตรงโดยใช้อ่างน้ำอัลตราโซนิก
รูปที่ 5	การสกัดโดยตรงโดยใช้โพรบหรือฮอร์นอัลตราโซนิก
รูปที่ 6	ลักษณะของเชื้อ <i>E. coli</i> ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
รูปที่ 7	ขั้นตอนการดำเนินงานในกระบวนการสกัดแบบดั้งเดิม
รูปที่ 8	ขั้นตอนการดำเนินงานในกระบวนการสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิก
รูปที่ 9	ปริมาณสารฟีนอลิกที่สกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิกที่แอมพลิจูดและเวลาต่างๆ
รูปที่ 10	ปริมาณสารอัลลิซินที่สกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิกที่แอมพลิจูดและเวลาต่างๆ
รูปที่ 11	บริเวณยับยั้งของสารสกัดที่จากกระเทียมต่อเชื้อ <i>Escherichia coli</i>

การใช้อัลตราโซนิกช่วยสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากกระเทียมเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ

Escherichia Coli

Ultrasonic-assisted Extraction of Bioactive Compounds from Garlic for Growth

Inhibition of *Escherichia Coli*

หยาดฝน ทนงการกิจ¹ และ พูนพัฒน์ พูนน้อย¹

Yardfon Tanongkankit¹ and Poonpat Poonnoi¹

¹คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

กระเทียมเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระและด้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเช่น สารฟีนอลิกและสารอัลลิซิน โดยจากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการสกัดสารนี้ด้วยวิธีดั้งเดิมคือการละลายในตัวทำละลาย ซึ่งพบว่าปริมาณสารสกัดที่ได้จากวิธีการดั้งเดิมนี้มีปริมาณน้อยและใช้เวลาในการสกัดนาน จึงอาจส่งผลต่อการสลายตัวของสารสำคัญได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาการใช้อัลตราโซนิกในการสกัดสารฟีนอลิกและสารอัลลิซินจากกระเทียมเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* โดยใช้เอมพลิจูดที่ 30% 60% และ 90% ที่เวลาการสกัดต่างๆ โดยผลการศึกษาพบว่า การใช้คลื่นอัลตราโซนิกช่วยสกัดสารฟีนอลิกและสารอัลลิซินทำให้ได้ปริมาณมากกว่าการสกัดแบบดั้งเดิมประมาณ 2 เท่าและช่วยลดระยะเวลาที่ใช้สกัด โดยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดคือ การสกัดที่เอมพลิจูด 60% เวลาการสกัด 40 นาที เมื่อพิจารณาจากค่าปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุดเท่ากับ 351.48 ± 45.11 mg gallic equivalence/g ของสารสกัดและปริมาณอัลลิซินสูงสุดเท่ากับ 63.16 ± 5.09 mg/100 ml และมีค่าเฉลี่ยการยับยั้งของสารสกัดเชื้อ *Escherichia coli* ไม่แตกต่างกับสารกันเสียเคมี (โซเดียมเบนโซเอต) ที่ความเข้มข้น 0.1 W/V อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำสำคัญ: กระเทียม การสกัด ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ อัลตราโซนิก อัลลิซิน

Abstract

Garlic is an herb plant containing bioactive compounds such as phenolic compounds and allicin which possess antioxidant and antibacterial activities. Previous works reported that conventional extraction of these compounds by solvent extraction resulted in low level of yield and long extraction time that might cause degradation of the extracted compounds. Thus, this research aimed at studying ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds and allicin for growth inhibition of *Escherichia coli* at amplitude of 30% 60% and 90% for different extraction times. The results showed that yield of phenolic compounds and allicin using ultrasonic-assisted extraction was 2 times as high as that conventional extraction with shorter extraction time. Moreover, the condition of ultrasonic-assisted extraction at amplitude of 60% for 40 min was recommended for phenolic and allicin extraction with the highest yield of phenolic compounds and allicin about 351.48 ± 45.11 mg gallic acid/ml of extract and 63.16 ± 5.09 mg/ml. The results was also observed that average of inhibition zone using ultrasonic-assisted extraction did not significantly different when compared with 0.1% W/V chemical preservative (sodium benzoate).

Keywords: Antimicrobial, Allicin, Extraction, Garlic, Ultrasonic

คำนำ

อาหารเป็นปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญของมนุษย์ในการดำรงชีวิต การบริโภคอาหารที่สะอาดและมีคุณภาพปราศจากการปนเปื้อนของสารเคมีและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคนั้นย่อมส่งผลที่ดีต่อสุขภาพของผู้บริโภค แต่อย่างไรก็ตามในสภาพแวดล้อมปัจจุบันที่เต็มไปด้วยมลภาวะที่เป็นพิษ รวมทั้งรูปแบบการผลิตอาหารที่เปลี่ยนแปลงไปจากการผลิตเพื่อบริโภคเฉพาะในครัวเรือนเป็นการผลิตในปริมาณมากเพื่อการจำหน่ายในระดับอุตสาหกรรม จึงมีการเติมสารเคมีบางชนิดเช่นสารกันเสีย เพื่อรักษาคุณภาพของอาหารและยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ส่งผลให้อาหารมีอายุการเก็บและการวางจำหน่ายที่ยาวนานมากขึ้น แต่ในการบริโภคสารเคมีที่เจือปนในอาหารนั้น หากร่างกายได้รับในปริมาณมากหรือได้รับติดต่อกันเป็นเวลานาน อาจส่งผลเสียต่อสุขภาพร่างกายของผู้บริโภคได้ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการศึกษาการใช้สารสกัดจากพืชและสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แทนการใช้สารเคมีมากขึ้น

สารสกัดจากพืชและสมุนไพรหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ เช่น สารสกัดสมุนไพรเบญจกานี เปลือกทับทิมและใบคุณสมารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium* ได้ดีกว่าการใช้ Amoxicillin (ประพฤษ และคณะ, 2555) สารสกัดจากใบพริกเผสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (วัชร และศศิธร, 2553; จิราภรณ์ และเรือนแก้ว, 2555) และสารสกัดจากกระเทียมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ได้ (Arora และ Kaur, 1999) สารสกัดจากขมิ้นชันสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* *Bacillus subtilis* *Escherichia coli* และ *Clostridium botulinum* (Ceylan และ Fung, 2004) วิธีการสกัดสารจากพืชนั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การสกัดแบบน้ำมันหอมระเหย การสกัดด้วยตัวทำละลาย การหมัก และการต้ม โดยการสกัดในแต่ละวิธีนั้นมีวัตถุประสงค์หลัก คือการแยก และทำให้สารที่ต้องการมีความบริสุทธิ์ ซึ่งในแต่ละวิธีนั้นยังมีข้อดีอยู่บางประการ เช่น ใช้อุณหภูมิสกัดที่สูง ตัวอย่างเช่นในกรณีการสกัดแบบน้ำมันหอมระเหยและการต้มทำให้สารสกัดที่ต้องการเกิดการเสื่อมสลาย การใช้เวลาการสกัดที่นาน เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลายและหมัก ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาวิธีการสกัดเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยการใช้คลื่นอัลตราโซนิกช่วยในการสกัด

คลื่นอัลตราโซนิกเป็นคลื่นที่มีความถี่สูงมากกว่า 20 กิโลเฮิรตซ์ จึงสามารถทำให้ผนังของเซลล์พืชเกิดการแตกออกเนื่องจากการเกิดปรากฏการณ์ Cavitation ซึ่งเป็นปรากฏการณ์อันเนื่องมาจากคลื่นประกอบด้วยช่วงอัดและช่วงขยาย ซึ่งในช่วงขยายเมื่อคลื่นเคลื่อนที่ผ่านตัวทำละลายจะทำให้เกิดฟองของตัวทำละลายขนาดเล็กจำนวนมาก เมื่อฟองได้รับแรงจากคลื่นในช่วงอัดจะทำให้ฟองนั้นแตกออกและเกิด Microjet ที่มีความแรงมาก จนสามารถเจาะเข้าไปทำลายผนังเซลล์ของพืชได้ เมื่อผนังเซลล์ของ

พืชแตกออกจะทำให้สารละลายสามารถชะสารสำคัญออกมาจากเซลล์พืชได้ดีขึ้น (ชุดิมา และคณะ, 2556; สุเมธ, 2557; Xu และ Pan, 2013) ส่งผลให้ใช้ต้นทุนและเวลาในการสกัดลดลง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการประยุกต์ใช้คลื่นอัลตราโซนิกในการช่วยสกัดมีเพิ่มมากขึ้น เช่น การใช้คลื่นอัลตราโซนิกช่วยในการสกัดอินนูลินจากหัวแก่นตะวัน (ชุดิมา และคณะ, 2556) สารฟีนอลิกจากข้าวสังข์หยด พัทลุง และสารไลโคปีนจากผลเกรปฟรุ๊ต (Xu และ Pan, 2013) เป็นต้น

