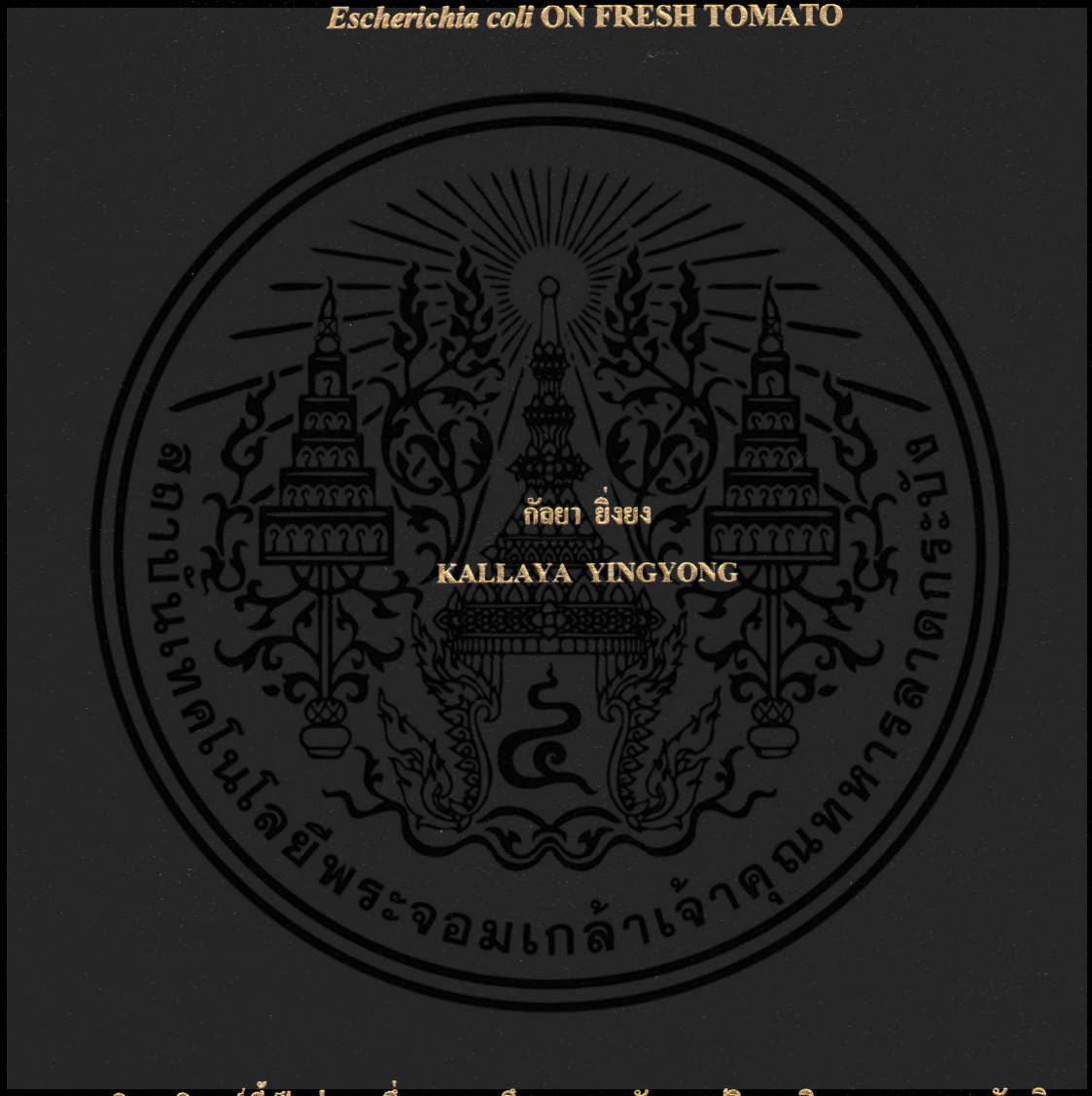
ผลของนาโนอิมัลชันจากน้ำมันตะไคร้ต่อการลดลงของเชื้อ *Escherichia coli* บนมะเขือเทศสด

EFFECT OF LEMONGRASS OIL NANO-EMULSION FOR REDUCTION OF *Escherichia coli* ON FRESH TOMATO



ก้ลยา ยิ่งยง

KALLAYA YINGYONG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการความปลอดภัยอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2561

KMITL-2018-AI-M-054-312

ผลของนาโนอิมัลชันจากน้ำมันตะไคร้ต่อการลดลงของเชื้อ *Escherichia coli* บนมะเขือเทศสด

EFFECT OF LEMONGRASS OIL NANO-EMULSION FOR REDUCTION OF *Escherichia coli* ON FRESH TOMATO

กัลยา ยิ่งยง

KALLAYA YINGYONG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการความปลอดภัยอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2561

KMITL-2018-AI-M-054-312

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECT OF LEMONGRASS OIL NANO-EMULSION FOR REDUCTION OF *Escherichia coli* ON FRESH TOMATO

KALLAYA YINGYONG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FOOD SAFETY MANAGEMENT

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2018

KMITL-2018-AI-M-054-312

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2018

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของนาโนอิมัลชันจากน้ำมันตะไคร้ต่อการลดลงของเชื้อ *Escherichia coli* บนมะเขือเทศสด

EFFECT OF LEMONGRASS OIL NANO-EMULSION FOR REDUCTION OF *Escherichia coli* ON FRESH TOMATO

ชื่อนักศึกษา นางสาวกัลยา ยิ่งยง

รหัสประจำตัว 56608053

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา การจัดการความปลอดภัยอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง	
ผศ.ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ	
ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ	
รศ.ดร.สุเมธ ตันตระเธียร	

วัน / เดือน/ ปีที่สอบ 25 กรกฎาคม 2561 เวลา 08.00-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 303 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่...25...เดือน...กรกฎาคม...พ.ศ...2561...

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของนาโนอิมัลชันจากน้ำมันตะไคร้ต่อการลดลงของเชื้อ *Escherichia coli* บนมะเขือเทศสด
นักศึกษา	นางสาวกัลยา ยิ่งยง
รหัสประจำตัว	56608053
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	การจัดการความปลอดภัยอาหาร
พ. ศ.	2561
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการปรับปรุงน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ให้มีคุณสมบัติเป็นนาโนอิมัลชั่น และ ผลต่อการลดเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* บนมะเขือเทศสด น้ำมันหอมระเหยนาโนอิมัลชันเตรียมจากน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ผสมกับสารลดแรงตึงผิวก่อนนำไปผ่านการลดขนาดด้วยเครื่อง sonicator ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด พบว่าน้ำมันหอมระเหยนาโนอิมัลชันจากตะไคร้มีขนาดเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญ และมีความคงตัวมากกว่าน้ำมันหอมระเหยอิมัลชันจากตะไคร้ จากนั้นทำการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งและการฆ่าเชื้อ *E. coli* TISTR 780 ในหลอดทดลอง พบว่าน้ำมันหอมระเหยอิมัลชันจากตะไคร้ และ น้ำมันหอมระเหยนาโนอิมัลชันจากตะไคร้ที่ผ่านการลดขนาดเป็นเวลา 10 นาที มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อและฆ่าเชื้อที่ 234 and 117 ppm ตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยนาโนอิมัลชันจากตะไคร้ที่ผ่านการโซนิเคตเป็นเวลา 20 30 40 และ 50 นาที มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อและฆ่าเชื้อที่ 58 ppm สำหรับผลการทดสอบประสิทธิภาพการลดลงของเชื้อ *E. coli* TISTR 780 จากการล้างมะเขือเทศสด ด้วยน้ำมันหอมระเหยนาโนอิมัลชันจากตะไคร้ โดยเปรียบเทียบกับ การล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ พบว่า การล้างด้วยน้ำมันหอมระเหยนาโนอิมัลชันจากตะไคร้สามารถลดเชื้อได้ 4 log ในขณะที่การล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อสามารถลดได้ 2 log เมื่อนำเชื้อ *E. coli* TISTR 780 ที่ถูกสัมผัสกับสารน้ำมันหอมระเหยนาโนอิมัลชันจากตะไคร้ไปผ่านการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าสภาพของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายไป ดังนั้นสรุปได้ว่า น้ำมันหอมระเหยนาโนอิมัลชันจากตะไคร้เป็นสารอินทรีย์ทางเลือกหนึ่งสำหรับการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบนผลิตภัณฑ์พืชผักสด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Effect of lemongrass oil nano-emulsion for reduction of *Escherichia coli* on fresh tomato
Student	Miss Kallaya Yingyong
Student ID.	56608053
Degree	Master of Science
Program	Food Safety Management
Year	2018
Thesis Advisor	Prof. Dr. Warawut Krusong

ABSTRACT

To solve the limitation use of plant essential oils due to their insoluble property, the nano-emulsion was applied. Nano-sized lemongrass oil nano-emulsion formulated with a food-grade emulsifier was prepared by using a sonicator at 55 watt and 80 amplitude. Among treatment period as 10, 20, 30, 40, 50 min of sonication, results showed that the significant different size of small particles were obtained. The stability of lemongrass oil nano-emulsions was better than original lemongrass oil emulsion. Furthermore, to investigate the effect of each particle size of nano-emulsion against *Escherichia coli* TISTR 780, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) were conducted, water as negative control. Based on 7 log CFU/ml of *E. coli* TISTR 780 inocultion, the complete inhibition by original lemongrass oil emulsion and nano-emulsion with 10 min sonication was found at 234 and 117 ppm, respectively. Meanwhile, other sonicated nano-emulsions at 20, 30, 40, 50 min showed the same completeness of inhibition at 58 ppm. For application of lemongrass nano-emulsion on fresh produce, fresh tomato was artificially inoculated with *E. coli* TISTR 780 by a one-minute dipping in lemongrass oil nano-emulsions. Samples were stored at 10 °C and enumerated for bacteria at 0, 3, 24, 48, and 72 h. Results revealed that 4 log CFU/g reductions in *E. coli* TISTR 780 by nano-emulsion. Scanning Electron Microscopy (SEM) demonstrated the disrupted bacterial membranes and cell wall were observed, it may be due to the effect of lemongrass oil nano-emulsions treatment. It is indicated that lemongrass oil nano-emulsions can be applied to fresh produce as an effective antimicrobial control agent.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยคำแนะนำจาก ศ.ดร. วราวุฒิ ครูส่ง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาเสนอแนะแนวทางการวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ รวมทั้งได้รับคำแนะนำเพิ่มเติมจาก รศ.ดร. สุเมธ ตันตระเธียร ผศ.ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ และ ดร. วิรามศรี ศรีพจนารถ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากอาจารย์ทุกท่าน และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาต่อครั้งนี้ รวมทั้งกรุณาให้ข้อมูลที่ดีแก่ข้าพเจ้าในการนำมาประกอบการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จได้

ขอขอบคุณ พี่ น้อง และเพื่อนนักศึกษาปริญาโท สาขาการจัดการความปลอดภัย รวมทั้งเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมการเกษตรทุกท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำวิจัยนี้เสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจทำให้ข้าพเจ้าทำงานวิจัยนี้จนสำเร็จ คุณค่าและประโยชน์ที่ได้จาก วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

กัลยา ยิ่งยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญภาพ	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 *Escherichia coli*	3
2.2 ตะไคร้	6
2.3 มะเขือเทศ	9
2.4 Emulsion	10
2.5 Nano-emulsion	11
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง..... 14
3.1 วัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัย..... 14
3.2 อุปกรณ์การทดลอง..... 14
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ..... 15
3.4 สารเคมี..... 16
3.5 เชื้อจุลินทรีย์..... 16
3.6 วิธีการทดลอง..... 16
3.6.1 การเตรียมและการศึกษาลักษณะของ lemongrass oil emulsion และ lemongrass oil nano-emulsion..... 16
3.6.2 การเตรียมเชื้อ *Escherichia coli* 17
3.6.3 การศึกษาค่า Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) และMinimum Bactericidal Concentrations (MBC) ของ lemongrass oil nano-emulsion และ lemongrass oil emulsion ต่อเชื้อ *Escherichia coli*..... 17
3.6.4 การศึกษาผลของ lemongrass oil nano-emulsion ต่อการลดลงของเชื้อ *Escherichia coli* บนมะเขือเทศสด..... 19
3.6.5 การศึกษาลักษณะ เชื้อ *Escherichia coli* ที่ผ่านการล้าง lemongrass oil nano-emulsion ด้วย Scanning Electron Microscopy (SEM)..... 20
3.7 การวางแผนการทดลอง..... 21

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล..... 22
4.1 ผลการศึกษาลักษณะของ lemongrass oil emulsion และ lemongrass oil nano-emulsion..... 22
4.2 ค่า Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) และMinimum Bactericidal Concentrations (MBC) ของ lemongrass oil nano-emulsion และ lemongrass oil emulsion ต่อเชื้อ *Escherichia coli* 24
4.3 ผลของ lemongrass oil nano-emulsion ต่อการลดลงของเชื้อ *Escherichia coli* บนมะเขือเทศสด..... 26
4.4 ลักษณะ เชื้อ *Escherichia coli* ที่ผ่านการล้างด้วย lemongrass oil nano-emulsion ด้วย Scanning Electron Microscopy (SEM)..... 28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ..... 30
5.1 สรุปผลการวิจัย..... 30
5.2 ข้อเสนอแนะ..... 30