อย่างไรก็ตามจากงานที่ผ่านมายังไม่พบรายงานการใช้คลื่นอัลตราโซนิกที่ใช้ในการสกัดสารจากพืชสมุนไพรเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาผลของการใช้คลื่นอัลตราโซนิกช่วยสกัดสารจากสมุนไพรที่สามารถหาได้ง่ายและมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์คือ กระเทียม ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ดัชนีบ่งชี้สุขลักษณะของอาหารและน้ำ



วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เปรียบเทียบวิธีการสกัดสารจากกระเทียมแบบสกัดหยาบและใช้คลื่นอัลตราโซนิก
2. ศึกษาผลของปัจจัยในการสกัดสารจากกระเทียมด้วยคลื่นอัลตราโซนิกต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*
3. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้อัลตราโซนิกช่วยสกัดสารจากกระเทียม

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. เปรียบเทียบผลของวิธีการสกัดหยาบและการใช้คลื่นอัลตราโซนิกจากกระเทียมต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*
2. ศึกษาผลของค่าแอมพลิจูด (30 60 และ 90%) ของคลื่นอัลตราโซนิก และเวลาการสกัดจากกระเทียมต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*
3. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้อัลตราโซนิกช่วยสกัดสารจากกระเทียมโดยพิจารณาจากปริมาณสารสกัดได้และฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบถึงผลการเปรียบเทียบวิธีการสกัดหยาบและการใช้คลื่นอัลตราโซนิกจากกระเทียมต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*
2. ได้ทราบถึงผลของค่าแอมพลิจูดของคลื่นอัลตราโซนิก และเวลาการสกัดจากกระเทียมต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*
3. ได้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการใช้อัลตราโซนิกช่วยสกัดสารจากกระเทียมโดยพิจารณาจากปริมาณสารสกัดได้และฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*

การตรวจเอกสาร

1. กระเทียม

กระเทียม เป็นพืชล้มลุกในวงศ์ Liliaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Allium sativum* Linn. โดยมีลักษณะต้นสูง 30-45 เซนติเมตร มีลำต้นใต้ดินชนิดหัว หัวประกอบด้วยกลีบข่อยหลายกลีบ ประมาณ 6-10 กลีบ ติดกันแน่น แต่ละกลีบ มีเยื่อบางๆ สีขาว หรือขาวอมชมพูหุ้มอยู่ (แสดงดังรูปที่ 1) เนื้อสีขาวมีกลิ่นฉุนเฉพาะ บางครั้งในหนึ่งหัวมีกลีบเดียวเรียกว่า กระเทียมโทน หัวค่อนข้างกลม ใบเป็นใบเดี่ยว สีเขียวเข้ม คล้ายใบหญ้ากว้าง 0.5-2.5 ซม. ยาว 30-60 เซนติเมตร โผล่ขึ้นมาจากดินเรียงซ้อนกลับกัน ใบแบนปลายใบแหลม ส่วนโคนใบหุ้มซ้อนกัน ด้านล่างมีรอยพับเป็นสันตลอดความยาวใบ ดอกรวมกันเป็นกระจุก แบบซี่ร่มที่ปลายก้านช่อ ก้านช่อดอกยาว กลีบดอก 6 กลีบ ดอกสีขาวเหลือง หรือชมพูอมม่วง ผลมีขนาดเล็ก มี 3 พู รูปร่างกลม เมื่อแก่จัดจะแตกได้ (คารนี, 2544)



รูปที่ 1 ลักษณะต้นและหัวกระเทียม

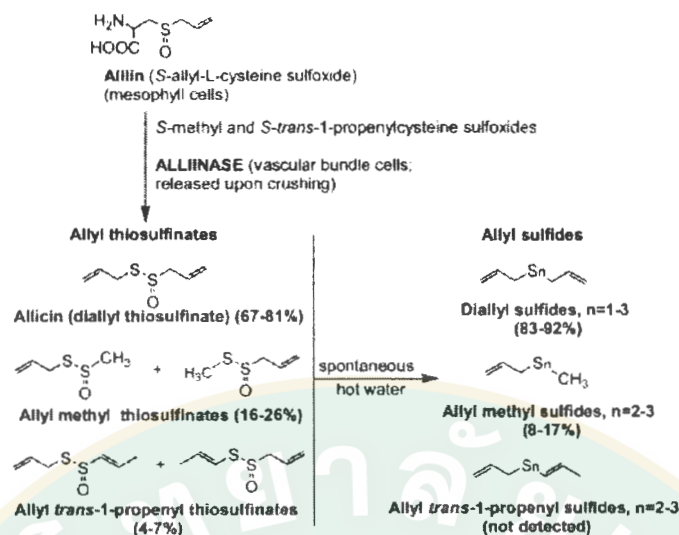
ที่มา: <http://piromwaroon.blogspot.com>

ในหัวกระเทียม ประกอบด้วยน้ำมันประมาณ 0.1-0.4% และสารอินทรีย์กำมะถันจำนวนมาก ได้แก่ อัลลิอิน (alliin หรือ 3-allyl-L-cysteine sulfoxide) อัลลิซิน (allicin หรือ diallyl disulfide oxide) ซึ่งมีลักษณะเป็นน้ำมันที่ไม่มีสี ละลายน้ำ เป็นสารที่ไม่คงตัวในค้าง จะสลายตัวด้วยความร้อน ความชื้น จะคงตัวในเลือดและน้ำย่อยในกระเพาะ แต่ไม่คงตัวในน้ำย่อยจากตับอ่อน เมื่อกระเทียมถูก

หั่นหรือสับ อัลลิซินจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลลิเนสกลายเป็นสารใหม่คือ diallyldisulfide ซึ่งมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (สรจักร, 2542; คารนี, 2544) ที่ผ่านมามีรายงานการศึกษาพบว่า กระเทียมสดสามารถฆ่าเชื้อ *Botulinum* เชื้อ *Staphylococcus* วัณโรค ไทฟอยด์และเชื้อกลากเกลื้อนได้ดีกว่าการใช้เพนิซิลลินและเตตราซัยคลิน (สรจักร, 2542) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากกระเทียมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ได้ (Arora และ Kaur, 1999) นอกจากนี้อัลลิซินซึ่งเป็นสารสำคัญในกระเทียมยังสามารถรวมตัวกับวิตามินบี 1 (ซึ่งถูกทำลายได้ง่าย) ได้เป็น allithiamine (ซึ่ง stable กว่าวิตามินบี 1) เมื่อเข้าสู่ร่างกายคนและสัตว์แล้วจึงแตกตัวเป็นวิตามินบี 1 และอัลลิซิน แล้ววิตามินบี 1 จะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายและใช้ประโยชน์ต่อไป ส่วนอัลลิซิน มีคุณสมบัติรวมกับโปรตีนได้ คุณสมบัตินี้เองที่ทำให้กระเทียมเป็นยาปฏิชีวนะได้ (antibiotics) เพราะอัลลิซิน จะไปรวมกับโปรตีนของเชื้อโรคซึ่งเท่ากับเป็นการทำลาย หรือฆ่าโรคนั้นๆ ยิ่งกว่านั้นอัลลิซินยังมีฤทธิ์ในการกระตุ้นให้เกิดการหลั่งน้ำย่อยในกระเพาะที่สำคัญหลายชนิด และน้ำย่อยเหล่านี้บางชนิดสามารถทำลายเชื้อโรคได้ แต่สำหรับคนที่แพ้ อาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่อกระเพาะ ฉะนั้นคนเป็นโรคเกี่ยวกับกระเพาะอาหารก็ไม่ควรรับประทานกระเทียมมากเกินไป

2. อัลลิซิน

อัลลิซิน (2-propene-1-sulfinothioic acid S-2-propenyl ester: $C_6H_{10}OS_2$) เป็นสารทุติยภูมิที่พบทั่วไปในพืชสกุล Allium โดยพืชที่พบว่ามีปริมาณอัลลิซินสะสมอยู่มากที่สุดคือ กระเทียม โดยทั่วไปอัลลิซินจะสะสมอยู่ในกระเทียมในรูปของอัลลิอิน (Alliin) แต่เมื่อกระเทียมถูกหั่นหรือสับ เอนไซม์อัลลิเนส (Allinase: EC 4.4.1.4) ซึ่งเก็บอยู่ในแวคิวโอล (Vacuole) จะทำปฏิกิริยากับอัลลิอิน กลายเป็นอัลลิซิน (Jones และคณะ, 2007; Slusarenko และคณะ, 2008)