เอกสารอ้างอิง..... 32

ภาคผนวก..... 35
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย..... 35
ภาคผนวก ข ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion และ lemongrass oil emulsion..... 38
ภาคผนวก ค ข้อกำหนดคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*).. 56
ประวัติผู้เขียน..... 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	งานวิจัยศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์...	13
4.1	ขนาดของ lemongrass oil emulsion และ lemongrass oil nano-emulsion ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator ที่เวลาต่างๆ……...	22
4.2	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลาย (MBC) ของสาร lemongrass oil nano-emulsion และ lemongrass oil emulsion ต่อ เชื้อ *Escherichia coli*.....	25
4.3	จำนวนเชื้อ *Escherichia coli* บนมะเขือเทศเมื่อใช้ lemongrass oil nano-emulsion ในการล้างและเก็บที่ 10 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับการล้างด้วยน้ำ…….	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ภาพแสดงลักษณะของนาโนอิมัลชัน……..	11
3.1	แผนภาพแสดงการทดลองค่า Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) ของ lemongrass oil nano-emulsion และ lemongrass oil emulsion ต่อ เชื้อ *Escherichia coli*……	18
3.2	แผนภาพแสดงการทดลองค่า Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) ของ lemongrass oil nano-emulsion และ lemongrass oil emulsion ต่อ เชื้อ *Escherichia coli*……	19
4.1	ลักษณะทางกายภาพแสดงความคงตัวของสาร lemongrass oil emulsion และ lemongrass oil nano-emulsion เมื่อทำการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง: (ก) 0 ชั่วโมง; (ข) 1 ชั่วโมง; (ค) 15 วัน; (ง) 30 วัน……..	24
4.2	ภาพความสัมพันธ์ของระยะเวลาการลดขนาด ขนาดอนุภาคของสาร และปริมาณที่ลดลงของเชื้อ *Escherichia coli* TISTR 780…….	26
4.3	ลักษณะมะเขือเทศของชุดทดลองที่ผ่านการล้างด้วย (ก) lemongrass oil nano-emulsion และ (ข) น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ใช้เป็นชุดควบคุม.....…….	28
4.4	ลักษณะเซลล์ *Escherichia coli* จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) : (ก) ตัวอย่างที่ไม่ถูกทดสอบด้วย lemongrass oil nano-emulsion ผ่านกำลังขยาย 5,000 เท่า และ 15,000 เท่า: (ข) ตัวอย่างที่ทดสอบด้วย lemongrass oil nano-emulsion ที่กำลังขยาย 15,000 เท่า และ 25,000 เท่า……	29
4.5	ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil emulsion ตัวอย่างที่ 1……..	38
4.6	ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil emulsion ตัวอย่างที่ 2……..	39
4.7	ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil emulsion ตัวอย่างที่ 3…….	40
4.8	ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 1 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 10 นาที…….	41
4.9	ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 2 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 10 นาที ……	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.10	ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 3 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 10 นาที	43
4.11	ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 1 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 20 นาที	44
4.12	ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 2 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 20 นาที	45
4.13	ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 3 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 20 นาที	46
4.14	ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 1 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 30 นาที	47
4.15	ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 2 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 30 นาที	48
4.16	ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 3 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 30 นาที	49
4.17	ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 1 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 40 นาที	50
4.18	ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 2 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 40 นาที	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.19	ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 3 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 40 นาที	52
4.20	ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 1 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 50 นาที	53
4.21	ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 2 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 50 นาที	54
4.22	ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 3 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 50 นาที	55
4.23	ข้อกำหนดคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*).....	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ผักสดเป็นอาหารอีกประเภทหนึ่งที่ได้รับความนิยมสูงในปัจจุบัน ไม่ว่าจะเป็นในระดับครัวเรือน ร้านอาหาร ร้านขายปลีก หรือในระดับอุตสาหกรรมส่งออก จากรายงานการเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากการบริโภคผักสด และการแจ้งเตือนจากประเทศผู้นำเข้าว่ามีการตรวจพบจุลินทรีย์ปนเปื้อนในสินค้าพืชผักและผลไม้ส่งออกของประเทศไทย สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร จึงตรวจวิเคราะห์หาเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนกลุ่มที่ใช้บ่งชี้สุขลักษณะการผลิตและกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคในผักสดที่จำหน่ายในตลาดสด 8 แห่งและซูเปอร์มาร์เก็ต 4 แห่งในเขตกรุงเทพมหานครและนนทบุรีจำนวน 97 ตัวอย่างในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน 2551 พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้บ่งชี้สุขลักษณะการผลิต ชนิด *Escherichia coli* มีปริมาณ Most Probable Number ต่อกรัมเท่ากับหรือมากกว่า 10 จำนวน 44 ตัวอย่าง (45.4%) ตรวจพบ *Salmonella* spp. 16 ตัวอย่าง (16.5%) *Listeria monocytogenes* 2 ตัวอย่าง (2.1%) และ *Listeria* spp. 47 ตัวอย่าง (48.4%) (ปรีชา จึงสมานุกูล และคณะ, 2553) การป้องกันและการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผักสดทำโดยการล้างโดยใช้น้ำที่มีการใช้คลอรีนในการปรับปรุงคุณภาพน้ำ หรือ สารฆ่าเชื้อซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียเพียง 1 ถึง 2 log reduction (Kim *et al.,* 2011) ดังนั้นการหาวิธีการใหม่เพื่อเป็นทางเลือกในการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในผักสดจึงเป็นการส่งเสริมความปลอดภัยอาหารอีกทางหนึ่ง สำหรับน้ำมันหอมระเหยได้ถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร เนื่องจากความสามารถในการต้านทานการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ดี รวมทั้ง เชื้อยีสต์และเชื้อราที่ก่อโรคในอาหารได้ (Moore-Neibel *et al.,* 2011) แต่ข้อจำกัดของน้ำมันหอมระเหยคือมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic property) การหาวิธีปรับปรุงคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยโดยการทำให้เป็น นาโนอิมัลชัน จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งในการปรับปรุงคุณสมบัติของสาร ในการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นทำการศึกษาการนำน้ำมันหอมระเหยตะไคร้มาปรับปรุงคุณสมบัติ ให้เป็นนาโนอิมัลชั่น และศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยนาโนจากตะไคร้ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบนมะเขือเทศสด

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 การปรับปรุงน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ให้มีคุณสมบัติเป็นนาโนอิมัลชั่น

1.2.2 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยนาโนจากตะไคร้ต่อการลดเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Escherichia coli* บนมะเขือเทศสด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาเฉพาะผลของน้ำมันหอมระเหยนาโนจากตะไคร้ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* บนมะเขือเทศสดซึ่งถือเป็นตัวแทนของผักสด โดยทำการทดลองในหลอดทดลองที่มีความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 10^6-10^8 cfu/ml และใช้สารนาโนอิมัลชันจากน้ำมันตะไคร้ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตรวจวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* ที่เหลือรอด และคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อในหลอดทดลอง นำสภาวะดังกล่าวมาทดสอบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ที่สร้างการปนเปื้อนบนมะเขือเทศ และตรวจเชื้อ *E. coli* ที่เหลือรอด เพื่อทราบถึงประสิทธิภาพของความเข้มข้น ที่ใช้ในการลดเชื้อ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในมะเขือเทศ เปรียบเทียบกับสภาวะที่ใช้น้ำในการลดเชื้อ *E. coli*

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงคุณลักษณะของน้ำมันหอมระเหยนาโนจากตะไคร้

1.4.2 ทราบถึงประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยนาโนจากตะไคร้ต่อการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ในหลอดทดลอง

1.4.3 ทราบถึงความสามารถของน้ำมันหอมระเหยนาโนจากตะไคร้ต่อการลดการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในมะเขือเทศ ทำให้เกิดความปลอดภัยต่อ ผู้บริโภค

1.4.4 ทราบถึงลักษณะ เชื้อ *E. coli* จากการทดสอบด้วยน้ำมันหอมระเหยนาโนจากตะไคร้เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อ *Escherichia coli*

2.1.1 ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อ *E. coli* (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

E. coli อยู่ในจีนัส Escherichia เป็นจีนัสที่อยู่ในตระกูลเอนเทอโรแบคทีริเอซี (Family Enterobacteriaceae) เชื้อ *E. coli* เป็น type species ของจีนัสนี้ ลักษณะเป็นเซลล์รูปท่อนขนาด 1.1-1.5 x 2.0-6.0 ไมโครเมตร แกรมลบ ที่เซลล์มักเรียงตัวเดี่ยวๆ หรืออยู่เป็นคู่ มีลักษณะเด่นคือใช้น้ำตาลแลคโตส (lactose) แล้วให้กรดและแก๊ส 2 ชนิดออกมาพร้อมกันคือแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน แบคทีเรียในสกุลนี้จัดเป็นเชื้อในกลุ่มโคลิฟอร์ม (coliform) ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลล่า เป็นพวก facultatively anaerobic บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากนอกลำไส้ สร้างแคปซูลได้ ให้โคโลนีเรียบไม่มีสี มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตรในเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงในอาหาร MacConkey agar โคโลนีมีสีแดงชมพูขนาดใหญ่ เนื่องจากการเฟอร์เมนต์แลกโตส และโคโลนีมีสีมันวาวคล้ายโลหะ เมื่อเลี้ยงในอาหาร Eosin methyleneblue agar (EMB) และ Endo agar ถ้าเลี้ยงบนอาหารผสมเลือดบางสายพันธุ์เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบบีตาฮีโมไลซิส เชื้อนี้เจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง (15-45 องศาเซลเซียส) บางสายพันธุ์ทนความร้อน 60 องศาเซลเซียส 15 นาที หรือ 55 องศาเซลเซียส 60 นาที สมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญได้แก่ การทดสอบ IMViC ได้ผล + + - - คือสามารถใช้ทริปโทเฟนให้อินโดล และให้ผลบวกกับเมทิลเรด แต่ไม่สร้างอะซิติลเมทิลคาร์บินัล (acetyl methyl carbinol) และไม่ใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนนอกจากนี้ยังมีไลซีนดีคาร์บอกซีเลส (lysine decarboxylase) และสามารถใช้อะซีเตต (acetate) เป็นแหล่งคาร์บอนได้ เป็นแบคทีเรียรูปท่อน แกรม (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

2.1.2 การปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในอาหาร

การพบเชื้อ *E. coli* ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1885 มีถิ่นที่อยู่ในลำไส้มนุษย์ สัตว์เลือดอุ่น สัตว์ปีก โดยพบในปริมาณสูง (ประมาณล้านเซลล์ต่อกรัม) ในปี ค.ศ. 1993 มีการระบาดของโรคเกิดขึ้น ทำให้มีผู้ป่วย 500 คน และผู้ป่วยตาย 4 คน โดยเกิดจากการรับประทานแฮมเบอร์เกอร์ ที่ซื้อในร้านอาหารจานด่วน ในวอชิงตัน เนวาดา โอเรกอน และ แคลิฟอร์เนีย พบว่าแฮมเบอร์เกอร์มีเชื้อ *E. coli* 0157:H7 ปนเปื้อนและเป็นอาหารที่ใช้ความร้อนไม่มาก พอที่จะฆ่าเชื้อ นอกจากพบเชื้อในเนื้อวัวบด ยังพบเชื้อในอาหารอื่นๆ เช่นน้ำแอปเปิ้ล ไส้กรอก ที่ไม่ผ่านการปรุงสุก การวิจัยได้แสดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ทราบว่าเชื้อ *E. coli* ปนเปื้อนในอาหารหลากหลายชนิดที่ทำจากเนื้อสัตว์ เช่นเนื้อวัวบด เนื้อหมู เนื้อไก่ เนื้อแกะ และนมดิบ (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

ในปี พ.ศ. 2555 มีรายงานการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ของมะเขือเทศราชินีของกลุ่มวิสาหกิจชุมชนตำบลดอนตูม อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม โดยการสังเกตการณ์และเก็บตัวอย่างในแปลงปลูกจำนวน 4 แปลง และจุดรวบรวมผลผลิตคือกลุ่มวิสาหกิจชุมชนตำบลดอนตูม ทำการสุ่มตัวอย่างมะเขือเทศและปัจจัยในการผลิต งานวิจัยนี้พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคถึง 2 ชนิด คือ เชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* ในมะเขือเทศจากแปลง มือผู้เก็บและผ้าปูสำหรับคัดขนาดในบางแปลง (วันเพ็ญ แสงทองพินิจ และคณะ, 2555)

2.1.3 การเกิดโรคจากเชื้อ *E. coli*

พบเชื้อ *E. coli* ครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1885 และประมาณกลางปี ค.ศ. 1940 พบว่าเชื้อ *E. coli* ทำให้ทารกท้องเสีย โดยตั้งชื่อนี้ที่ทำให้เกิดโรคว่า enteropathogenic *E. coli* (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545) ปัจจุบันสามารถแบ่ง เชื้อ *E. coli* ตามพยาธิสภาพของโรคได้ 8 ชนิด โดยที่ทั้ง 8 ชนิดสามารถแบ่งตามตำแหน่งที่ก่อโรคได้เป็น 2 กลุ่ม (Croxen *et al.,* 2010)

2.1.3.1 Extra-intestinal *E. coli* (ExPEC) หมายถึง เชื้อ *E. coli* ที่ก่อโรคนอกระบบทางเดินอาหารและลำไส้ ได้แก่

ก. Uropathogenic *E. coli* (UPEC) คือ *E. coli* ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ พบว่าเชื้อส่วนใหญ่กว่า 80% เกิดจาก *E. coli* และมักจะปนเปื้อนมาจากระบบทางเดินอาหาร เมื่อเข้าสู่ระบบทางเดินปัสสาวะ เชื้อจะเกาะติดที่เซลล์เยื่อบุ และกระตุ้นให้เซลล์นำแบคทีเรียเข้าเซลล์ และอยู่รวมตัวกันคล้าย biofilm เรียกว่า Intracellular bacterial communities (IBCs) เมื่อแบคทีเรียใน IBC ออกมานอกเซลล์ก็จะสามารถเข้าสู่เซลล์ชั้นต่อๆไปของระบบทางเดินปัสสาวะได้ และถ้าไม่ได้รับการรักษาเชื้อก็อาจเกิดการติดเชื้อที่ไตได้

ข. Neonatal meningitis *E. coli* (NMEC) คือ *E. coli* ที่ก่อให้เกิดเยื่อหุ้มสมองในเด็กแรกเกิด เชื่อว่า *E. coli* นี้ได้มาจากระบบทางเดินอาหารของแม่ที่ปนเปื้อนมาในขณะคลอด โดยเชื้อจะผ่านเซลล์เยื่อบุลำไส้ เข้าสู่กระแสเลือด และเชื้อจะสามารถเข้าสู่สมองได้ต้องผ่านเซลล์ที่เรียกว่า blood brain barrier (BBB) ก่อน เชื้อสายพันธุ์นี้สามารถผ่านเข้าสู่สมองและระบบประสาท และก่อให้เกิดการอักเสบติดเชื้อที่เยื่อหุ้มสมองได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.2 Diarrhoeagenic *E. coli* หมายถึง เชื้อ *E. coli* ที่ก่อให้เกิดการติดเชื่อภายในระบบทางเดินอาหาร แบ่งได้เป็น 6 ชนิด ดังนี้

ก. Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เชื้อโรคกลุ่มนี้ทำให้เกิดโรคท้องเสีย ในหมู่นักเดินทางรวมทั้งทารกที่อยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนาที่มีสุขาภิบาลไม่สะอาด การพบเชื้อเกิดจากความสามารถของเชื้อในการผลิตสารพิษซึ่งเป็นปัจจัยในการบุกรุกเนื้อเยื่อในอวัยวะอื่น โดยเป็นสารชนิดที่ไม่ทนความร้อน (heat labile) และ ชนิดทนความร้อน (heat-stable) อาการของโรคจะเกิดขึ้นกับระบบทางเดินอาหาร (Gastroenteritis) มีอาการคล้ายกับผู้เป็นโรคอหิวาตกโรค (cholera) เชื้อโรคจะแพร่ระบาดโดยตรงและทางอ้อม โดยมีมนุษย์เป็นพาหะของเชื้อนี้ โดยผ่านทางอาหารและน้ำ ซึ่งพบการระบาดเป็นครั้งคราวในมนุษย์ ในปี ค.ศ. 1983 เนยแข็ง บรี(Brie) ซึ่งนำเข้ามาจากสหรัฐอเมริกามีการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* 027:H7 เชื้อชนิดนี้ทำให้ประชากรในสหรัฐอเมริกาและประเทศอื่นๆ ป่วย ทั้งนี้ผู้ป่วยต้องรับประทานอาหารที่มีเชื้อเข้าไปปริมาณ 10^8-10^9 เซลล์ต่อกรัม (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

ข. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เป็นเชื้อที่ทำให้เด็กทารกท้องเสีย โดยเฉพาะเด็กทารกที่เลี้ยงในสถานที่ ที่มีสุขาภิบาลไม่สะอาด เชื้อสามารถแพร่ผ่านทางมนุษย์ ซึ่งเป็นพาหะทั้งทางตรงและทางอ้อม พบเชื้อหลายซีโรไทป์ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคทางเดินอาหารในน้ำและเครื่องดื่มในประเทศต่างๆ หลายประเทศ กลไกการเกิดโรคยังไม่ทราบชัดเจนแต่ทราบว่าผู้ป่วยต้องรับประทานเชื้อเข้าไปในปริมาณมาก (ประมาณ 10^6-10^9 เซลล์ต่อกรัม) (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

ค. Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เชื้อโรคกลุ่มนี้ทำให้มีอาการคล้ายโรคบิด คล้ายกับโรคshigellosis โดยเชื้อสามารถสร้างปัจจัยบุกรุกเยื่อบุลำไส้ออกมาแล้วก่อโรคได้ มนุษย์เป็นพาหะที่นำเชื้อทั้งทางตรงและทางอ้อม มีการแพร่กระจายของเชื้อโรค ผู้ป่วยต้องได้รับเชื้อเข้าไป 10^6 เซลล์ต่อกรัมทำให้เกิดโรค การระบาดในสหรัฐอเมริกาเริ่มพบในปี ค.ศ. 1971 เกิดจากการบริโภคเนยแข็งชนิดคาเมมเบิร์ต (camembert chesse) ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ซึ่งมีเชื้อ *E. coli* 124: B17 ปนเปื้อน ทั้งนี้โรคทางเดินอาหารที่เกิดจาก EIEC เกิดจากสารพิษชนิดพอลิเพปไทด์ โดย พลาสมิด (plasmid) กำหนดให้มี การสร้างสารพิษที่สามารถบุกรุกลำไส้ โดยเชื้อสามารถเกาะติดและมีการแบ่งตัวเพิ่มที่ลำไส้ อาการของโรคเกิดขึ้นภายหลังการได้รับเชื้อโรค 10^6 เซลล์ และมีระยะพักโรค อาการของโรคจะทำให้ผู้ป่วยเกร็งที่ท้อง ท้องเสีย ปวดศรีษะ หนาวสั่น มีไข้ ในอุจจาระที่ขับออกมาจะมีเชื้อจำนวนมาก อาการของโรคจะเป็นอยู่ 7-12 วัน เมื่อผู้ป่วยหายจะยังเป็นพาหะโดยมีเชื้ออยู่ในอุจจาระเป็นเวลานาน (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) เช่น *E. coli* O157 สายพันธุ์ที่พบมากคือ *E. coli* O157:H7 ทำให้เกิดท้องร่วงอาการถ่ายเป็นเลือดอย่างรุนแรง (Hemorrhagic colitis) และปัสสาวะเป็นเลือด hemolytic uremic syndrome (HUS) สำหรับในวัวนมทำหน้าที่เป็นพาหะนำโรค การรับประทานเชื้อเพียง 10 ถึง 100 เซลล์ ทำให้เกิดโรคได้ ความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อเกิดจากการสร้างเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ออกมา *E. coli* O157: H7 สร้างสาร (verotoxin:VTI) ซึ่งมีสารพิษมากกว่า 1 ชนิดที่ทำให้เกิดโรคและมีอาการโรคคล้ายกัน เชื้อสามารถเกาะที่ลำไส้และเพิ่มจำนวน พร้อมทั้งสารสารพิษได้ ซึ่งมีผลทำลำไส้ใหญ่ *E. coli* O157: H7 ทำให้มีเลือดออกในลำไส้ใหญ่ ปัสสาวะมีเลือดและต่อมน้ำเหลืออักเสบ (thrombocytopenic purpura; TTP) อาการของโรคจะเกิดขึ้นหลังจากรับประทานเชื้อไป 3-9 วัน โดยจะมีอาการอยู่ 4 วัน โดยจะเป็นตะคริวที่ท้อง ถ่ายเหลว (35-75 เปอร์เซ็นต์ อุจจาระเป็นเลือด) อาเจียน อาจมีไข้หรือไม่มี ลำไส้ใหญ่มีเลือดออก สารพิษทำลายเม็ดเลือดแดง ทำให้เลือดจับตัวเป็นลิ่มในไต จึงทำให้ไตถูกทำลาย ในที่สุดไตจะวาย เรียกว่า HUS (ปัสสาวะเป็นเลือด) ทำให้ผู้ป่วยตายได้ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่เป็นเด็ก การเกิด TTP เกิดจากเลือดมีการแข็งตัวเป็นลิ่มในสมอง ทำให้ผู้ป่วยมีอาการรุนแรงและตายได้ (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

จ. Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) คือ *E. coli* ที่ก่อให้เกิด traveller's diarrhoea ได้บ่อยรองจาก ETEC โดยมีอาการท้องเสียเป็นน้ำ (watery diarrhoea) แต่ในบางรายอาจรุนแรงมีเลือดปนได้ สามารถพบเชื้อได้ทั้งในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ เชื้อจะอยู่รวมกันเป็นลักษณะของ biofilm ทำให้เชื้อเจริญผ่านชั้นเยื่อเมือกที่คลุมเซลล์เยื่อบุลำไส้ ทำให้เชื้อเกาะติดกับเยื่อบุลำไส้และปล่อยสารไปรบกวนกระบวนการดูดซึมของเซลล์ ทำให้เกิดอาการท้องเสียได้ (Croxen *et al.,* 2010)

ฉ. Diffusely adherent *E. coli* (DAEC) คือ *E. coli* ที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสียในเด็กอายุระหว่าง 18 เดือน ถึง 5 ปี นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะในผู้ใหญ่ได้ เชื้อกลุ่มนี้ต่างจากกลุ่มอื่นตรงที่เชื้อสร้างสารที่ช่วยในการเกาะติดกับเซลล์ออกมาปริมาณมาก และสร้าง toxin (secreted autotransporter toxin: Sat) ไปทำลายเซลล์ ทำให้การซึมผ่านของสารเข้าออกเซลล์ผิดปกติได้ ทำให้เกิดอาการท้องเสียได้ (Croxen *et al.,* 2010)

2.2 ตะไคร้ (Khonsung, 2012)

ตะไคร้ เป็นไม้ ที่มีถิ่นกำเนิดจาก ประเทศศรีลังกาและอินเดีย ใบมีกลิ่นหอมเฉพาะ นิยมปลูกไว้เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบในการปรุงอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารไทย เช่น ต้มยำ นอกจากนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตะไคร้ยังถูกใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เช่น เป็นส่วนประกอบของสบู่ แชมพู ประโยชน์ทางยาอ้างอิงตามสรรพคุณยาโบราณซึ่งกล่าวว่า ตะไคร้มีกลิ่นหอม ใช้ขับลมในลำไส้ ทำให้เจริญอาหาร บำรุงไฟธาตุ แก้โรคทางปัสสาวะ แก้คาวและแก้เบื่ออาหาร ตะไคร้มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. เป็นพืชในวงศ์ Gramineae (Poaceae) ชื่อพ้อง *Andropogon citratus* DC, *A. citratus* DC ex Nees, *A. citriodorum* Hort x Desf., *A. nardus* subsp. ceriferus (Hack) Hack, *A. roxburghii* Nees ex Steud., *A. schoenanthus* L., *C. nardus* subvar. citratus (DC.) Roberty ชื่ออื่น ได้แก่ คาหอม ไคร จะไคร เซิดเกรย หัวสิงโต ห่อวอตะโป่ เหละเกรย Lepine, Lemongrass, West Indian lemongrass (Khonsung, 2012)

2.2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ตะไคร้เป็นพืชล้มลุก อายุหลายปี ขึ้นรวมกันเป็นกอหนาแน่น มีความสูงถึง 3 เมตร ชอบดินร่วนซุย เหง้าใต้ดินสั้นมีกลิ่นเฉพาะ ลำต้นรูปทรงกระบอก เกลี้ยง แข็ง ใบเกลี้ยง ตั้งตรง ยาวประมาณ 1 ม. กว้าง 5-15 มม. รูปขอบขนานแคบ คมและสาก สีใบด้านบนขาวกว่าด้านล่าง โคนใบสอบเรียว ลิ้นใบมีขอบหยาบและบางคล้ายเยื่อ หรือ แห้งสาก ยาว 4-5 มม. สีขาวนวลหรือขาวปนม่วง มีเกล็ดบางๆ ยาว 2 มม. ที่รอยต่อระหว่างกาบใบและตัวใบ ดอกออกยาก เป็นช่อกระจาย ช่อดอกย่อยมีก้านออกเป็นคู่ๆ ดอกหนึ่งมีก้าน อีกดอกไม่มีก้าน ดอกย่อยประกอบด้วยดอกเล็กๆ 2 ดอก ดอกล่างลดรูปเป็นกลีบเดียวโปร่งแสง ดอกบนสมบูรณ์เพศ มีใบประดับ 2 ใบ (Khonsung, 2012)

2.2.2 ข้อมูลพฤกษเคมี

ตะไคร้สด ประกอบด้วยน้ำประมาณ 80 % สารเป็นน้ำมันระเหยประมาณ 0.2-0.4 % อาจพบได้ถึง 3 % ขึ้นอยู่กับวิธีสกัดและแหล่งที่ปลูกพืช ที่เหลือเป็นสารที่ไม่ใช่น้ำมันระเหยรวมถึงแร่ธาตุต่างๆ เช่น แคลเซียม โพแทสเซียม สารที่ไม่ใช่น้ำมันระเหยได้แก่ caffeic acid, chlorogenic acid, p-coumaric acid, cymbopogenol, cymbopogone, cymbopogonol, cynaroside, fructose, isoscoparin, luteolin, luteolin-7-O-neohesperidoside, octacosanol, orientin, orientin,iso, 2-O-rhamnosyl, saponin, β-sitosterol (hexacosanol, triacontanol), sucrose, swertiajaponin น้ำมันหอมระเหยที่พบเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ monoterpene hydrocarbons, oxygenated monoterpenes, sesquiterpene hydrocarbons และ oxygenated sesquiterpenes ในขณะที่สารเคมีในน้ำมันหอมระเหยที่พบเป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ α-citral หรือ geranial, β-citral หรือ neral, limonene, nerol, neryl acetate และ 6-methyl-hepten-2-one สารอื่นที่พบได้แก่ borneol, camphene, camphor, (+)-β-cardinene, γ-cadinene, car-3-ene, Z-carveol, β-caryophyllene, caryophyllene oxide, cineal, cineole, citronellal, β-citronellal, citronellol, citronellol acetate, epi-cubenol, α-cyclocitral, farnesol, fenchone,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

geranial butyrate, geraniol, geraniol acetate, D-germacrene, heptan-2-one,3-methyl, humulene, isoeugenol, D-limonene, linalool, linalool oxide, menthol, menthone, myrcene, β-myrcene, myrtanal, nerolic acid, ocimene, β-ocimene, n-octanal, α-pinene, β-pinene, sabinol, terpindene, terpinol, tricyclene, verbenone, zingiberene (Khonsung, 2012)

Citral ($C_{10}H_{16}O$) เป็น monoterpenoid aldehyde ในน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ เป็นสารให้กลิ่น (flavor compound) และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา มีการศึกษาผลของ Citral ต่อ *Cronobacter sakazakii* พบว่า Citral ลดปริมาณ intracellular ATP ของเชื้อ *C. sakazakii* อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่ง intracellular ATP มีความจำเป็นต่อการเจริญ การแบ่งตัว การเก็บพลังงาน และ การทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ อีกทั้งพบว่า Citral ทำลายผนังของเซลล์ *C. sakazakii* ทำให้เซลล์เสียสภาพ (Shi *et al.,* 2016)

2.2.3 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ตะไคร้เป็นพืชที่ถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรกันอย่างกว้างขวาง มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดตะไคร้ รวมถึงสารสำคัญต่างๆ ทั้งในหลอดทดลอง ในสัตว์ทดลอง และในคน ฤทธิ์ดังกล่าวได้แก่ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านปรสิต ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์แก้ปวด ต้านการอักเสบ ลดไข้ ฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง ฤทธิ์ต่อระบบไหลเวียนโลหิต ฤทธิ์ต่อทางเดินอาหาร ฤทธิ์ต่อเอนไซม์ในตับ ฤทธิ์ต่อยีนส์ ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ไล่แมลง และการศึกษาความเป็นพิษ (Khonsung, 2012)

2.2.4 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

เมื่อนำสารสกัดเอธานอล สารสกัดด้วยน้ำร้อนและน้ำเย็นความเข้มข้น 20 mg/ml/disc มาทดสอบด้วยวิธี disc-diffusion พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และ *E. coli* น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staph. aureus, Staph. agalactiae, Staph. pneumoniae, Staph. pyogenes, Salmonella* paratyphi A*, Salmonella* Typhi *H 901, Salmonella* Typhi *S 32, Bacillus subtilis var. niger, E. coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas fluorescens* เมื่อทดสอบด้วยวิธี macrobroth dilution ที่ค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) 250 - 500 ppm แต่ไม่ได้ผลต่อ *Ps. aeruginosa* เมื่อนำน้ำมันหอมระเหย 15 µl/disc มาทดสอบด้วยวิธี disc-diffusion สามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* spp. (*S.* Typhimurium*, S.* Enteritidis), *E. coli* O157, *Campylobacter jejunii* และ *Clostridium perferingens* ได้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี diffusion ที่ความเข้มข้น 5 µg/disc ซึ่งมีส่วนประกอบหลักคือ 1,8-cineole, geranial และ neral สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลายชนิด เช่น *Citrobacter* spp., *Ps. vulgaris* และ *S.* Typhimurium ส่วนประกอบอื่นที่พบในน้ำมันหอมระเหยซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ borneol, geraniol, linalool, nerol และ neral มีการศึกษาเพื่อพัฒนาสูตรตำรับเจลล้างมือจากน้ำมันตะไคร้ พบว่าเมื่อทดสอบด้วยวิธี disc diffusion ตำรับที่มีความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้ 5% โดยน้ำหนักสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S.* Typhimurium ได้ดีที่สุด (Khonsung, 2012)

2.3 มะเขือเทศ

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill) เป็นพืชผักในวงศ์ Solanaceae มีถิ่นกำเนิดมาจากอเมริกาใต้แถบประเทศเปรูและเอกาดอร์ ถูกนำมาปลูกครั้งแรกในประเทศเม็กซิโก และมีการแพร่กระจายไปยังประเทศสหรัฐอเมริกา สเปน และฟิลิปปินส์ ตั้งแต่ศตวรรษที่ 16 พันธุ์มะเขือเทศที่เป็นพันธุ์ปลูก ในปัจจุบันนี้เป็นพันธุ์ที่ถูกพัฒนามาจากมะเขือเทศป่า มะเขือเทศเป็นพืชที่มีประโยชน์และนิยมบริโภคกันหลายประเทศทั่วโลก มีการผลิตกันมากในรูปการค้าและ สวนครัว (มณีฉัตร นิกรพันธ, 2538) นอกจากประโยชน์ในด้านบริโภคสดโดยตรงแล้วยังใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมและการแปรรูปอีกมากมายหลายชนิด ทำให้ความต้องการมะเขือเทศนับวันยิ่งมากขึ้น

มะเขือเทศมีชื่อท้องถิ่นเช่น มะเขือส้ม (คนเมือง) ตะก่อชิ (กะเหรี่ยงเชียงใหม่) มะเขือส้ม (ภาคเหนือ) ตรอบ (สุรินทร์) น้ำเนอ (เชียงใหม่) ตีรอบ (เขมร) ฮวงเกีย (จีน) เป็นพืชล้มลุกอายุเพียง 1 ปี สูงประมาณ 1-2 เมตร ลำต้นตั้งตรง ลักษณะทรงพุ่มเจริญเติบโตรวดเร็ว มีขนอ่อนๆปกคลุมกลิ่นเฉพาะตัว ใบ เป็นใบประกอบ ออกแบบสลับ ขอบใบหยักเป็นซี่ห่างๆ คล้ายฟันเลื่อยมีขนอ่อนๆ ใบย่อยขนาดไม่เท่ากัน อาจเล็กเรียว หรือกลมใหญ่ ปลายใบแหลม ใบกว้าง 2-5 เซนติเมตร ยาว 3-10 เซนติเมตร ก้านใบยาวประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร ดอกเป็นช่อ ออกที่บริเวณซอกใบ ดอกย่อย 6-12 ดอก บางพันธุ์อาจมีได้ 30-100 ดอก ดอกขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร กลีบดอกมีสีเหลืองเชื่อมติดกันเป็นรูปกรวย (corolla tube) ส่วนปลายกลีบจะแยกจากกัน (corolla lobe) เป็นแฉก 5-6 แฉก เกสรตัวผู้ประมาณ 5-6 เกสรตัวเมีย 1 ติดอยู่ภายในหลอดดอก กลีบเลี้ยง (sepal) สีเขียวประมาณ 5-6 กลีบ ก้านดอกยาวประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร ผล เป็นผลเดี่ยว มีรูปร่างและสีต่างกัน ขนาดเล็กประมาณ 3 เซนติเมตรจนถึงใหญ่ประมาณ 10 เซนติเมตร รูปร่างมีทั้งกลม กลมแบบ หรือกลมรี ผิวบางเป็นมัน ผลดิบมีสีเขียวหรือเขียวอมเทา เมื่อสุกจะมีสีเหลือง สีส้ม หรือสีแดง เนื้อภายในฉ่ำด้วยน้ำรสเปรี้ยว มีเมล็ดเป็นจำนวนมาก เมล็ด รูปไข่สีน้ำตาลอ่อนแบน กว้าง 2-4 มิลลิเมตร ยาว 3-5 มิลลิเมตร ภายใน 1 ผลมีประมาณ 250 เมล็ด ผล ใช้ประกอบอาหารเช่น ต้มยำ แกง ผัด น้ำพริก ได้ ผลที่มีรสเปรี้ยว ช่วยดับกระหาย ทำให้เจริญอาหาร บำรุงและกระตุ้นกระเพาะอาหาร ลำไส้ ไต ให้ทำงานได้ดี ช่วยขับพิษและสิ่งคั่งค้างในร่างกาย เป็นยาระบาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อ่อนๆ แก้ไฟไหม้ น้ำร้อนลวก ถูกน้ำกรด ถูกแมงกะพรุนไฟ ช่วยย่อยอาหาร ช่วยขับน้ำย่อยอาหาร ฟอกเลือด รักษาหลอดลมอักเสบเป็นอาหารสำหรับคนเป็นนิ่ว วัณโรค ไทฟอยด์ หูอักเสบ และเหยื่อตาอักเสบ ผู้ที่รับประทานมะเขือเทศสดเป็นประจำจะช่วยลดอัตราการเกิดโรคมะเร็งในลำไส้และมะเร็งต่อมลูกหมาก ผลมะเขือเทศสุกที่มีคาโรทีนอยด์สูง (สมพร ภูติยานันต์, 2551)