รูปที่ 2 ปฏิกิริยาการเกิดอัลลิซิน

ที่มา: Lawson และ Gardner (2005)

อัลลิซินมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งที่เป็น โปรโตซัว เชื้อรา แบคทีเรีย หรือแม้กระทั่งเชื้อไวรัสบางชนิด โดยอาศัยพันธะไดซัลไฟด์ภายในโมเลกุลของอัลลิซินเข้าไปทำปฏิกิริยากับโปรตีนเอนไซม์หลายชนิดในจุลินทรีย์ คุณสมบัตินี้ทำให้อัลลิซินจัดเป็นยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) จึงสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ โดยที่จุลินทรีย์จะสามารถสร้างความต้านทานจากอัลลิซินได้ยากมาก (Serge Ankri และ David Mirelman, 1999; Slusarenko และคณะ, 2008) จึงมีการทดลองนำอัลลิซินมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์หลายชนิด ซึ่งมีการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* เป็นต้น พบว่าอัลลิซินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อเหล่านี้ได้เป็นอย่างดี (Daljit S. Arora และ Jasleen Kaur, 1999; Serge Ankri และ David Mirelman, 1999)

นอกจากนี้อัลลิซินยังสามารถรวมตัวกับวิตามินบี1 (ถูกทำลายได้ง่าย) ได้เป็น Allithiamine (ซึ่ง stable กว่าวิตามินบี1) เมื่อเข้าสู่ร่างกายคนและสัตว์แล้วจึงแตกตัวเป็นวิตามินบี1 และอัลลิซิน แล้ววิตามินบี1 จะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายและใช้ประโยชน์ต่อไป อีกทั้งยังพบว่าอัลลิซินสามารถที่จะช่วยลดคลอเรสเตอรอลที่จับอยู่ตามผนังของหลอดเลือดและช่วยลดการเกาะตัวกันของ

เกล็ดเลือด จึงทำให้เกิดการหมุนเวียนเลือดได้ดีขึ้น จึงสามารถลดความดันเลือดลงได้ (Baghalian และคณะ, 2005) และยังพบว่าอัลลิซินมีฤทธิ์ในการต้านทานอาการอักเสบและมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระ (Antioxidant) สามารถที่จะป้องกันการเกิดมะเร็งได้ (Serge Ankri และ David Mirelman, 1999; ประเสริฐ ทองเจริญ, 2550) แต่สำหรับคนที่แพ้อาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่อกระเพาะ ฉะนั้นคนเป็นโรคเกี่ยวกับกระเพาะอาหารก็ไม่ควรรับประทานกระเทียมมากเกินไป

3. การสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

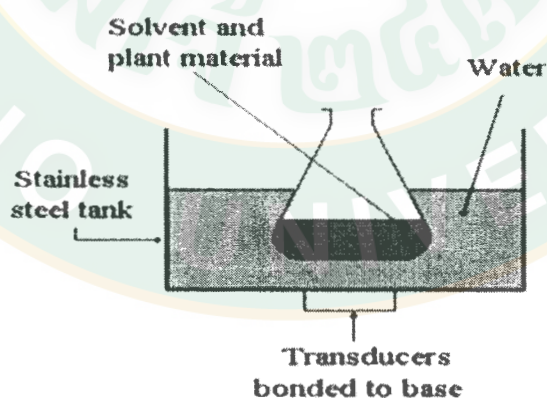
คลื่นอัลตราโซนิกเป็นคลื่นเสียงที่มีความถี่สูงเกินกว่าที่มนุษย์จะได้ยิน โดยทั่วไปแล้วหูของมนุษย์โดยเฉลี่ยจะได้ยินเสียงสูงถึงเพียงแค่ประมาณ 15 KHz เท่านั้น ดังนั้นคำว่าอัลตราโซนิกจึงมักจะหมายถึงคลื่นเสียงที่มีความถี่สูงกว่า 20 KHz ขึ้นไป คลื่นอัลตราโซนิกเป็นคลื่นที่มีทิศทางทำให้เราสามารถเล็งคลื่นเสียงไปยังเป้าหมายที่ต้องการได้โดยเจาะจง เรื่องนี้เป็นคุณสมบัติของคลื่นอย่างหนึ่ง ยิ่งคลื่นมีความถี่สูงขึ้นความยาวคลื่นก็จะยิ่งสั้นลง ถ้าความยาวคลื่นยาวกว่าช่องเปิด (ที่ให้เสียงนั้นออกมา) ของตัวกำเนิดเสียงความถี่นั้นเช่น คลื่นความถี่ 300 Hz ในอากาศจะมีความยาวถึงประมาณ 1 เมตรเศษ ๆ ซึ่งจะยาวกว่าช่องที่ให้คลื่นเสียงออกมาจากตัวกำเนิดเสียงโดยทั่วไปมากมายคลื่นจะหักเบนที่ขอบด้านนอกของตัวกำเนิดเสียงทำให้เกิดการกระจายทิศทางคลื่นแต่ถ้าความถี่สูงขึ้นมาอยู่ในย่านอัลตราโซนิกอย่างเช่น 40 KHz จะมีความยาวคลื่นในอากาศเพียงประมาณ 8 มม. เท่านั้นซึ่งเล็กกว่ารูเปิดของตัวที่ให้กำเนิดเสียงความถี่นี้มากคลื่นเสียงจะไม่มี การเลี้ยวเบนที่ขอบจึงพุ่งออกมาเป็นลำแคบ ๆ หรือที่เราเรียกว่า มีทิศทาง

ในปัจจุบันนี้จึงมีการนำเอาคลื่นอัลตราโซนิกมาใช้งานหลายรูปแบบเช่น ใช้ในเครื่องควบคุมระยะไกล (Ultrasonic remote control) เครื่องล้างอุปกรณ์ (Ultrasonic cleaner) โดยให้น้ำสั่นที่ความถี่สูง เครื่องวัดความหนาของวัตถุโดยส่งกระแยะเวลาที่คลื่นสะท้อนกลับมา เครื่องวัดความลึกซึ่งมีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการผลิตเนื้อสัตว์ ใช้วัดอัตราการไหลของของเหลว และทดสอบการรั่วไหลของท่อ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำคลื่นอัลตราโซนิกมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารทั้งเพื่อการตรวจวัดคุณภาพ และใช้ในการแปรรูปอาหาร เช่น การทำให้เกิดอิมัลชัน (emulsification) และการสกัดสาร

กลไกในการสกัดด้วยอัลตราโซนิกเกิดขึ้นได้เนื่องจากเนื้อเยื่อของพืชที่ประกอบเป็นเซลล์นั้นมีส่วนผนังเซลล์อยู่ชั้นนอกสุดซึ่งจะเป็นตัวต้านทาน การสกัดได้ ซึ่งการสกัดจะประกอบด้วยสองขั้นตอนคือ กระบวนการแพร่ผ่านผนังเซลล์ของตัวทำละลาย และการชะสารสำคัญ ออกจากเซลล์เมื่อผนังเซลล์ถูกทำลายลง ส่วนการสกัดพืชแห้งจะเพิ่มอีกหนึ่งกระบวนการคือ กระบวนการดูดน้ำกลับ Hydration and swelling อัลตราโซนิกทำให้ Swelling index สูงขึ้นดีกว่าการใช้การกวนทางกลธรรมดา) อัลตราโซนิกจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการดังกล่าวได้โดย การเกิดปรากฏการณ์ Cavitation เนื่องมาจากคลื่นนั้นจะประกอบด้วยช่วงอัดและช่วงขยาย ในช่วงขยายเมื่อคลื่นเคลื่อนที่ผ่านตัวทำละลายจะทำให้เกิดฟอง (Bubble) ของตัวทำละลายขนาดเล็กจำนวนมาก จากนั้นเมื่อฟองได้รับแรงจากคลื่นในช่วงอัดจะทำให้ฟองนั้นแตกออกและเกิด Microjet ที่มีความแรงมาก จนสามารถจะทำลายผนังเซลล์ของพืชได้ เมื่อผนังเซลล์ของพืชแตกออกจะทำให้เพิ่มอัตราการถ่ายเทมวลได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้การทำให้ขนาดของตัวอย่างเล็กลงก่อนจะเพิ่มการสัมผัสกับตัวทำละลายและ Cavitation ได้ง่ายขึ้น Bimakr และคณะ (2013) ได้ศึกษาการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเมลอนโดยวิธีซอกท์เลตและการใช้คลื่นอัลตราโซนิก ซึ่งการศึกษาพบว่าการใช้อัลตราโซนิกช่วยสกัดมีประสิทธิภาพดีกว่าการสกัดด้วยความร้อนโดยช่วยลดเวลาการสกัดลงจาก 6 ชั่วโมงเหลือ 40 นาที และสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการสกัดด้วยความร้อน