2.4 Emulsion

อิมัลชัน (emulsion) หมายถึง ระบบคอลลอยด์ (colloid) ที่ประกอบด้วยเหลวตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป ซึ่งปกติไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เช่น น้ำกับน้ำมัน ผสมรวมเป็นเนื้อเดียวกันได้โดยไม่แยกชั้น โดยของเหลวส่วนหนึ่งแตกตัวเป็นหยดเล็กๆ เรียกว่า วัฏภาคภายใน หรือส่วนที่กระจายตัว (internal or dispersed phase) ซึ่งจะกระจายตัวแทรกอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง เรียกว่า วัฏภาคภายนอก (external or continuous phase) (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, 2561)

2.4.1 ประเภทของอิมัลชัน อิมัลชันแบ่งเป็น 2 ประเภทหลัก คือ

อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil-in-water emulsion, O/W) มีน้ำมันเป็นวัฏภาคภายใน และน้ำเป็นวัฏภาคภายนอก เช่น น้ำนม (milk) ข้อสังเกตุ หรือวิธีทดสอบอิมัลชันประเภทนี้คือ สามารถทำให้เจือจางได้ด้วยการเติมน้ำ มีค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity) สูงกว่า ผสมได้กับสีชนิดที่ละลายน้ำ (water soluble dye)

อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water-in-oil emulsion, W/O) มีน้ำเป็นวัฏภาคภายใน และน้ำมันเป็นวัฏภาคภายนอก เช่น เนย (butter) มายองเนส (mayonnaise) น้ำสลัด (salad dressing) ไส้กรอก (sausage) ข้อสังเกตุ หรือวิธีทดสอบอิมัลชันประเภทนี้คือ สามารถทำให้เจือจางได้ด้วยการเติมน้ำมัน มีค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity) ต่ำกว่า ผสมได้กับสีชนิดที่ละลายน้ำมัน (oil soluble dye)

2.4.2 กลไกการเกิดอิมัลชัน

การทำให้ของเหลวแตกตัว กระจายเป็นหยดขนาดเล็กๆ ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างของเหลว 2 ชนิด สามารถทำได้ด้วยการใช้ แรงกล เช่น การผสม (mixing) ด้วยเครื่องผสม (mixer) การโฮโมจิไนซ์ (homogenization) ด้วยเครื่องโฮโมจิไนซ์ (homogenizer) เครื่องบดคอลลอยด์ (colloid mill) การทำให้อิมัลชันคงตัว เพื่อไม่ให้แยกชั้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ ด้วยการลดแรงตึงผิวของของเหลวทั้งสองส่วน โดยการเติมสารอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 การไม่คงตัวของอิมัลชัน

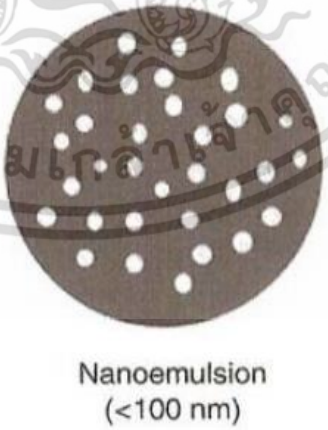
การไม่คงตัวของอิมัลชัน อาจเกิดจากการรวมตัวกัน (coalescense) หรือการจับกลุ่ม (flocculation) ของวัฏภาคภายใน มีสาเหตุมาจากหลายประการ เช่น ในน้ำนม (milk) ความร้อน ทำลายฟิมส์โปรตีนที่ห่อหุ้มวัฏภาคภายใน ทำให้แยกชั้นครีม (cream)

2.4.4 อิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier)

คือสารที่ใช้ลดแรงตึงผิว (surface tension) ของของเหลว โดยช่วยป้องกันอิมัลชันไม่ให้แยกเป็นชั้น ซึ่งในโมเลกุลของอิมัลซิไฟเออร์ มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic property) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic property) โดยจะหันส่วนที่ชอบน้ำเข้าหาน้ำ และหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหาน้ำมัน เกิดเป็นฟิมส์หุ้มส่วนที่เป็นวัฏภาคภายในไว้ ตัวอย่างของอิมัลซิไฟเออร์ ที่ใช้ในอาหาร เช่น มอโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) ไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) ฟอสโฟลิพิด (phospholipid) เช่น เลซิทิน (lecithin)

2.5 Nano-emulsion

นาโนอิมัลชัน (Nano-emulsion) เป็นระบบที่ประกอบด้วยน้ำมัน และน้ำและสารลดแรงตึงผิว อาจมีลักษณะเป็นของเหลวใสที่มีความคงตัวทางเทอร์โมไดนามิกส์สูง ขนาดของหยดอนุภาคในตำรับมักมีขนาดเล็กกว่า 100 นาโนเมตร สามารถคงรูปอยู่ได้จากผิวฟิล์มของสารลดแรงตึงผิว (Parveen *et al.,* 2012)



ภาพที่ 2.1 ภาพแสดงลักษณะของนาโนอิมัลชัน (Venugaranto et al., 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Plant essential oils เป็น secondary metabolites ของพืช จัดเป็น flavoring agents ที่มีความที่มีความปลอดภัยระดับ GRAS คือ Generally recognized as safe สำหรับการบริโภคของสัตว์และมนุษย์ โดย Food and Drug Administration of the United States (USFDA) (Hyldgaard *et al.,* 2012; Shah *et al.,* 2012) น้ำมันหอมระเหยได้ถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร เนื่องจากสามารถต้านทานการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อยีสต์และเชื้อราที่ก่อโรคในอาหารได้ มีการศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดี (Moore-Neibel *et al.,* 2011) แต่ข้อจำกัดของน้ำมันหอมระเหยคือมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic property) ซึ่งทำให้มีข้อจำกัดในการนำไปใช้ในอาหาร จึงมีการปรับปรุงคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการแขวนลอยในน้ำ และ เพิ่มผิวสัมผัส เช่นการผสมกับสารลดแรงตึงผิว (emulsifier) เพื่อเป็นสาร emulsion แต่ก็พบปัญหาเรื่องความคงตัว และ ประสิทธิภาพของการต้านเชื้อแบคทีเรีย จึงมีการพัฒนาการลดขนาดของอนุภาคเป็นสาร nano-emulsion แต่ยังมีการศึกษาที่น้อยอยู่ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ที่ได้ทำการรวบรวมผลงานวิจัยการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย emulsion จากน้ำมันหอมระเหย และ nano-emulsion จากน้ำมันหอมระเหย ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 งานวิจัยศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

Type of essential oil	Treat on	Bacteria	Log Reduction	Reference
Myrtle oil	lettuce	*Salmonella* Typhimurium	2	Gunduz *et al.* (2009)
Oregano oil	lettuce	*S.* Typhimurium	2	Gunduz *et al.* (2010)
1,000 ppm Sporan (clove, rosemary, thyme oil)	Iceberg lettuce	*E. coli, Salmonella*	2.7	Yossa *et al.* (2013)
1,000 ppm Sporan (clove, rosemary, thyme oil)	Romaine lettuce	*E. coli, Salmonella*	1	Yossa *et al.* (2013)
0.5% lemongrass (5,000 ppm)	Organic lettuce	*Salmonella*	4	Moore-Neibel *et al.* (2011)
5-10% of clove extract	-	*E. coli* 0157:H7 *S.* Typhimurium	4	Kim *et al.* (2011)
Peppermint oil emulsion	Pure culture	*Listeria monocytogenes* *Staphylococus aureus*	-	Liang *et al.* (2012)
Basil oil emulsion	Pure culture	*E. coli*	-	Ghosh *et al.* (2013)
Terpenes nano-emulsion	Fruit juice	Spoilage microorganism	-	Donsì *et al.* (2011)
Thymol dispersion	Apple cider, milk	*E. coli,* *L. monocytogenes*	-	Shah *et al.* (2012)
0.5% Oregano nano-emulsion	lettuce	*L. monocytogenes* *S.* Typhimurium *E. coli* 0157:H7	3.44, 2.31, and 3.05	Bhargava *et al.* (2015)
1% Oregano nano-emulsion	lettuce	*L. monocytogenes* *S.* Typhimurium *E. coli* 0157:H7	3.57, 3.26, and 3.35	Bhargava *et al.* (2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1วัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัย

มะเขือเทศพันธุ์ราชินีจากตลาดในเขตมีนบุรีและลาดกระบัง เพื่อใช้ในการทดลองผลของ lemongrass oil nano-emulsion และ lemongrass oil emulsion ในการยับยั้งเชื้อเชื้อ *E. coli* บนมะเขือเทศสด

3.2 อุปกรณ์การทดลอง

3.2.1 เครื่องวัดการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (particle analyzer) (Malvern รุ่น ZetaSizer Nano ZS Malvern Instrument Ltd ประเทศอังกฤษ)

3.2.2 เครื่องอัลตราโซนิกเคเตอร์ (Ultrasonicator) (Qsonica รุ่น Q55 ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.2.3 เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น Dragon 3002 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

3.2.4 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดัน (Autoclave) (Tomy รุ่น ES315 ประเทศญี่ปุ่น)

3.2.5 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow) (Bosstech ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.2.6 ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส (Memmert ประเทศเยอรมนี)

3.2.7 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Heraeus ประเทศเยอรมนี)

3.2.8 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy (SEM)) (รุ่น JSM-5410LV บริษัท JEOL ประเทศญี่ปุ่น)

3.2.9 เครื่องทำแห้งตัวอย่าง ณ จุดวิกฤต (Critical point dryer) (Leica รุ่น EM CPD300 ประเทศ ออสเตรเลีย)

3.2.10 เครื่องเคลือบตัวอย่างด้วยโลหะหนัก (Sputter coater) (Balzers รุ่น SCD 040 ประเทศเยอรมนี)

3.2.11 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) (Eppendorf รุ่น Centrifuge 5425 ประเทศเยอรมนี)

3.2.12 ตู้เย็นที่ใช้เก็บเชื้อและอาหาร 4 องศาเซลเซียส

3.2.13 ตู้เย็นที่ใช้เก็บเชื้อและอาหาร 10 องศาเซลเซียส

3.2.14 ไมโครเวฟ (Sharp ประเทศเยอรมัน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.15 เครื่องตีปั่น (Sharp ประเทศเยอรมัน)

3.2.16 เครื่อง Mcfarland (รุ่น Grant Instruments™ DEN-1 Grant BIO™ ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.2.17 ไมโครปิเปตขนาด 1,000 และ 100 ไมโครลิตร (Thermo scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.2.18 ทิป ขนาด 1,000 และ 100 ไมโครลิตร

3.2.19 ห่วงเขี่ยเชื้อ

3.2.20 หลอดทดลองกับฝาหลอดทดลองขนาด 16 x 150 เซนติเมตร

3.2.21 แท่งแก้วคนสารขนาด 12 นิ้ว

3.2.22 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.2.23 แผ่นอลูมิเนียมฟอยด์

3.2.24 แท่งแก้วสามเหลี่ยม

3.2.25 ขวดดูแลน ขนาด 1,000 มล.

3.2.26 บีกเกอร์ขนาด 500 และ 1,000 มล.

3.2.27 กระบอกตวงขนาด 1,000 มล.

3.2.28 ขวดปรับปริมาตร

3.2.29 จานเพาะเชื้อ

3.2.30 ถุงพลาสติกใสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว สำหรับการตีป่น (Stomacher sterilized bag)

3.2.31 ถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว สำหรับการเก็บรักษามะเขือเทศ (Sterilized bag)

3.2.32 กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว สำหรับตัดตัวอย่าง (Sterilized scisor for sample)

3.2.33 ถาดเพาะเชื้อชนิด 96 Micro well plate

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar (Himedia ประเทศอินเดีย)

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (Himedia ประเทศอินเดีย)

3.3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Muellere Hinton Broth (Himedia ประเทศอินเดีย)

3.3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar (Himedia ประเทศอินเดีย)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 สารเคมี

3.4.1 น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*) (อุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย – จีน ประเทศไทย)

3.4.2 ทวีน 80 (Tween 80, Polysorbate 80) (Food grade Sigma Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.4.3 น้ำปราศจากอิออน (Deionized water)

3.4.4 บัตเตอร์ฟิวฟอสเฟสบัฟเฟอร์ (Butterfield's Phosphate-Buffered)

3.4.5 แอลกอฮอล์ 95 % (กรมสรรพสามิต ประเทศไทย)

3.4.6 2.5% glutaraldehyde

3.4.7 30% 50% 70% 95% และ 100% ethanol

3.4.8 3% Sodium hypochlorite (Carlo Erba ประเทศฝรั่งเศส)

3.5 เชื้อจุลินทรีย์

3.5.1 เชื้อ *Escherichia coli* TISTR 780 จากกรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การเตรียมและการศึกษาลักษณะของ lemongrass oil emulsion และ lemongrass oil nano-emulsion

3.6.1.1 การเตรียม lemongrass oil emulsion โดยผสมน้ำมันตะไคร้ ปริมาตร 6 มล. กับ Tween 80 ปริมาตร 3 มล. ในอัตรา 2:1 แล้วเติม deionized water ปริมาตร 50 มล. ผสมให้เข้ากัน บรรจุในขวดแก้วปิดฝา emulsion ที่ได้จะเป็น emulsion ชนิด oil in water

3.6.1.2 การเตรียม lemongrass oil nano-emulsion โดยผสมน้ำมันตะไคร้ กับ Tween 80 ในอัตรา 2:1 แล้วเติม deionized water ผสมให้เข้ากัน ดังแสดงในข้อ 3.6.1.1 จากนั้นนำไปผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 10 20 30 40 และ 50 นาที ใช้ ที่อุณหภูมิ 10 ± 5 องศาเซลเซียส

3.6.1.3 การวัดขนาดและค่าดัชนีการกระจายตัวของอนุภาค (polydispersity index (PDI)) ของ lemongrass oil emulsion และ lemongrass oil nano-emulsion โดยนำ lemongrass oil emulsion และ lemongrass oil nano-emulsion 100 ไมโครลิตร เจือจางด้วยน้ำ 900 ไมโครลิตร ไปวัดขนาดด้วยเครื่อง particle analyzer ยี่ห้อ Malvern รุ่น ZetaSizer Nano ZS โดยขนาดของสารมีหน่วยเป็น นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.1.4 การศึกษาความคงตัวของ lemongrass oil emulsion และ lemongrass oil nano-emulsion โดยนำ lemongrass oil emulsion และ lemongrass oil nano-emulsion 200 มิลลิลิตรบรรจุในหลอดแก้วใสปิดสนิท ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการแยกชั้นของสารเมื่อเวลา 1 ชั่วโมง 15 วัน และ 30 วัน (ดัดแปลงจาก Cheong *et at.,* 2016)

3.6.2 การเตรียมเชื้อ *Escherichia coli*

เชื้อ *E. coli* ที่เลี้ยงบนอาหาร TSA slant บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ 0-5 องศาเซลเซียสในตู้เย็น เป็น stock culture และถ่ายเชื้อลง TSA slant ใหม่ทุกอาทิตย์ระหว่างการทดลอง

การเตรียมเชื้อ *E. coli* ในอาหารเหลว Trypticase soy broth โดยถ่ายเชื้อจาก TSA stock culture จำนวน 1 ลูป มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth ปริมาตร 10 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหาร Trypticase soy broth โดยปิเปตเชื้อมา 1 มล. ทำการเจือจางด้วย Butterflied phosphate buffer (น้ำยาเจือจาง) ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-7} ตรวจนับเชื้อเริ่มต้นด้วยเทคนิค spread plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ต้องการที่ 10^{7} CFU/ml

ทำการวัดปริมาณเชื้อด้วยเครื่อง Macfarland ที่ 0.5 มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No 0.5 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ได้จะเท่ากับ $1.5x10^{8}$ cfu/ml ทำการตรวจสอบหาจำนวนเชื้อที่ใช้ในการทดสอบโดยใช้วิธี spread plate

3.6.3 การศึกษาค่า Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) และMinimum Bactericidal Concentrations (MBC) ของ lemongrass oil nano-emulsion และ lemongrass oil emulsion ต่อ เชื้อ *Escherichia coli* (CLSI, 2012)

3.6.3.1 การวัดการศึกษาค่า Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) ด้วยวิธี broth micro dilution method (CLSI, 2012)

การเตรียม สาร lemongrass oil emulsion และ lemongrass oil nano-emulsion ความเข้มข้น 30,000 ppm ตามข้อ 3.6.1.1 และ 3.6.1.2

เตรียมอาหารเหลว Muller Hinton Broth (MHB) อัตราส่วนอาหาร 21 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร อุ่นให้ร้อน นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่องฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซส 15 นาที ถ่ายใส่ถาดเพาะเชื้อชนิด 96 well micro dilution plate ตามแนวยาวใส่อาหาร Mueller Hinton Broth ทุกหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร

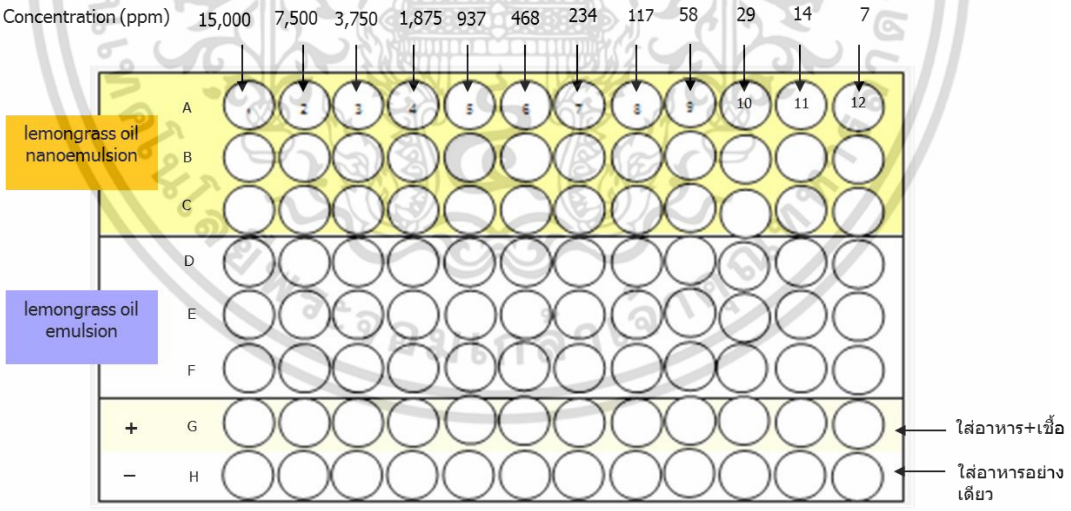
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งนี้ 3 แถวแรก (A,B,C) จะทดสอบด้วย lemongrass oil nano-emulsion โดย 1 แถว คือ 1 ซ้ำ ดูด lemongrass oil nano-emulsion ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่หลุมที่ 1 จากนั้นทำ two-fold serial dilution โดยดูดจากหลุมที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่หลุมที่ 2 ดูดจากหลุมที่ 2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่หลุมที่ 3 ทำการเจือจางดูด lemongrass oil nano-emulsion ไปเรื่อยๆ จนครบ 12 หลุมในแนวนอน โดยจะทำเช่นเดียวกันกับหลุมที่ 1-12 ของแถว B และ C

ในขณะที่ 3 แถวต่อมา (D,E,F) จะทดสอบด้วย lemongrass oil emulsion โดย 1 แถว คือ 1 ซ้ำ ดูด lemongrass oil emulsion ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่หลุมที่ 1 ทำ two-fold serial dilution โดยดูดจากหลุมที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่หลุมที่ 2 จากนั้นดูดจากหลุมที่ 2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่หลุมที่ 3 ทำการเจือจางดูด lemongrass oil emulsion ไปเรื่อยๆ จนครบ 12 หลุมในแนวนอน โดยทำเช่นเดียวกันกับหลุมที่ 1-12 ของแถว E และ F

ส่วนแถว G เป็น Positive Control ใส่เชื้อเพียงอย่างเดียวไม่ต้องใส่ antibacterial agent เพื่อดูว่าเชื้อจะขึ้นในอาหารชนิดนี้ได้หรือไม่ และแถวที่ H เป็น Negative Control ไม่ต้องใส่เชื้อ และไม่ต้องใส่ antibacterial agent เพื่อดูว่าการทดลองปลอดเชื้อและไม่มีการปนเปื้อน

ต่อมาทำการถ่ายเชื้อ *E. coli* ลงทุกหลุม เว้นแถว H (12 หลุม ไม่มีการใส่เชื้อ) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสังเกตหลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ *E. coli* ทั้งนี้ลักษณะการศึกษา MIC แสดงในภาพที่ 3.1

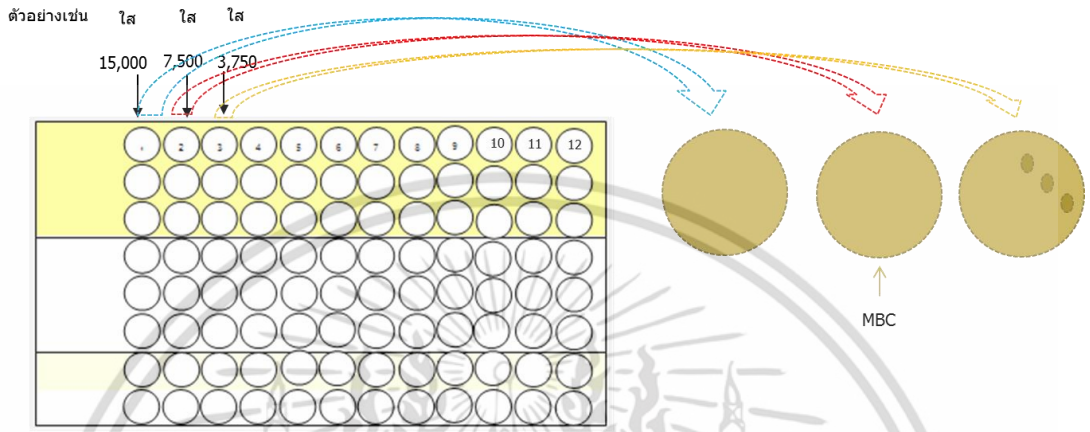


ภาพที่ 3.1 แผนภาพแสดงการทดลองค่า Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) ของ lemongrass oil nano-emulsion และ lemongrass oil emulsion ต่อ เชื้อ *Escherichia coli*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.3.2 การวัดการศึกษาค่า Minimum Bactericidal Concentrations (MBC)

นำสารละลาย 100 มล. จากหลุมที่ไม่มีการเจริญโดยสังเกตุจากความใส มาลงใน TSA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหาดูการเจริญของเชื้อในจานเพาะเชื้อ และ หา Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) ดังแสดงในภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 แผนภาพแสดงการทดลองค่า Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) ของ lemongrass oil nano-emulsion และ lemongrass oil emulsion ต่อ เชื้อ *Escherichia coli*

3.6.4 การศึกษาผลของ lemongrass oil nano-emulsion ในการลดลงของเชื้อ *Escherichia coli* บนมะเขือเทศราชินีสด

การเตรียมเชื้อ *E. coli* ในอาหารเหลว Trypticase soy broth โดยถ่ายเชื้อจาก TSA stock culture จำนวน 1 ลูป มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth ปริมาตร 10 มล บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง ทำการวัดปริมาณเชื้อด้วยเครื่อง Macfarland ที่ 0.5 มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No 0.5 โดย วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ได้จะเท่ากับ $1.5x10^8$ cfu/ml นำไปใช้ในขั้นตอน inoculation

คัดเลือกมะเขือเทศที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ล้างมะเขือเทศให้สะอาด (ดัดแปลงจากภัทราวดี ศรีปัญญา, 2552) โดยล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อปริมาตร 1.5 ลิตร ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง สะบัดน้ำเบาๆ และจุ่มมะเขือเทศใน 3% sodium hypochlorite เป็นเวลา 3 นาที และ ล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อปริมาตร 0.5 ลิตร ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง สะบัดน้ำเบาๆ ผึ่งให้แห้งในตู้ laminar flow เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจุ่มมะเขือเทศในบีกเกอร์พลาสติกที่มีสารละลายเชื้อ *E. coli* เป็นเวลา 5 นาที โดยเตรียมสารละลายเชื้อ *E. coli* ให้มีความเข้มข้น 10^8 cfu/g จากนั้นนำผึ่งให้แห้งบนตะแกรงในตู้ laminar flow เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 10 นาที หรือจนกว่าจะไม่มีหยดน้ำที่ผิวของมะเขือเทศ จะได้เชื้อที่ติดที่มะเขือเทศ 7 log CFU/g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลือก lemongrass oil nano-emulsion ที่ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ จากผลของ MIC และ MBC จากข้อ 3.6.3.1 และ 3.6.3.2 มาทดสอบในมะเขือเทศ นำมะเขือเทศจุ่มเป็นเวลา 1 นาที ใน lemongrass oil nano-emulsion ปริมาตร 200 มล. ที่ความเข้มข้นที่เลือกไว้ ทำให้แห้งโดยตั้งทิ้งไว้ในตู้ laminar flow เป็นเวลา 30 นาที แล้วใส่ถุงปลอดเชื้อ เก็บไว้ที่ 10 องศาเซลเซียส โดยตัวอย่างควบคุมจะใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (Sterile distilled water) เปรียบเทียบกับ lemongrass oil nano-emulsion

การวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่ 0 3 24 48 และ 72 ชั่วโมง หลังจากที่ทดสอบด้วย lemongrass oil nano-emulsion โดยสุ่ม 10 กรัมของตัวอย่างใส่ลงในถุงตีป่นแล้วเติมสารละลายบัตเตอร์ฟิวฟอสเฟสบัฟเฟอร์ (Butterfield's Phosphate-Buffered) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 90 มล. ตีป่นด้วยเครื่องตีป่น ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 นาที ทำการเจือจาง 10 เท่า (Ten fold dilution) โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มล. ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9 มล. จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ด้วย Spread plate technique บ่มที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจนับปริมาณ *E. coli* เปรียบเทียบกับเชื้อ *E. coli* ในมะเขือเทศชุดควบคุมที่ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และทำการวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* ในมะเขือเทศที่ผ่านกระบวนการล้างให้ปลอดเชื้อแต่ไม่จุ่มสารละลายเชื้อ *E. coli* เพื่อเป็น Negative control และ มะเขือเทศที่ผ่านกระบวนการล้างให้ปลอดเชื้อ และจุ่มสารละลายเชื้อ *E. coli* แต่ไม่ผ่านการจุ่มในน้ำหรือ lemongrass oil nano-emulsion เพื่อเป็น Positive control

ศึกษาลักษณะภายนอกของมะเขือเทศชุดที่ล้างด้วย lemongrass oil nano-emulsion และชุดควบคุมที่ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยสังเกตลักษณะสี การเน่าเสีย และกลิ่น ในแต่ละ 0 3 24 48 และ 72 ชั่วโมง

3.6.5 การศึกษาลักษณะ เชื้อ *Escherichia coli* ที่ผ่านการล้าง lemongrass oil nano-emulsion ด้วย Scanning Electron Microscopy (SEM)

นำสารละลายเชื้อ *E. coli* 10^6 CFU/ml bacterial cultures จากข้อ 3.6.2 ผสมกับ lemongrass oil nano-emulsion ที่ความเข้มข้นที่เลือกไว้จากข้อ 3.6.3.2 เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (centrifuge) ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และดูดสารละลายใสด้านบนออกให้เหลือเพียงเซลล์ที่ตกตะกอนอยู่ด้านล่าง นำตัวอย่างที่มีการทดสอบด้วย lemongrass oil nano-emulsion และตัวอย่างที่ไม่มีการทดสอบด้วย lemongrass oil nano-emulsion ไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy (SEM)) ที่ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แช่ตัวอย่างใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer saline pH 7.2 เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นล้างตัวอย่างด้วย 0.1 M phosphate buffer saline จำนวน 2 ครั้งครั้งละ 5 นาที และ ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างผ่านกระบวนการนำน้ำออกด้วย 30% 50% 70% 95% 100% ethanol เป็นเวลา 10 นาทีในแต่ละครั้ง นำตัวอย่างผ่านเครื่องทำแห้งตัวอย่าง ณ จุดวิกฤต (Critical point dryer) เคลือบทองด้วยเครื่องเคลือบตัวอย่างด้วยโลหะหนัก (Sputter coater)

3.6.6 การวางแผนการทดลอง

ทำการออกแบบการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ในการศึกษาขนาดของ lemongrass oil emulsion และ lemongrass oil nano-emulsion รวมถึงการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง ใช้ one way ANOVA เปรียบเทียบนำผลการทดลอง วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Minitab 16 จากบริษัท Minitab Inc ประเทศสหรัฐอเมริกา และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Turkey's ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาลักษณะของ lemongrass oil emulsion และ lemongrass oil nano-emulsion

จากการเตรียมสาร lemongrass oil emulsion โดยการผสมน้ำมันตะไคร้ กับ Tween 80 และสารลดแรงตึงผิวที่มี hydrophilic lipophilic balance (HLB=15) ที่เหมาะสม (Ghosh *et al.,* 2013) ในอัตราส่วน 2:1 แล้วเติม deionized water ผสมให้เข้ากัน และ การเตรียม lemongrass oil nano-emulsion โดยเตรียมเช่นเดียวกับ lemongrass oil emulsion และทำการลดขนาดโดยใช้เครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด ที่อุณหภูมิ 10 ± 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ เมื่อทำการวัดขนาดของ lemongrass oil emulsion และ lemongrass oil nano-emulsion โดยใช้เครื่อง particle analyzer ยี่ห้อ Malvern รุ่น ZetaSizer Nano ZS ผลขนาดของ lemongrass oil emulsion และ lemongrass oil nano-emulsion แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ขนาดของ lemongrass oil emulsion และ lemongrass oil nano-emulsion ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator ที่เวลาต่างๆ