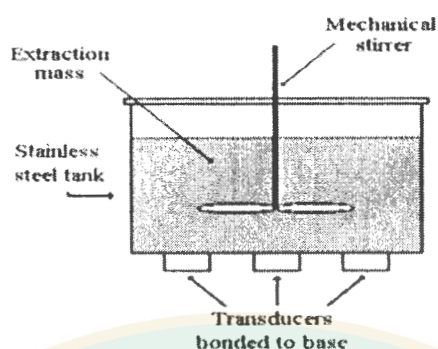
รูปแบบของการสกัดโดยอัลตราโซนิก มี 3 แบบคือ (สุเมธ, 2557)

1. กระบวนการทางอ้อมโดยอาศัยตัวกลางเช่น น้ำในการส่งผ่านคลื่นเสียง



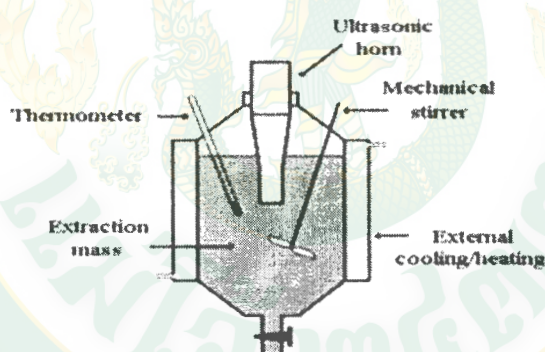
รูปที่ 3 การสกัดทางอ้อม โดยใช้อ่างน้ำอัลตราโซนิก

2. กระบวนการโดยตรงแบบให้แหล่งกำเนิดคลื่นเสียงติดกับถังสกัด



รูปที่ 4 การสกัดโดยตรงโดยใช้อ่างน้ำอัลตราโซนิก

3. กระบวนการโดยตรงแบบใช้ probe หรือ horn เป็นแหล่งกำเนิดคลื่นเสียง



รูปที่ 5 การสกัดโดยตรงโดยใช้โพรบหรือฮอร์นอัลตราโซนิก

4. การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

อันตรายที่เกิดจากการบริโภคอาหาร จะประกอบไปด้วยสารพิษและสิ่งปนเปื้อนต่าง ๆ การปนเปื้อนสามารถจำแนกออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ สิ่งปนเปื้อนทางเคมี หมายถึง ปุ๋ยและยากำจัดศัตรูพืช สารพิษจากเชื้อรา จากโลหะหนัก สารพิษจากพืชและสัตว์ตามธรรมชาติ จากสารทำความสะอาดและ

สารฆ่าเชื้อโรค เป็นต้น สิ่งปนเปื้อนทางกายภาพ เช่น แก้ว กรวด เศษไม้ เป็นต้น และสิ่งปนเปื้อนทางชีวภาพ หมายถึง จุลินทรีย์และสารพิษของจุลินทรีย์ รวมถึงพยาธิต่าง ๆ

การปนเปื้อนนอกจากจะสามารถปนเปื้อนไปยังอาหารโดยตรงแล้วยังสามารถปนเปื้อนไปยังอุปกรณ์ เครื่องมือ เครื่องจักรต่าง ๆ ทั้งในอุตสาหกรรมอาหารหรือการอุปโภคบริโภคในชีวิตประจำวัน การปนเปื้อนทางชีวภาพ จัดเป็นการปนเปื้อนที่มีอันตรายมากที่สุดและทำให้ถึงแก่ชีวิต เนื่องจากการปนเปื้อนทางชีวภาพมักจะเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น และยังสามารถปนเปื้อนได้ง่ายเพราะจุลินทรีย์มีอยู่ทั่วไปทุกหนทุกแห่งไม่ว่าจะอยู่ในดิน น้ำ อากาศ อาหาร ตามผิวหนังและลำไส้ของมนุษย์

จุลินทรีย์ที่มักพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนและส่งผลกระทบต่อร่างกายมีด้วยกันหลายชนิด จุลินทรีย์ที่พบบ่อยและส่งผลกระทบต่อร่างกาย เช่น *E. coli*, *Salmonella*, *B. cereus*, *Clostridium*, *Listeria monocytogenes* เป็นต้น จุลินทรีย์เหล่านี้จัดเป็นเชื้อก่อโรคที่อันตรายถึงแก่ชีวิต โดยโรคที่พบบ่อยและเกิดจากเชื้อเหล่านี้ เช่น โรคซัลโมเนลโลซิส (*Salmonellosis*) ซึ่งเกิดจากการได้รับเชื้อ *Salmonella* spp. โรคลิสเตอริโอซิส (*Listeriosis*) ซึ่งเกิดจากการได้รับเชื้อ *Listeria monocytogenes* โรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร ได้แก่ โรคท้องเสียถ่ายเป็นเลือด โรคบิด ซึ่งเกิดจากการได้รับเชื้อ *E. coli* และโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท ซึ่งเกิดจากการได้รับเชื้อ *Clostridium* เป็นต้น (วีรานูช, 2552)

ในการตรวจหรือการหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารหรืออุปกรณ์ต่าง ๆ นักจุลชีววิทยาจะใช้ จุลินทรีย์ดัชนี (Index indicator) เป็นเชื้อบ่งชี้การปนเปื้อนจากสิ่งโสโครกควรมีคุณสมบัติ ดังนี้

- มีแหล่งที่อยู่เดียวกันกับจุลินทรีย์ที่ก่อโรค
- มีจำนวนแปรผันตามจำนวนของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค
- เป็นเชื้อที่มีความทนทานต่อการถูกทำลายได้ใกล้เคียงกับเชื้อก่อโรค
- ไม่ควรพบในน้ำบริสุทธิ์
- มีวิธีการตรวจที่ง่าย และไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายที่แพงเกินไป

ตัวอย่างเช่น ในอุจจาระมีจุลินทรีย์หลายกลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียลำไส้ (enteric bacteria) ไวรัส และ โพรโตซัว แต่นิยมตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียมากกว่าเพราะมีวิธีการตรวจที่ไม่ยุ่งยาก (บุษกร, 2550) โดยในงานวิจัยนี้เลือกใช้เชื้อ *E. coli* เป็นจุลินทรีย์ดัชนี

- ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *E. coli* (*Escherichia coli*)

เชื้อ *E. coli* ถูกพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1885 และถูกจัดเป็นเชื้อที่ไม่อันตราย มีรูปท่อนสั้น เซลล์มีความกว้างประมาณ 0.6 ไมโครเมตร และยาว 2 - 3 ไมโครเมตร (รูปที่ 6) เป็นเชื้อแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ และมักจะไม่มีแคปซูล เคลื่อนที่ได้ ต้องการอากาศแบบ แฟกคัลเททีฟแอนแอโรบ (Facultative anaerobes) มีถิ่นที่อยู่ในลำไส้ของมนุษย์ สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์ปีก โดยพบในปริมาณสูง (ประมาณ ล้านเซลล์ต่อกรัม) *E. coli* ที่อยู่ในลำไส้ตามปกติไม่น่าจะเชื่อก่อโรค แม้ว่าจะมี *E. coli* บางสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคได้ แต่เชื้อเหล่านั้นไม่ได้อยู่ในลำไส้คนที่มีสุขภาพดีตามปกติ เชื้อ *E. coli* ในลำไส้มีปริมาณมากเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อก่อโรค เชื้อ *E. coli* ถูกเสนอให้ใช้เป็นดัชนีบ่งชี้การปนเปื้อนของเสียจากลำไส้มาเป็นเวลานานตั้งแต่ ค.ศ. 1982 และ 1985 จนกระทั่งในปัจจุบันก็ยังเป็นดัชนีที่มีความน่าเชื่อถือที่จะบ่งชี้ความเป็นไปได้ในการปรากฏของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มาจากลำไส้และมีความเชื่อมโยงสูงกับความปลอดภัยของอาหาร เนื่องจากการปรากฏรวมทั้งปริมาณของเชื้อนี้บ่งชี้การปนเปื้อนและปริมาณของสิ่งขับถ่ายจากลำไส้ได้โดยตรง อีกทั้งเชื้อนี้ยังเป็นดัชนีที่มีความเฉพาะเจาะจงสูงเนื่องจากกลุ่มของเชื้ออยู่ในระดับสปีชีส์