สูตร	ระยะเวลาในการลดขนาด (นาที)	ขนาด* (นาโนเมตร)	PDI**
Lemongrass oil emulsion	0	$1,386.67^{a} \pm 48.6$	$0.35^{a} \pm 0.039$
Lemongrass oil nano-emulsion	10	$162.27^{b} \pm 4.08$	$0.28^{ab} \pm 0.003$
Lemongrass oil nano-emulsion	20	$148.53^{bc} \pm 1.52$	$0.24^{bc} \pm 0.006$
Lemongrass oil nano-emulsion	30	$120.7^{bc} \pm 7.37$	$0.26^{bc} \pm 0.025$
Lemongrass oil nano-emulsion	40	$103.5^{c} \pm 2.62$	$0.25^{bc} \pm 0.037$
Lemongrass oil nano-emulsion	50	$105.17^{c} \pm 1.79$	$0.20^{c} \pm 0.024$

*Mean ± Standard deviation, ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย Tukey's test

**PDI คือ polydispersity index.

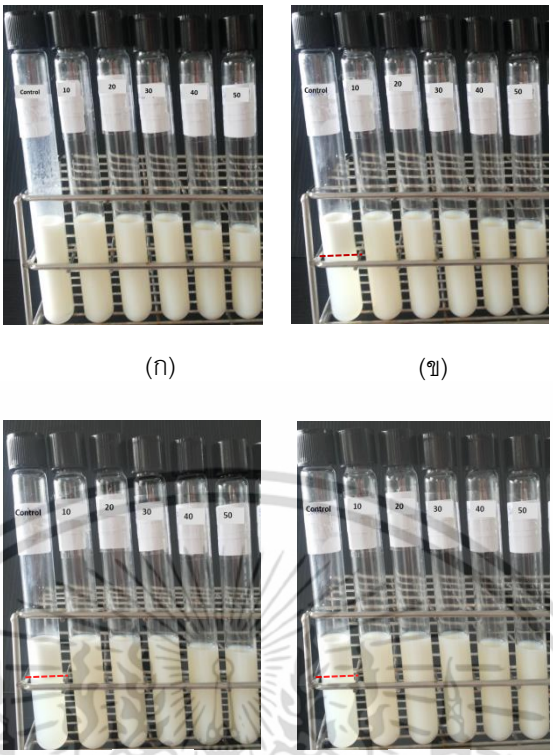
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองพบว่าขนาดของ lemongrass oil nano-emulsion จากลดขนาดด้วยเวลา 10 20 30 40 และ 50 นาที มีขนาดเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับ lemongrass oil emulsion ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้ขนาดที่เล็กที่สุดมาจากการลดขนาดด้วยเวลา 50 นาที แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการลดขนาดด้วยเวลา 40 นาที ($p \geq 0.05$) แต่มีขนาดที่แตกต่างกับ lemongrass oil nano-emulsion ที่ผ่านการลดขนาดที่เวลา 10 20 และ 30 นาที อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) การลดขนาดของ lemongrass oil nano-emulsion โดยใช้เครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด มีผลที่ใกล้เคียงกับการลดขนาดของ Oregano oil nano-emulsion ที่มีขนาด 148 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Ultrasonicator (Model 300, Fisher Scientific Sonic Dismembrator) ที่ 750 W ที่อุณภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที (Bhargava *et al.,* 2015)

จากผลการทดลองพบว่า ค่าดัชนีการกระจายตัวของอนุภาค (polydispersity index; PDI) ของ lemongrass oil emulsion และ lemongrass oil nano-emulsion จากลดขนาดด้วยเวลา 10 20 30 40 และ 50 นาที มีค่าต่ำ 0.7 ซึ่งถือว่าการใช้เครื่อง ZetaSizer Nano สำหรับการวัดขนาดอนุภาคโดยการกระเจิงแสงแบบพลวัต (Dynamic Light Scattering Techique) มีความเหมาะสม

จากการศึกษาความคงตัวของสาร lemongrass oil emulsion และ lemongrass oil nano-emulsion พบว่า lemongrass oil nano-emulsion มีความคงตัวมากกว่า lemongrass oil emulsion โดยพบว่า lemongrass oil emulsion มีการแยกชั้นของสารเมื่อทำการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ที่เวลา 1 ชั่วโมง แต่ไม่พบการแยกชั้นของ lemongrass oil nano-emulsion แม้จะทำการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน ตามภาพ 4.1 ซึ่งระยะเวลาความคงตัวของ lemongrass oil nano-emulsion ใกล้เคียงกับ Kenaf seed oil in water nano-emulsion ซึ่งพบว่ามีความคงตัว ไม่พบการแยกชั้นของสาร หลังจากตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน (Cheong *et at.,* 2016) ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ในอาหารต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข)

(ค) (ง)

ภาพที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพแสดงความคงตัวของสาร lemongrass oil emulsion (control) และ lemongrass oil nano-emulsion (10 20 30 40 และ 50) เมื่อทำการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง: (ก) 0 ชั่วโมง; (ข) 1 ชั่วโมง; (ค) 15 วัน; (ง) 30 วัน

หมายเหตุ --- เส้นประสีแดงแสดงจุดแบ่งแยกชั้นของสาร

4.2 ค่า Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) ของ lemongrass oil nano-emulsion และ lemongrass oil emulsion ต่อ เชื้อ *Escherichia coli*

ผลการทดลองหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้ Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) ของสาร lemongrass oil nano-emulsion และ lemongrass oil emulsion ต่อ เชื้อ *E. coli* แสดงค่าดังตารางที่ 4.2

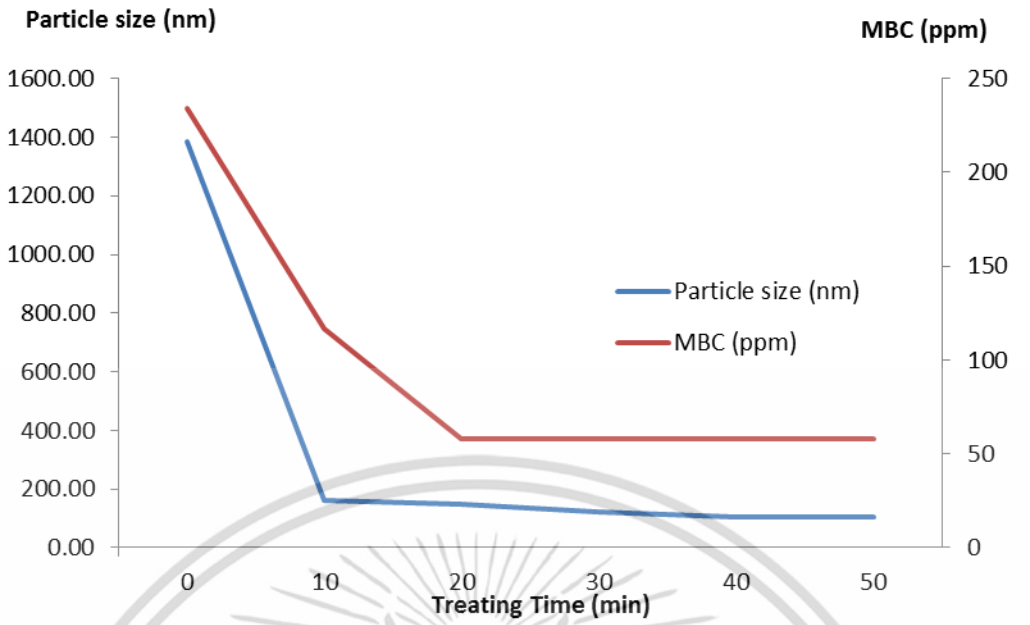
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (MIC) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลาย (MBC) ของสาร lemongrass oil nano-emulsion และ lemongrass oil emulsion ต่อ เชื้อ *Escherichia coli*

สูตร	ระยะเวลาในการลดขนาด (นาที)	MIC (ppm)	MBC (ppm)
Lemongrass oil emulsion	0	234	234
Lemongrass oil nano-emulsion	10	117	117
Lemongrass oil nano-emulsion	20	58	58
Lemongrass oil nano-emulsion	30	58	58
Lemongrass oil nano-emulsion	40	58	58
Lemongrass oil nano-emulsion	50	58	58

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาการลดขนาด ขนาดของสารจะลดลง ในขณะที่ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* เพิ่มสูงขึ้น ตามภาพที่ 4.2 ค่าสูงสุดที่พบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* อยู่ที่ lemongrass oil nano-emulsion ที่มีระยะเวลาในการลดขนาด 20 นาที แต่ไม่พบความแตกต่างของประสิทธิภาพการยับยั้งจาก lemongrass oil nano-emulsion ที่มีระยะเวลาในการลดขนาด 30 40 และ 50 นาที ($p \geq 0.05$) ทั้งนี้น้ำมันหอมระเหยตะไคร้มีสาร Citral เป็นองค์ประกอบสำคัญในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ (Shi *et al.,* 2016) การลดขนาดของสาร จะช่วยลดสมบัติความไม่ชอบน้ำ (hydrophobic property) ของ emulsion และเพิ่มประสิทธิภาพในการเข้าถึงเซลล์ *E.coli* ที่มีขนาดประมาณ 1 x 3 μm (Reshes *et al.,* 2008) จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของสารได้ จากผลการทดลองจึงได้คัดเลือก lemongrass oil nano-emulsion ที่มีระยะเวลาในการลดขนาด 20 นาทีมาศึกษาประสิทธิภาพในการลดเชื้อ *E. coli* บนมะเขือเทศสด เนื่องจากเป็นสารที่มีเวลาในการลดขนาดน้อยที่สุด ในกลุ่มสารทดลองที่มีค่า MIC และ MBC น้อยที่สุดคือ 58 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาการลดขนาด ขนาดอนุภาคของสาร และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลาย (MBC) ของสาร lemongrass oil nano-emulsion และ lemongrass oil emulsion ต่อ เชื้อ *E. coli* TISTR 780

4.3 ผลของ lemongrass oil nano-emulsion ในการลดลงของเชื้อ *Escherichia coli* บนมะเขือเทศสด

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ lemongrass oil nano-emulsion ในการลดลงของเชื้อ *E. coli* บนมะเขือเทศสด เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แสดงค่าดังตารางที่ 4.3 พบว่าการล้างมะเขือเทศด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อ *E. coli* ที่ 6.09-23.11% โดยที่เวลา 0 3 24 48 และ 72 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อ *E. coli* ที่ 23.11 22.59 14.17 12.92 และ 6.09% ตามลำดับ การล้างมะเขือเทศด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เวลา 0 และ 3 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อ *E. coli* ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$) เปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อ *E. coli* ที่น้อยที่สุด คือ 6.09 % มาจากการล้างมะเขือเทศด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อและทิ้งไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ขณะที่การล้างมะเขือเทศด้วย lemongrass oil nano-emulsion มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อ *E. coli* ที่ 37.07-49.73% โดยที่เวลา 0 3 24 48 และ 72 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อ *E. coli* ที่ 49.73 40.21 40.21 41.05 และ 37.07% ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อ *E. coli*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มากที่สุดอยู่ที่เวลา 0 ชั่วโมง คือ 49.73% ซึ่งมีความแตกต่างกับการล้างมะเขือเทศด้วย lemongrass oil nano-emulsion และทิ้งไว้เป็นเวลา 3 24 48 และ 72 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

อีกทั้งยังพบว่าการล้างมะเขือเทศด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อสามารถลดปริมาณเชื้อ *E. coli* ได้ 1-2 log ในขณะที่การล้างมะเขือเทศด้วย lemongrass oil nano-emulsion สามารถลดปริมาณเชื้อ *E. coli* ได้ 3-4 log มะเขือเทศที่ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และ lemongrass oil nano-emulsion เมื่อถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส พบว่า เปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อลดลงเมื่อเวลาผ่านไป แต่ในมะเขือเทศที่ล้างด้วย lemongrass oil nano-emulsion เปอร์เซ็นต์การลดลงของเชื้อ *E. coli* จะคงที่ในระดับสูงกว่า

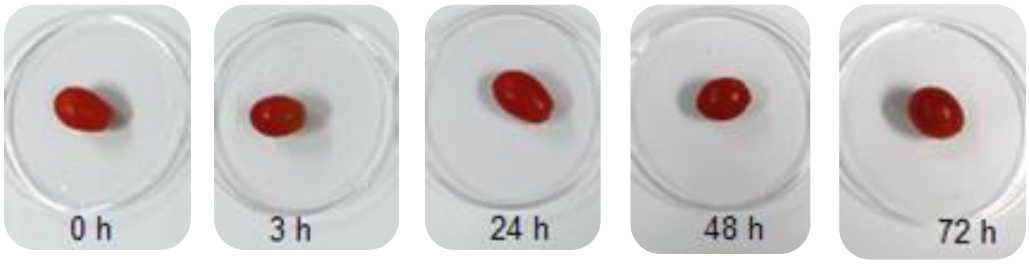
ตารางที่ 4.3 จำนวนเชื้อ *Escherichia coli* บนมะเขือเทศเมื่อใช้ lemongrass oil nano-emulsion ในการล้างและเก็บที่ 10 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับการล้างด้วยน้ำ

เวลา (ชั่วโมง) ที่ 10 ^{0}C	**ล้างน้ำ (log CFU/g)**	**การลดลง (%)**	**ล้างด้วย lemongrass oil nano-emulsion (log CFU/g)**	**การลดลง (%)**
0	$5.38^{a} \pm 0.428$	$23.11^{a} \pm 6.119$	$3.52^{a} \pm 0.072$	$49.73^{a} \pm 1.03$
3	$5.42^{a} \pm 0.102$	$22.59^{a} \pm 1.452$	$4.19^{b} \pm 0.111$	$40.21^{b} \pm 1.589$
24	$6.01^{ab} \pm 0.093$	$14.17^{ab} \pm 1.324$	$4.19^{b} \pm 0.111$	$40.21^{b} \pm 1.589$
48	$6.1^{ab} \pm 0.427$	$12.92^{ab} \pm 6.106$	$4.12^{b} \pm 0.11$	$41.047^{b} \pm 1.581$
72	$6.57^{b} \pm 0.311$	$6.09^{b} \pm 4.435$	$4.40^{b} \pm 0.111$	$37.07^{b} \pm 1.588$

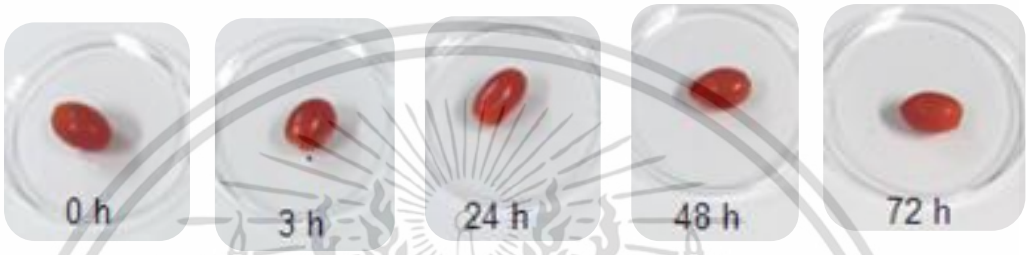
*Mean ± Standard deviation, ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย Tukey's test

ลักษณะของมะเขือเทศของชุดทดลองที่ผ่านการล้าง lemongrass oil nano-emulsion และชุดทดลองควบคุมที่ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 0 3 24 48 และ 72 ชั่วโมง ดังภาพที่ 4.3 พบว่ามะเขือเทศชุดทดลองควบคุมที่ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ สภาพของมะเขือเทศยังไม่เน่าเสีย แต่มีกลิ่นเน่าเสีย ส่วนมะเขือเทศของชุดทดลองที่ผ่านการล้าง lemongrass oil nano-emulsion สภาพของมะเขือเทศยังไม่เน่าเสีย มีกลิ่นเน่าเสียน้อยกว่า และมีกลิ่นตะไคร้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.3 ลักษณะมะเขือเทศของชุดทดลองที่ผ่านการล้างด้วย (ก) lemongrass oil nano-emulsion และ (ข) น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ใช้เป็นชุดควบคุม

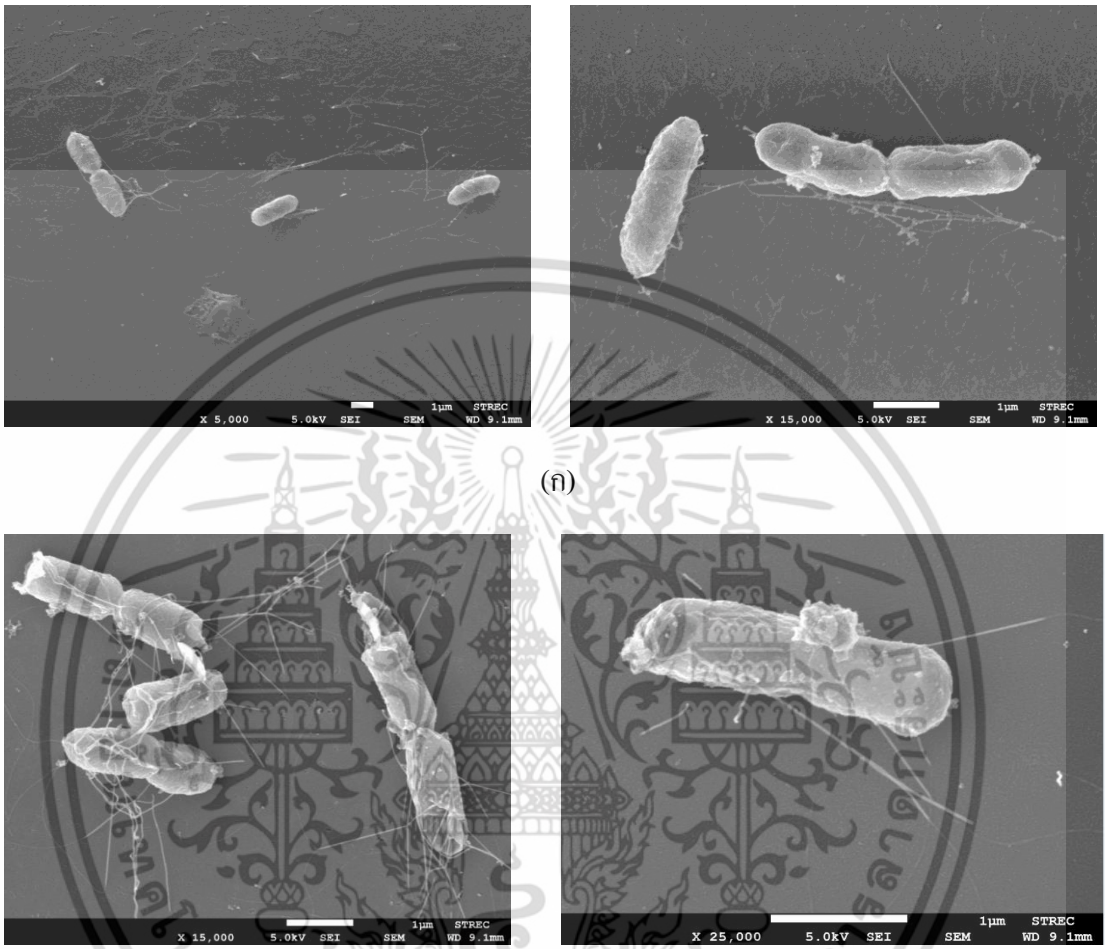
4.4 ลักษณะเชื้อ *Escherichia coli* ที่ผ่านการล้างด้วย lemongrass oil nano-emulsion ด้วย Scanning Electron Microscopy (SEM)

ผลการศึกษาลักษณะเชื้อ *E. coli* ตัวอย่างที่ไม่ผ่านการล้างด้วย lemongrass oil nano-emulsion ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 5,000 เท่าและ15,000 เท่า พบว่าเซลล์มีความสมบูรณ์ดังภาพที่ 4.4 (ก) ส่วนตัวอย่างที่ผ่านการล้างด้วย lemongrass oil nano-emulsion เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 15,000 เท่า และ25,000 เท่า พบว่าสภาพของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายไปดังภาพที่ 4.4 (ข) ทำให้เซลล์ตายและไม่สามารถเจริญได้ แต่ก็พบว่าเซลล์บางส่วนในตัวอย่างที่ผ่านการล้างด้วย lemongrass oil nano-emulsion ยังมีความสมบูรณ์ จึงทำให้สามารถเจริญต่อไปได้

สอดคล้องกับการศึกษาของ Shi *et al.,*(2016) ที่รายงานว่าเมื่อการนำ Citral ซึ่งเป็น monoterpenoid aldehyde ในน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย การศึกษาทดสอบ Citral ต่อเชื้อ *Cronobacter sakazakii* พบว่า Citral ลดปริมาณ intracellular ATP ของเชื้อ *C. sakazakii* อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่ง intracellular ATP มีความจำเป็นต่อการเจริญ การแบ่งตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเก็บพลังงาน และ การทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ อีกทั้งพบว่า Citral ทำลายผนังของเซลล์ *C. sakazakii* ทำให้เซลล์เสียสภาพ



(ก)

(ข)

ภาพที่ 4.4 ลักษณะเซลล์ *Escherichia coli* จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) : (ก) ตัวอย่างที่ไม่ถูกทดสอบด้วย lemongrass oil nano-emulsion ผ่าน กำลังขยาย 5,000 เท่า และ 15,000 เท่า: (ข) ตัวอย่างที่ทดสอบด้วย lemongrass oil nano-emulsion ที่กำลังขยาย 15,000 เท่า และ 25,000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 จากการศึกษาการปรับปรุงน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ให้มีคุณสมบัติเป็นนาโนอิมัลชั่น โดย น้ำมันหอมระเหยนาโนอิมัลชันเตรียมจากน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ผสมกับสารลดแรงตึงผิว ผ่านการลดขนาดด้วยเครื่อง sonicator ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด พบว่าน้ำมันหอมระเหยนาโนอิมัลชันจากตะไคร้มีขนาดเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญ และมีความคงตัวมากกว่าน้ำมันหอมระเหยอิมัลชันจากตะไคร้

5.1.2 จากการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งและการฆ่าเชื้อ *E. coli* TISTR 780 ในหลอดทดลอง พบว่าน้ำมันหอมระเหยอิมัลชันจากตะไคร้ และ น้ำมันหอมระเหยนาโนอิมัลชันจากตะไคร้ที่ผ่านการลดขนาดเป็นเวลา 10 นาที มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อและฆ่าเชื้อที่ 234 และ 117 ppm ตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยนาโนอิมัลชันจากตะไคร้ที่ผ่านการลดขนาดเป็นเวลา 20 30 40 และ 50 นาที มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อและฆ่าเชื้อที่ 58 ppm

5.1.3 สำหรับผลการทดสอบประสิทธิภาพการลดลงของเชื้อ *E. coli* TISTR 780 ของน้ำมันหอมระเหยนาโนอิมัลชันจากตะไคร้บนมะเขือเทศสด โดยเปรียบเทียบกับ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ พบว่าน้ำมันหอมระเหยนาโนอิมัลชันจากตะไคร้สามารถลดเชื้อได้ 4 log ในขณะที่น้ำกลั่นปลอดเชื้อลดได้ 2 log

5.1.4 เมื่อนำเชื้อ *E. coli* TISTR 780 ที่ถูกสัมผัสกับสารน้ำมันหอมระเหยนาโนอิมัลชันจากตะไคร้ไปผ่านการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดพบว่าสภาพของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายไป

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า น้ำมันหอมระเหยนาโนอิมัลชันจากตะไคร้เป็นสารอินทรีย์ทางเลือกหนึ่งสำหรับการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบนผลิตภัณฑ์พืชผักสด

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การปรับปรุง lemongrass oil nano-emulsion เป็นการทดลองโดยใช้วิธี ultrasonication เพื่อทำให้ขนาดของอนุภาคเล็กลง มีการวัดขนาดของอนุภาคของสารและค่า PDI แต่ยังขาดการวัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (Zeta potential) ซึ่งเป็นความต่างศักย์ระหว่างผิวสเตอร์น (stern potential) กับศักย์ไฟฟ้าในสารละลาย ซึ่งสามารถใช้ในการทำนายเสถียรภาพการกระจายตัว (dispersion stability) ของสารได้ โดยอนุภาคที่มีค่า Zeta Potential เป็นบวกหรือลบน้อย จะไม่มีแรงป้องกันอนุภาคอื่นที่เข้ามา ไม่เกิดเสถียรภาพการกระจายตัวหรือเกิดการรวมกัน(Aggregation)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2.2 จากการทดลองพบว่า lemongrass oil nano-emulsion จากวิธี ultrasonication มีขนาดของอนุภาคเล็กลงและมีสมบัติลดเชื้อ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์ผักสดได้โดยการทดลองใช้มะเขือเทศสดเป็นผักตัวแทน อย่างไรก็ดี ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการทดลองในผลิตภัณฑ์อื่นๆ เพื่อศึกษาการใช้งานเพิ่มเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

บุษกร อุตรภิชาติ. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร.พิมพ์ครั้งที่1.การผลิตเอกสารและตำรามหาวิทยาลัยทักษิณ.

ปรีชา จึงสมานุกูล นวรัตน์ รัตนดิลก ณ ภูเก็ต และกมลวรรณ กันแต่ง. 2553. การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผักสด. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 52 (1-2) : 30-39.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. 2561. emulsion / อิมัลชัน. เข้าได้จาก http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0674/emulsion. Food Network Solution Co., Ltd. Accessed date on June 24, 2017.

ภัทราวดี ศรีปัญญา. 2552. ผลของสารสกัดข่า กันเกรา ร่วมกับกรดอะซิติกต่อจุลินทรีย์ก่อโรคบนผักชี. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 41:1 (พิเศษ): 576-580

มณีฉัตร นิกรพันธ. 2538. มะเขือเทศ. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

วันเพ็ญ แสงทองพินิจ อัจฉรา ภู่แดง และ เบญจวรรณ โมราศี. 2555. การตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ของมะเขือเทศราชินีของกลุ่มวิสาหกิจชุมชนตำบลดอนตูม อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม. The 4th NPRU National Conference.: 1-10.

สมพร ภูติยานันต์. 2551. สมุนไพรแต่งสี กลิ่น รส. สมุนไพรใกล้ตัว เล่ม 13.

Bhargava, K., Conti D.S., da Rocha S. R.P., and Zhang Y. 2015. Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. Food Microbiology. 47: 69-73.

CLSI, 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: Approved Standard. M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA

Cheong, A. M., Tan, K. W., Tan, C. P., and Nyam, K. L., Improvement pf physical stability properties of kenaf (Hibiscus cannabinus L.) seed oil-in-water nanoemulsions. Industrial Crops and Products. 80: 77-85.

Croxen, M., and Finlay, B., 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nature Reviews Microbiology. 8: 26-30.

Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, and M., Ferrari, G., 2010. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. Journal of Biotechnology. 44: 1908-1914.

Ghosh, V., Mukherjee, A., and Chandrasekaran, N. 2013. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. Ultrasonics Sonochemistry. 20: 338-344.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gunduz, G.T., Gonul, S.A., and Karapinar, M., 2009. Efficacy of myrtle oil against *Salmonella* Typhimurium on fresh produce. International Journal of Food Microbiology. 130: 147 - 150.

Gunduz, G.T., Gonul, S.A., and Karapinar, M., 2010. Efficacy of oregano oil in the inactivation of *Salmonella* Typhimurium on lettuce. Food Control. 21: 513-517.

Hyldgaard, M., Mygind, T., and Meyer, R.L. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Frontiers in Microbiology. 3(12): 1-24.

Khonsung, P. 2012. ตะไคร้ *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. Thai J Pharmacol 34: 31-51

Kim, S.Y., Kang, D.H., Kim, J.K., Ha, Y.G., Hwang, J.Y., Kim, T., and Lee, S.H.. 2011. Antimicrobial activity of plant extracts against *Salmonella* Typhimurium*, Escherichia coli* O157: H7, and *Listeria monocytogenes* on fresh lettuce. Journal of Food Science. 76: 41-46.

Liang, R., Xu, S., Shoemaker, C.F., Li, Y., Zhong, F., and Huang, Q., 2012. Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 60: 7548-7555.

Moore-Neibel, K., Gerber, C., Patel, J., Friedman, M., and Ravishankar, S.. 2011. Antimicrobial activity of lemongrass oil against Salmonella *enterica* on organic leafy greens. Journal of Applied Microbiology. 112: 485 – 492

Parveen, S., Misra, R., and Sahoo, S. 2012. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics, and imaging. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 8: 147-166.

Reshes, G., Vanounou, S., Fishov, I., and Feingold, M., 2008. Cell Shape Dynamics in *Escherichia coli.* Biophysical Journal. 98: 251-264.

Shi, C., Song, K., Zhang, X., Sun, Y., Sui, Y., Chen, Y., Jia, Z., Sun, H., Sun, Z., and Xia, X., 2016. Mechanism of Action of Citral againt *Cronobacter sakazakii*. Plos One. 10: 1-12.

Shah, B., Davidson, P.M., and Zhong, Q., 2012. Nanocapsular dispersion of thymol for enhanced dispersibility and increased antimicrobial effectiveness against *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in model food systems. Applied and Environmental Microbiology. 78: 8448-8453.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Venugaranti, V.V., and Perumal, O. 2009. Chapter 9, Nanosystem for Dermal and Transdermal Drug Delivery. Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization. New York: Information Healthcare USA, Inc.: 126-155

Yossa, N., Patel, J., Millner, P., Ravishankar, S., and Lo, Y.M., 2013. Antimicrobial activity of plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* on lettuce. Foodborne Pathogens and Disease. 10: 87 - 96.