ภาพที่ 6 ลักษณะของเชื้อ *E. coli* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli

5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชุดิมา และคณะ (2556) ได้ศึกษาผลของการพรีทรีตเมนต์ด้วยคลื่นอัลตราซาวด์พลังงานสูง (750 วัตต์) ที่ความถี่ 20 กิโลเฮิรซ์ ต่อประสิทธิภาพการสกัดสารอินนูลินจากหัวแก่นตะวัน โดยศึกษาค่าแอมพลิจูด (ร้อยละ 20, 40, 60, 80 และ 100) เวลา (1, 5 และ 10 นาที) และอุณหภูมิ (25 และ 80 องศาเซลเซียส) จากนั้นสกัดด้วยน้ำร้อน โดยมีสัดส่วนผงหัวแก่นตะวันต่อน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 50 โดยน้ำหนัก ผลการทดลองพบว่าการสกัดอินนูลินด้วยน้ำร้อนอย่างเดียวมีค่า 49.8 (โดยน้ำหนักแห้ง) และการพรีทรีตเมนต์ด้วยอัลตราซาวด์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดอินนูลินได้ จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี HPLC พบว่าการพรีทรีตเมนต์ด้วยอัลตราซาวด์ส่งผลให้สัดส่วนของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่มีสัดส่วนเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัลตราซาวด์มีผลต่อการตัดสายพอลิเมอร์ของอินนูลินได้

ประพฤษ และคณะ (2555) ทำการศึกษาพืชสมุนไพร และผลไม้ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยทำการศึกษาทั้งหมด 30 ชนิด นำมาสกัดสารออกฤทธิ์ด้วยสารละลายเมธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาหาค่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella Typhimurium* โดยใช้วิธี Drug Sensitivity Test (Disc diffusion method) ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากสมุนไพร เบญจกานี (*Quercus infectoria* Olivier, nutgall) มีผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด มากกว่าด้วยยา Amoxicillin

อรัญญา และคณะ (2558) ได้ศึกษาผลของการใช้เครื่องอัลตราโซนิกช่วยในการสกัดแอนโทไซยานินจากกากเม่า โดยใช้ความถี่ 35 กิโลเฮิรต์ ระดับคลื่น ต่ำ ปานกลาง และสูง ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกากเม่าที่ไม่ผ่านการสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิก (ชุดควบคุม) จากการทดลอง พบว่า การสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิกมีผลต่อปริมาณสารแอนโทไซยานิน และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยตัวอย่างกากเม่าที่นำมาสกัดที่ระดับกำลังคลื่นต่ำ ปานกลาง และสูง มีค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ (%yield) เท่ากับ 2.64, 2.83 และ 2.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมทั้งหมด ส่วนปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด และปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

Angela et al (2014) ได้ศึกษาการสกัดสารอัลลิซินจากกระเทียมด้วยวิธีของไหลความดันสูง ที่อุณหภูมิ 313 เคลวิน และความดัน 6 เมกะปาสกาล โดยวัดจากความเข้มข้นของอัลลิซินจากการสกัดด้วยของไหลความดันสูง, ผงกระเทียม, น้ำมันกระเทียม และกระเทียมสด จากผลการทดลอง พบว่าการสกัดกระเทียมด้วยของไหลความดันสูงมีค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ (%yield) เท่ากับ 1.3 ± 0.3 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักเปียก) และความเข้มข้นของการสกัดกระเทียมมีค่า 332 ± 5 ไมโครกรัม (อัลลิซินต่อกรัมของตัวอย่าง) รองลงไปเป็นกระเทียมสด และผงกระเทียม ตามลำดับ ส่วนน้ำมันกระเทียมไม่พบอัลลิซิน

Bimakr และคณะ (2013) ได้ศึกษาการสกัดแบบอัลตราโซนิกร่วมเพื่อสกัดสารจากเมล็ดเมลอน โดยศึกษาที่ความถี่ (25-75%) อุณหภูมิ (40-60 องศาเซลเซียส) และเวลา (20-60 นาที) ผลการทดลองพบว่า สารสกัดที่ได้มีค่าร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 99.14 ± 0.36 มิลลิกรัมต่อกรัม ค่าการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เท่ากับ $32.12 \pm 38\%$ และค่าการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS เท่ากับ $40.52 \pm 0.73\%$ ของการสกัดที่ความถี่ 75 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และเวลา 40 นาที จากผลศึกษาการเปรียบเทียบระหว่างการสกัดแบบอัลตราโซนิกร่วม กับวิธีสกัดแบบซอกซ์เลต พบว่าการสกัดด้วยอัลตราโซนิกร่วมด้วยอุณหภูมิต่ำ ทำให้สารสกัดที่ได้มีคุณภาพสูงกว่าวิธีสกัดแบบซอกซ์เลต

Fenfang และคณะ (2017) ศึกษาการสกัดแบบ Salting-out ในการสกัดและทำบริสุทธิ์สารอัลลิซินจากกระเทียม โดยใช้วิธีการหาพื้นที่ผิวตอบสนองในการทำการทดลอง ซึ่งผลของการทดลองทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นของเอทานอล (23% w/w) ความเข้มข้นของเกลือ (24% w/w) ความเข้มข้นของสารต่อตัวทำละลาย (31 g/L) และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะได้ประสิทธิภาพการสกัดที่ 94.17 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการทำบริสุทธิ์สารอัลลิซิน โดยใช้เอทานอลและแอมโมเนีย ซัลเฟต เป็นวิธีการทำง่าย ถูก และมีประสิทธิภาพ สามารถขยายขนาดของการผลิตได้

Xu และ Pan (2013) ศึกษาถึงผลกระทบของตัวแปรต่างๆ อาทิ เวลาการสกัด อุณหภูมิ อัตราส่วนของเหลวต่อของแข็ง ความเข้มข้นของอัลตราโซนิค และลักษณะการแผ่คลื่นของอัลตราโซนิคในการสกัดสารไลโคปีนจากเกรฟฟรุตสีแดงโดยวิธีอัลตราโซนิค และเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดแบบตัวทำละลายจากการทดลอง พบว่า การสกัดแบบอัลตราโซนิคจะมีอัตราการสกัดสูงสุดที่เวลา 30 นาที โดยอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีอิทธิพลต่อผลการสกัดอย่างมีนัยสำคัญ และผลการสกัดจะเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราส่วนของเหลวต่อของแข็ง 3 ต่อ 1 (มิลลิลิตรต่อกรัม) แม้ช่วงแรกผลการสกัดจะเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้น

ของอัลตราโซนิกไปเรื่อยๆ ผลการสัปดาห์จะลดลง ฉะนั้นจึงควรใช้เวลาในการสัปดาห์ด้วยอัลตราโซนิกให้เหมาะสม จะเหมาะกว่าการสัปดาห์ด้วยอัลตราโซนิกแบบต่อเนื่อง



อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

กระเทียมไทย ซื้อจากตลาดเมืองใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

2. อุปกรณ์ในการทดลอง

เครื่องมือวัสดุที่ใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากกระเทียมด้วยเครื่องอัลตราโซนิก ทั้งหมดประกอบด้วย

1. เครื่องอัลตราโซนิก
2. เครื่องชั่งดิจิตอล 2 ตำแหน่ง
3. เครื่องชั่งดิจิตอล 4 ตำแหน่ง
4. เครื่อง Spectrophotometer
5. เครื่องปั่นไฟฟ้า
6. เครื่องเขย่าสาร
7. เครื่อง Hot Plate
8. ถุงฟอยล์อลูมิเนียมมีซิปล็อค
9. ถุงมือยาง
10. โถดูดความชื้น
11. Magnetic bar
12. Plastic Liquid Dropper
13. ปีกเกอร์ขนาด 25 50 100 1000 ml

14. ขวดรูปชมพู่ขนาด 25 50 100 1000 ml
15. ซ้อนดักสาร
16. อุปกรณ์เครื่องครัว เช่น มีด เขียง หม้อ
17. ถุงมือกันความร้อน
18. ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มล.
19. จานเพาะเลี้ยง (petri dish)
20. หลอดทดลอง (test tube)
21. กระบอกตวง (graduated cylinder) ขนาด 250, 500, 1000 มิลลิลิตร
22. แท่งแก้วคนสาร (stirrer)
23. ปิเปต (pipette) ขนาด 1, 5, 10 มิลลิลิตร
24. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20, 100, 1000 ไมโครลิตร
25. แท่งแก้วรูปตัววี และ แท่งแก้วรูปตัว L (spreader)
26. ขวดเก็บสารก้นกลม (round bottom flask)
27. ขวดระเหยสารรูปหยดน้ำ
28. ขวดเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (duran)
29. กรวยแยก (separatory funnel)
30. หลอดหยดสาร (dropper)

3 วิธีการทดลอง

3.1 การค้นคว้าข้อมูล ออกแบบการทดลองและศึกษาพารามิเตอร์ที่ใช้ในการสกัด

การดำเนินการวิจัยนี้จะเริ่มจากการศึกษาและรวบรวมรายงานวิจัย การทบทวนวรรณกรรม สารสนเทศ พารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก และนำข้อมูลต่างๆ มาพัฒนาและ ออกแบบระบบการทดลองให้เหมาะสมกับโครงการวิจัย

3.2 เปรียบเทียบผลของวิธีการสกัดหยาบและการใช้คลื่นอัลตราโซนิกจากกระเทียมต่อ ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*

ในกระบวนการสกัดแบบดั้งเดิมเริ่มจากการชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ผ่านการบดละเอียด 5 กรัม ใส่ ลงไปในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่องเขย่าที่ ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษ กรองเบอร์ 4 เก็บสารสกัดใส่ขวดสีชาและรักษาไว้ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการทดสอบ ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ในขั้นตอนต่อไป ซึ่งแสดงขั้นตอนการดำเนินงานในรูปแบบ ที่ 7

ล้างและปอกเปลือกกระเทียม



บดกระเทียมด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า



ชั่งกระเทียมที่บดแล้ว 5 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์



เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์



นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 ชั่วโมง



กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4



เก็บสารสกัดที่ได้ในขวดสีชาและเก็บรักษาที่ 4°C

รูปที่ 7 ขั้นตอนการดำเนินงานในกระบวนการสกัดแบบดั้งเดิม

ส่วนการสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก เริ่มจากการชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปเครื่องอัลตราโซนิก จากนั้นนำบีกเกอร์จุ่มลงในน้ำโดยให้ระดับของน้ำในเครื่องอัลตราโซนิกอยู่เหนือระดับของสารละลาย ภายในบีกเกอร์ที่แอมพลิฟูดที่ 30 60 และ 90% เป็นเวลา 10 20 30 40 50 และ 60 นาที จากนั้นนำสารสกัดเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E.coli* ในขั้นตอนต่อไป ซึ่งแสดงการดำเนินงานในรูปที่ 8

ล้างและปอกเปลือกกระเทียม



บดกระเทียมด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า



ชั่งกระเทียมที่บดแล้ว 5 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์



เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์



นำไปใส่ในเครื่องสกัดอัลตราโซนิกที่แอมพลิจูด 30 60 และ 90%

เป็นเวลา 10 20 30 40 50 และ 60 นาที



กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4



เก็บสารสกัดที่ได้ในขวดสีชาและเก็บรักษาที่ 4°C

รูปที่ 8 ขั้นตอนการดำเนินงานในกระบวนการสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิก

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม

วิเคราะห์โดยใช้ Folin-Ciocalteu method ตามวิธีของ Chidambara และคณะ (2002) สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย gallic acid โดยปิเปตสารละลาย gallic acid ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.4 mL เติมน้ำกลั่น 10 % Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 2 mL เขย่าให้เข้ากัน ตั้งพักไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 7.5% โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 1.6 mL พักไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำสารที่ได้ มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm โดยใช้เครื่อง UV-Vis spectrophotometer สร้างกราฟมาตรฐานการดูดกลืนแสงของสารละลาย gallic acid ที่รู้ความเข้มข้นแล้ววิเคราะห์ปริมาณ

สารประกอบฟีนอลิกรวมในตัวอย่างสารสกัดโดยนำตัวอย่างสารสกัดปริมาตร 0.4 mL ทำการทดสอบ เช่นเดียวกับการสารละลาย gallic acid มาตรฐาน ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ คำนวณปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกรวมเฉลี่ยในรูปมิลลิกรัมของ gallic acid equivalents (GAE) ต่อสารสกัด 1 ลิตร

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณอัลลิซิน

วิเคราะห์ปริมาณอัลลิซินตามวิธีดัดแปลงของ Miron และคณะ (2002) โดยนำสารสกัด กระเทียมที่ได้มาทำปฏิกิริยากับ 4-Mercaptopyridine แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 324 นาโนเมตร

3.5 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* บนอาหาร Nutrient Agar (NA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกลำเชื้อ *E.coli* มา 4-5 โคโลนี มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาปรับให้ได้เชื้อปริมาณเท่ากับ 0.5 McFarland (10^8 CFU/mL) ในอาหาร MHB

3.6 การเตรียม disk จากสารสกัด

1. นำสารสกัดจากกระเทียมที่ความเข้มข้นสูงสุด ที่สกัดได้จากวิธีการดั้งเดิม เครื่องสกัดอัลตราโซนิกในแต่ละแอมพลิจูดและสารกันเสียสังเคราะห์ โซเดียมเบนโซเอตที่ความเข้มข้น 0.1 %W/V
2. นำ disk ที่ทำจากกระดาษกรองเบอร์ 1 (whatman filter paper no 1) ไปจุ่มในสารสกัดจากกระเทียม
3. นำ disk ไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิสูง (hot air oven) อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. จากนั้นนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้
5. นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนที่เป็น clear zone

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. ผลของการสกัดแบบดั้งเดิมต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากกระเทียม

การสกัดแบบดั้งเดิมเป็นการสกัดโดยใช้สารละลายน้ำเป็นตัวทำละลายสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากกระเทียมซึ่งผลการศึกษาพบว่า สามารถสกัดสารฟีนอลิกรวมได้ปริมาณ 167.04 ± 39.56 mg gallic equivalence/g ของสารสกัด และสารอัลลิซิน 31.67 ± 7.38 mg/100 ml ซึ่งแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณของสารฟีนอลิกรวมและสารอัลลิซินที่สกัดได้ด้วยวิธีดั้งเดิม

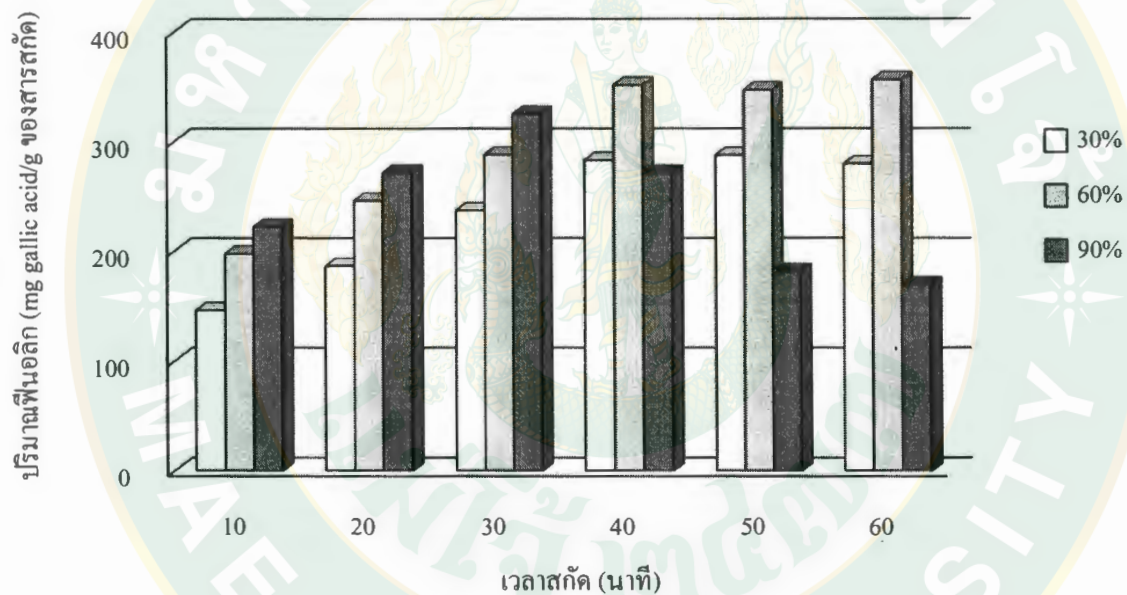
สารออกฤทธิ์ชีวภาพ	ปริมาณ	หน่วย
สารฟีนอลิกรวม	167.04 ± 39.56	mg gallic equivalence/g ของสารสกัด
สารอัลลิซิน	31.67 ± 7.38	mg/100 ml

2. ผลของการสกัดด้วยเครื่องสกัดอัลตราโซนิกต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากกระเทียม

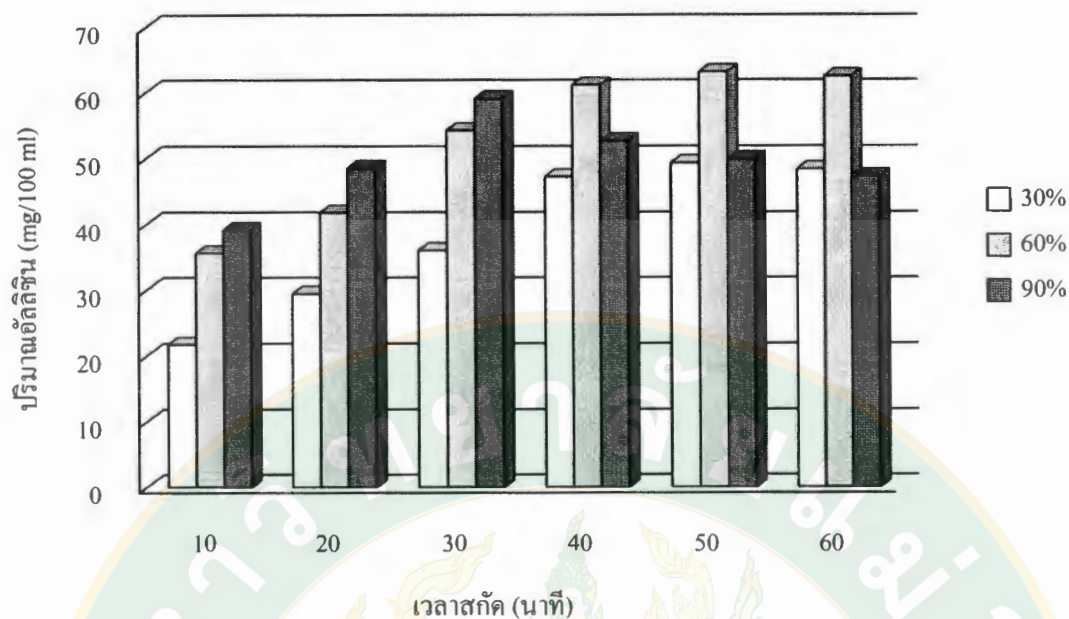
ผลการศึกษาการสกัดสารฟีนอลิกและสารอัลลิซินด้วยเครื่องสกัดอัลตราโซนิก ที่แอมพลิจูด 30 60 และ 90% เป็นเวลา 10 20 30 40 50 และ 60 นาที ซึ่งแสดงในรูปที่ 9 และ 10 ตามลำดับ พบว่าการสกัดสารที่แอมพลิจูด 60% ส่งผลให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมและสารอัลลิซินมีค่ามากที่สุดเมื่อเทียบกับการสกัดที่ค่าแอมพลิจูด 30 และ 90% โดยสารสกัดมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงสุดเท่ากับ 287.52 ± 28.90 , 351.48 ± 45.11 และ 325.26 ± 31.08 mg gallic equivalence/g ของสารสกัดและปริมาณอัลลิซินสูงสุดเท่ากับ 49.34 ± 10.21 , 63.16 ± 5.09 และ 57.15 ± 7.86 mg/100 ml ที่แอมพลิจูด 30 60 และ 90% ตามลำดับ ซึ่งการที่สกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิกที่แอมพลิจูด 60% ให้ค่าปริมาณสารฟีนอลิกและสารอัลลิซินมากกว่าที่แอมพลิจูด 30% และ 90% นั้นเนื่องจากว่าแอมพลิจูดที่สูงขึ้นส่งผลให้ค่าพลังงานของคลื่นอัลตราโซนิกมากขึ้นจึงทำให้ประสิทธิภาพในการสกัดสารดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตามถ้าแอมพลิจูดสูงมากเกินไปอาจส่งผลให้เกิดการทำลายสารฟีนอลิกและสารอัลลิซินได้เช่นกัน และเมื่อเวลาในการสกัดที่แอมพลิจูด 30 และ 60% เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้ปริมาณสารฟีนอลิกและสารอัลลิซินมีค่ามากขึ้นจนกระทั่งเวลาการสกัดเท่ากับ 40 นาที หลังจากนั้นสารสกัดมีค่าคงที่ แต่การสกัดที่แอมพลิจูด 90% ปริมาณสารฟีนอลิกมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งเวลาการสกัดเท่ากับ 30 นาที จากนั้นปริมาณฟีนอลิกมีค่าคงที่ ในขณะที่ปริมาณสารอัลลิซินมีค่ามากที่สุดที่เวลาการสกัด 30 นาที แล้วหลังจากนั้นปริมาณสารอัลลิซินมีค่าลดลง การที่สารฟีนอลิกและสารอัลลิซินมีค่าสูงขึ้นเมื่อเวลาที่ใช้ในการสกัดนานขึ้น

น่าจะเป็นสาเหตุมาจากสารฟีนอลิกและสารอัลลิซินต้องใช้เวลาในการแพร่ผ่านออกจากเซลล์กระเทียมมายังสารสกัดแต่เมื่อเวลาที่ใช้ในการสกัดมากเกินไป สารที่ออกมาจากเซลล์กระเทียมอาจเกิดการสลายตัวเนื่องจากแสงและออกซิเจนได้

นอกจากนี้การใช้คลื่นอัลตราโซนิกช่วยในการสกัดให้ค่าปริมาณสารฟีนอลิกและสารอัลลิซินมากกว่าการสกัดโดยวิธีดั้งเดิมประมาณ 2 เท่า เนื่องจากกว่าการเกิดปรากฏการณ์ Cavitation ในระหว่างการสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิกจะประกอบด้วยช่วงอัดและช่วงขยาย ในช่วงขยายเมื่อคลื่นเคลื่อนที่ผ่านตัวทำละลายจะทำให้เกิดฟอง (Bubble) ของตัวทำละลายขนาดเล็กจำนวนมาก จากนั้นเมื่อฟองได้รับแรงจากคลื่นในช่วงอัดจะทำให้ฟองนั้นแตกออกและเกิด Microjet ที่มีความแรงมาก จนสามารถเจาะทำลายผนังเซลล์ของพืชได้ เมื่อผนังเซลล์ของพืชแตกออกจะทำให้เพิ่มอัตราการถ่ายเทมวลได้ดียิ่งขึ้น (Bimakr และคณะ, 2013)



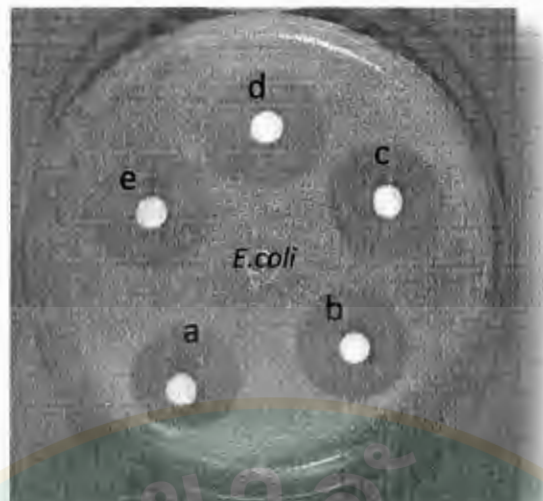
รูปที่ 9 ปริมาณสารฟีนอลิกที่สกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิกที่แอมพลิจูดและเวลาต่างๆ



รูปที่ 10 ปริมาณสารอัลลิซินที่สกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิกที่แอมพลิจูดและเวลาต่างๆ

3. การศึกษาผลของสารสกัดต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli*

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากกระเทียมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร *Escherichia coli* โดยวิธี Agar Disc Diffusion บนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากรูปที่ 5 แสดงให้เห็นว่าสารที่สกัดได้จากกระเทียม มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* ได้ดี โดยสังเกตจากการตรวจพบการเกิดบริเวณยับยั้งได้อย่างชัดเจน โดยที่จุด a, b, c, d และ e เป็นแผ่นที่ชุบสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม สารสกัดจากการใช้อัลตราโซนิกที่แอมพลิจูด 30% สารสกัดจากการใช้อัลตราโซนิกที่แอมพลิจูด 60% สารสกัดจากการใช้อัลตราโซนิกที่แอมพลิจูด 90% และสารกันเสียสังเคราะห์ (โซเดียมเบนโซเอต) ที่ความเข้มข้น 0.1% W/V โดยค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งของเชื้อ *E. coli* แสดงในตารางที่ 2 จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดที่ได้จากการใช้อัลตราโซนิกที่แอมพลิจูด 30% 60% และ 90% รวมทั้งสารกันเสียสังเคราะห์ มีค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 11 บริเวณยับยั้งของสารสกัดที่จากกระเทียมต่อเชื้อ *Escherichia coli*

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งของสารสกัดต่อเชื้อ *E.coli*

จุด	ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง บริเวณที่ยับยั้ง (มิลลิเมตร)
a	สารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม	15.8 ± 1.5^a
b	สารสกัดจากการใช้อัลตราโซนิกที่แอมพลิจูด 30%	18.8 ± 1.2^b
c	สารสกัดจากการใช้อัลตราโซนิกที่แอมพลิจูด 60%	19.2 ± 1.4^b
d	สารสกัดจากการใช้อัลตราโซนิกที่แอมพลิจูด 90%	19.5 ± 1.3^b
e	สารกันเสียสังเคราะห์ (โซเดียมเบนโซเอต)	20.7 ± 1.4^b

a,b ตัวอักษร

สรุปผลการวิจัย

การใช้คลื่นอัลตราโซนิกช่วยสกัดสารฟีนอลิกและสารอัลลิซินทำให้ได้ปริมาณมากกว่าการสกัดแบบดั้งเดิมประมาณ 2 เท่าและช่วยลดระยะเวลาที่ใช้สกัด โดยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัด คือ การสกัดที่แอมพลิจูด 60% เวลาการสกัด 40 นาที โดยมีค่าปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุดเท่ากับ 351.48 ± 45.11 มิลลิกรัมกรดแกลลิก/มิลลิลิตรของสารสกัด และปริมาณอัลลิซินสูงสุดเท่ากับ 63.16 ± 5.09 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และมีค่าเฉลี่ยการยับยั้งของสารสกัดเชื้อ *Escherichia coli* ไม่แตกต่างกับสารกันเสียสังเคราะห์ (โซเดียมเบนโซเอต) ที่ความเข้มข้น 0.1 W/V อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



เอกสารอ้างอิง

จิราภรณ์ บุรากร, เรือนแก้ว ประพุดติ. 2555. ผลของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทยจำนวน 7 ชนิดต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก 10 (1): 11-22.

ชุติมา วันเพ็ญ, นุชราภรณ์ งามปัญญา, สุวัฒนา พุกกะศรี, พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ และ ปราโมทย์ ภูวิจิตรจารุ. 2556. ผลการพรีทรีทเมนต์ด้วยอัลตราโซนิกต่อการสกัดอินนูลินจากหัวแค้นตะวัน. วารสารวิจัยและพัฒนา มจร.,36(2), 249-258.

ชูชาติ อารีจิตรานุสรณ์. 2544. เครื่องมือวิทยาศาสตร์. โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา.

คารนี สุภธีรารักษ์. 2544. สมุนไพรไทย: กระเทียม (Garlic). วารสารเทคโนโลยี 22(2): 16-19.

บุษกร อุดรภิชาดิ. 2550. จุลชีววิทยาทางอาหาร.สงขลา:ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ.

ประพุกษ์ ตั้งมันคง, ศรีสมัย วิริยารัมภะ, สุขสันต์ ฉ่ำสิงห์, สุดธิยา เหล่าเปี่ยม. 2555. ประสิทธิภาพของสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50: สาขาสัตว, สาขาสัตวแพทยศาสตร์, สาขาประมง: 203-210.

ประเสริฐ ทองเจริญ. 2550. กระเทียม. Buddhachinaraj Medical Journal,24(1), 88-92.

รัช รุจิวรรณ. 2556. กระเทียม. เกษตรควิชา 12(54):15-17.

วัชรรา สุวรรณอาสน์และศศิธร วุฒินิชย์. 2553. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและของผักในเรือนทดลอง. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48: สาขาพืช: 301-309.

วีรานูช หลาง. 2552. คู่มือตรวจวิเคราะห์ด้านจุลชีววิทยาทางอาหาร : คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงดิน.มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 184 หน้า.

สรจักร ศิริบริรักษ์. 2542. เกสรโกชนา: กระเทียมแรงฤทธิ์. หมออนามัย 8(5): 41-44.

สุนิดา เมืองโคตร, ทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล, วาริช ศรีละออง, เฉลิมชัย วงษ์อารี และทรงศิลป์ พงษ์ชนะชัย. 2557. การยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในคนจากสารสกัดกระเทียมหอมแดง และพริกแห้งคั่ว. วิทยาศาสตร์เกษตร, 45(2), 297-300.

สุเมธ บุญเกิด. 2557. การใช้อัลตราซาวด์ในการช่วยสกัดสมุนไพร. <https://www.gpo.or.th/rdi/html/Ultrasound.html>

อรัญญา พรหมกุล, วรัญญา วงศ์ไชยสิทธิ์, ไอรดา อภัยแสน และเกรียงไกร พัทธากร. 2558. การใช้คลื่นอัลตราโซนิกในการสกัดแอนโทไซยานินจากกะหล่ำ. เกษตร, 43(1).

Arora, D.S., Kaur, J. 1999. Antimicrobial activity of spices. International Journal of Antimicrobial Agents. 12: 257-262.

Baghalian, K., Ziai, S.A., Naghavi, M.R., Badi, H.N. and Khalighi, A. 2005. Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes. Scientia Horticulturae, 103(2), 155-166.

Berg, H.C. 2008. *E. coli* in Motion. Springer Science & Business Media.

Bermudez-Aguirre, D. 2017. Ultrasound: Advances in Food Processing and Preservation. Elsevier Science.

Bimakr, M., Rahman, R.A., Saleena Taip, F., Adzahan, N.M., Islam Sarker, Z. and Ganjloo, A. 2013. Ultrasound-assisted extraction of valuable compounds from winter melon (*Benincasa hispida*) seeds. International Food Research Journal 20(1): 331-338.

Block, E. 2010. Garlic and Other Alliums: The Lore and The Science. RSC Publishing.

Ceylan, E., Fung, D.Y.C. 2004. Antimicrobial activity of spices. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology 12(1): 1–55.

Chidambara, M.K., Jayaprakasha, G.K. and Singh, R.P. 2002. Studies on Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel Extract Using in vivo Models. Journal of Agricultural Food Chemistry 50(7): 4791-4795.

Curtis, H., Noll, U., Störmann, J. and Slusarenko, A.J. 2004. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. Physiological and Molecular Plant Pathology, 65(2), 79-89.

Daljit S.A. and Jasleen K. 1999. Antimicrobial activity of spices. International Journal of Antimicrobial Agents, 12(3), 257-262.

Deng, J., Xu, Z., Xiang, C., Liu, J., Zhou, L., Li, T., Yang, Z. and Ding, C. 2017. Comparative evaluation of maceration and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fresh olives. Ultrasonics Sonochemistry, 37, 328-334.

Jones, M.G., Collin, H.A., Tregova, A., Trueman, L., Brown, L., Cosstick, R., Hughes, J., Milne, J., Wilkinson, M.C. and Tomsett, A.B. 2007. The biochemical and physiological genesis of alliin in garlic. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology, 1(1), 21-24.

Kimbaris, A.C, Siatis, N.G, Daferera, Dimitra J, Tarantilis, Petros A, Pappas, Christos S and Polissiou, Moschos G. 2006. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). Ultrasonics sonochemistry, 13(1), 54-60.

Lawson, L.D and Gardner, C. D. 2005. Composition, stability, and bioavailability of garlic products used in a clinical trial. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(16), 6254-6261.

Mohsen A., Shahab B. and Mahsa R.O. 2015. Purification of Allicin From Garlic Extract Using Semi-Preparative High Performance Liquid Chromatography. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 10(2).

Olech, Z. and Zaborska, W. 2012. A Spectrophotometric Assay for Total Garlic Thiosulfonates Content. Kinetic Aspects of Reaction with Chromogenic Thiols. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 62(1).

Rosen, C.J., Becker, R., Fritz, V., Hutchison, B., Percich, J., Tong, C. and Wright, J. 2008. Growing garlic in Minnesota. University of Minnesota Extension.

Serge A. and David M. 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection*, 1(2), 125-129.

Slusarenko, A.J, Patel, A. and Portz, D. 2008. Control of plant diseases by natural products: Allicin from garlic as a case study. *European Journal of Plant Pathology*, 121(3), 313-322.

Xu, Y. and Pan, S. 2013. Effects of various factors of ultrasonic treatment on the extraction yield of all-trans-lycopene from red grapefruit (*Citrus paradise* Macf.) *Ultrasonic Sonochemistry* 20: 1026-1032.