Zhang, G., Ma, L., Phelan, V.H., and Doyl, M.P., 2009. Efficacy of antimicrobial agents in lettuce leaf processing water for control of *Escherichia coli* O157: H7. Journal of food Protection. 72: 1392-1397.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

ก.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar (บริษัท Himedia ประเทศอินเดีย)

Pancreatic degest of casein	10.5	กรัม
Papaic digest of soybean meal	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	15	กรัม

ชั่ง TSA 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ละลายด้วยความร้อนเพื่อละลายวุ้นให้เข้ากัน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 7.3±0.2

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (บริษัท Himedia ประเทศอินเดีย)

Casein enzymic hydrolysate	1.7	กรัม
Papaic digest of soybean meal	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ชั่ง TSA 40 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ละลายด้วยความร้อนเพื่อละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 7.3±0.2

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton broth (บริษัท Himedia ประเทศอินเดีย)

Beef, infusion from	300	กรัม
Casein acid hydrolysate	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่ง Mueller Hinton broth 21 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ละลายด้วยความร้อนเพื่อละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 7.3 ±0.1

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ McConkey Agar (บริษัท Himedia ประเทศอินเดีย)

Peptones (meat and casein)	3.0	กรัม
Pancreatic digest of gelatin	17.0	กรัม
Lactose monohydrate	10.0	กรัม
Bile salt	1.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Crystal violet	0.001	กรัม
Neutral red	0.030	กรัม
Agar	13.5	กรัม

ชั่ง TSA 49.53 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ทำให้ละลายด้วยความร้อนเพื่อละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 7.1 ±0.2

ก.2 การเตรียมสารละลาย

1. Butterfield's Phosphate-Buffered

Potassium Dihydrogenphospphate (KH_2PO_4)	34	กรัม
น้ำกลั่น	500	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)		

นำ Potassium Dihydrogenphospphate ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.2 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และ ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

การเจือจาง Butterfield's Phosphate-Buffered

Butterfield's Phosphate-Buffered	1.25	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำกลั่น 1 ลิตร

นำ Butterfield's Phosphate-Buffered และน้ำกลั่นปรับให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ใส่ขวดดูแลน 225 มิลลิลิตร (สำหรับเจือจางตัวอย่างอาหาร 25 กรัม) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C (ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion และ lemongrass oil emulsion

Size Distribution Report by Intensity
v2.2

Malvern

Sample Details

Sample Name:	Lemongrass oil Emulsion
SOP Name:	mansettings.nano
General Notes:	

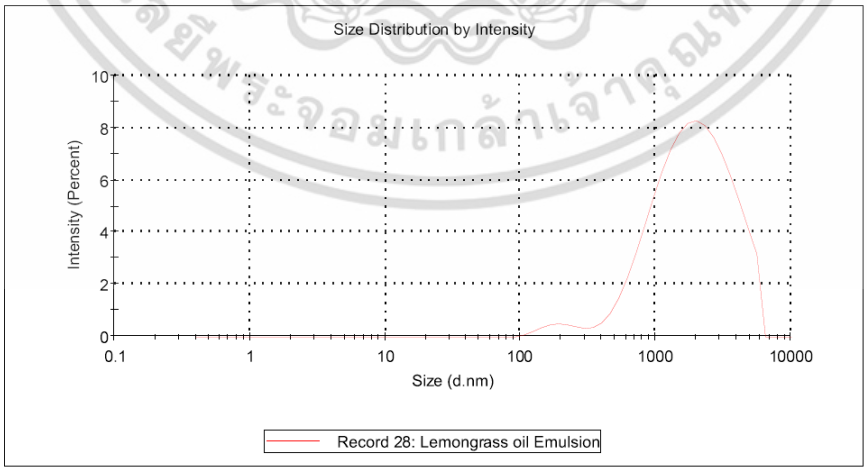
File Name:	S3-610036.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	28	**Dispersant RI:**	1.330
Material RI:	1.50	**Viscosity (cP):**	0.8872
Material Absorbtion:	0.100	**Measurement Date and Time:**	25 ธันวาคม 2560 16:22:07

System

Temperature (°C):	25.0	**Duration Used (s):**	60
Count Rate (kcps):	548.5	**Measurement Position (mm):**	0.85
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	3

Results

		Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	1442	**Peak 1:**	2187	97.2	1289
PdI:	0.386	**Peak 2:**	199.4	2.8	53.91
Intercept:	0.399	**Peak 3:**	0.000	0.0	0.000
Result quality	Good				



ภาพที่ 4.5 ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil emulsion ตัวอย่างที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Size Distribution Report by Intensity

v2.2

Malvern

Sample Details

Sample Name: Lemongrass oil Emulsion-R2

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name:	S3-610036.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	29	**Dispersant RI:**	1.330
Material RI:	1.50	**Viscosity (cP):**	0.8872
Material Absorbtion:	0.100	**Measurement Date and Time:**	25 ธันวาคม 2560 16:24:10

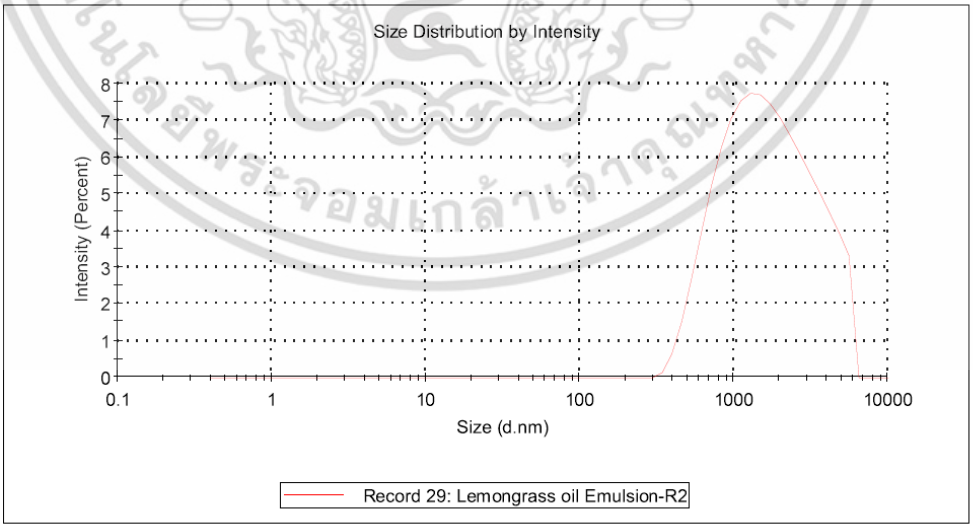
System

Temperature (°C):	25.0	**Duration Used (s):**	60
Count Rate (kcps):	732.6	**Measurement Position (mm):**	0.85
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	3

Results

			Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	1367	**Peak 1:**	1997	100.0	1315
PdI:	0.354	**Peak 2:**	0.000	0.0	0.000
Intercept:	0.345	**Peak 3:**	0.000	0.0	0.000

Result quality Good



ภาพที่ 4.6 ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil emulsion ตัวอย่างที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Size Distribution Report by Intensity

v2.2

Malvern

Sample Details

Sample Name: Lemongrass oil Emulsion-R3
SOP Name: mansettings.nano
General Notes:

File Name:	S3-610036.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	30	**Dispersant RI:**	1.330
Material RI:	1.50	**Viscosity (cP):**	0.8872
Material Absorbtion:	0.100	**Measurement Date and Time:**	25 ธันวาคม 2560 16:26:13

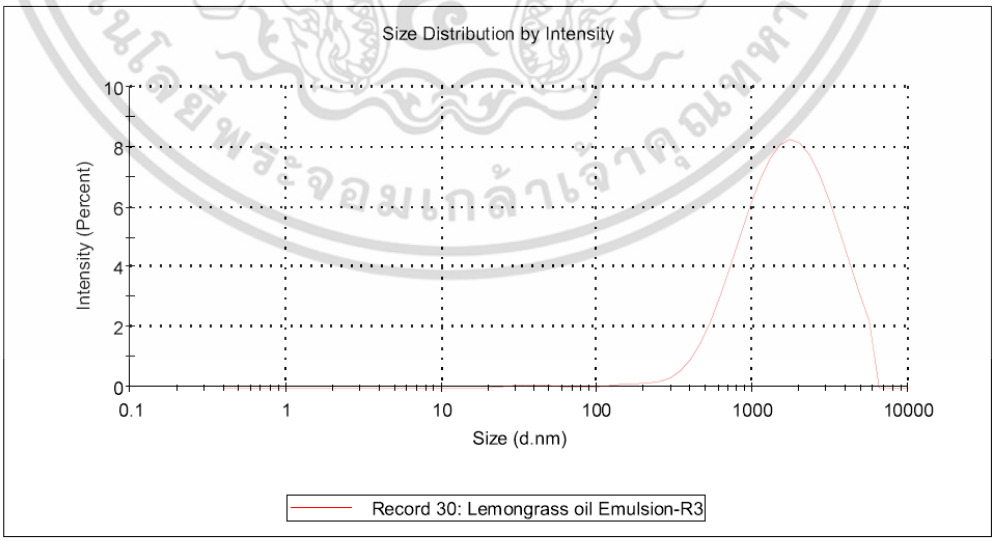
System

Temperature (°C):	25.0	**Duration Used (s):**	60
Count Rate (kcps):	675.3	**Measurement Position (mm):**	0.85
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	3

Results

		Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 1351	**Peak 1:**	1976	99.4	1233
PdI: 0.308	**Peak 2:**	40.02	0.6	11.53
Intercept: 0.361	**Peak 3:**	0.000	0.0	0.000

Result quality Good



ภาพที่ 4.7 ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil emulsion ตัวอย่างที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Size Distribution Report by Intensity

v2.2

Malvern

Sample Details

Sample Name:	Lemongrass oil Nanoemulsion 10-R
SOP Name:	mansettings.nano
General Notes:	

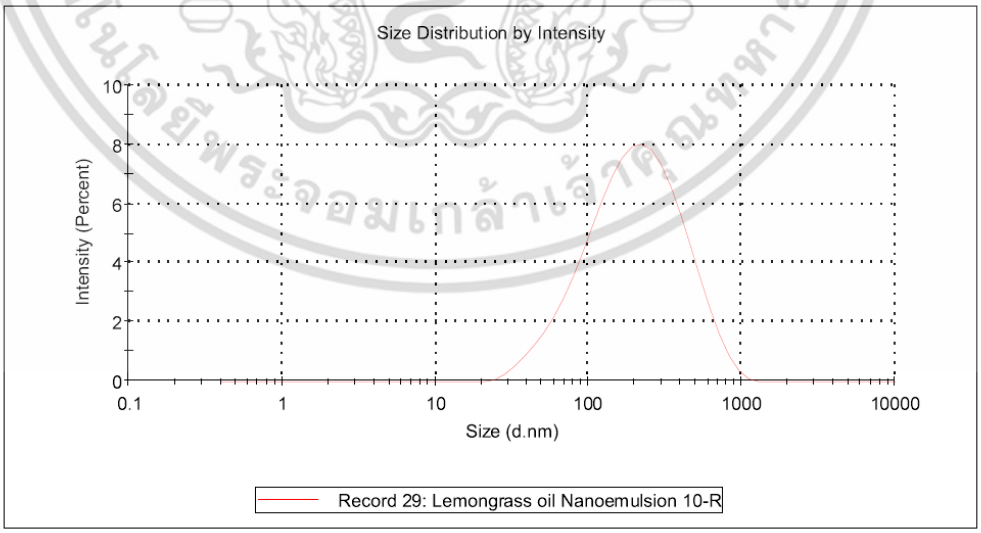
File Name:	S3-610037.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	29	**Dispersant RI:**	1.330
Material RI:	1.50	**Viscosity (cP):**	0.8872
Material Absorbtion:	0.100	**Measurement Date and Time:**	3 มกราคม 2561 16:56:58

System

Temperature (°C):	25.0	**Duration Used (s):**	50
Count Rate (kcps):	449.7	**Measurement Position (mm):**	0.85
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	3

Results

			Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	160.7	**Peak 1:**	244.3	100.0	168.2
PdI:	0.283	**Peak 2:**	0.000	0.0	0.000
Intercept:	0.708	**Peak 3:**	0.000	0.0	0.000
Result quality	Good				



ภาพที่ 4.8 ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 1 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Size Distribution Report by Intensity

v2.2

Malvern

Sample Details

Sample Name: Lemongrass oil Nanoemulsion 10-R2
SOP Name: mansettings.nano
General Notes:

File Name:	S3-610037.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	30	**Dispersant RI:**	1.330
Material RI:	1.50	**Viscosity (cP):**	0.8872
Material Absorbtion:	0.100	**Measurement Date and Time:**	3 มกราคม 2561 16:58:41

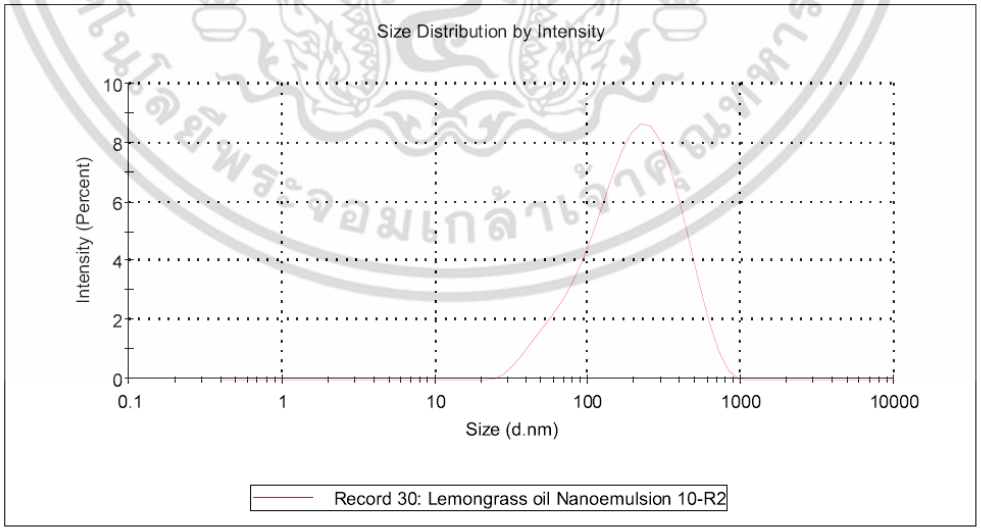
System

Temperature (°C):	25.0	**Duration Used (s):**	50
Count Rate (kcps):	405.4	**Measurement Position (mm):**	0.85
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	3

Results

		Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 159.2	**Peak 1:**	233.9	100.0	146.4
PdI: 0.277	**Peak 2:**	0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.721	**Peak 3:**	0.000	0.0	0.000

Result quality Good



ภาพที่ 4.9 ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 2 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Size Distribution Report by Intensity

v2.2

Malvern

Sample Details

Sample Name:	Lemongrass oil Nanoemulsion 10-R3
SOP Name:	mansettings.nano
General Notes:	

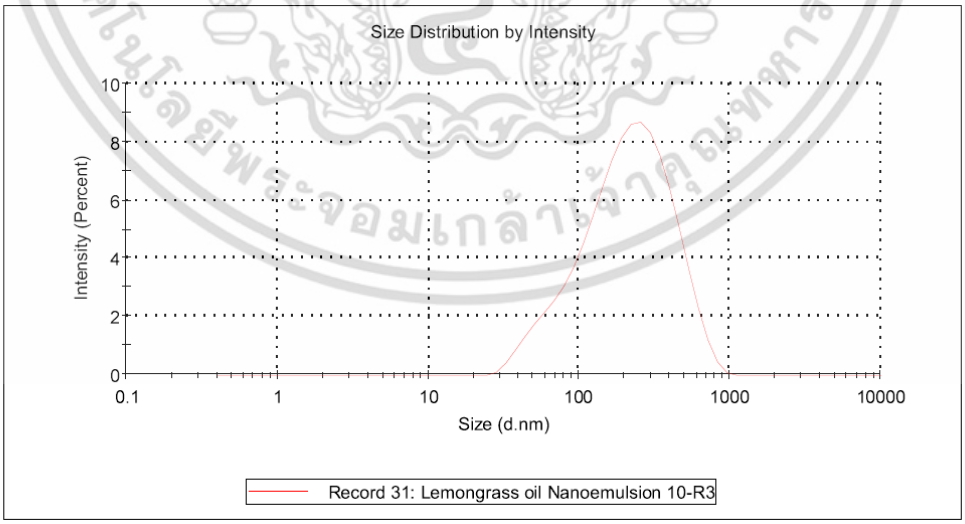
File Name:	S3-610037.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	31	**Dispersant RI:**	1.330
Material RI:	1.50	**Viscosity (cP):**	0.8872
Material Absorbtion:	0.100	**Measurement Date and Time:**	3 มกราคม 2561 17:00:24

System

Temperature (°C):	25.0	**Duration Used (s):**	50
Count Rate (kcps):	530.9	**Measurement Position (mm):**	0.85
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	3

Results

			Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	166.9	**Peak 1:**	245.2	100.0	153.6
PdI:	0.279	**Peak 2:**	0.000	0.0	0.000
Intercept:	0.628	**Peak 3:**	0.000	0.0	0.000
Result quality	Good				



ภาพที่ 4.10 ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 3 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Size Distribution Report by Intensity

v2.2

Malvern

Sample Details

Sample Name:	Lemongrass oil Nanoemulsion 20-R1
SOP Name:	mansettings.nano
General Notes:	

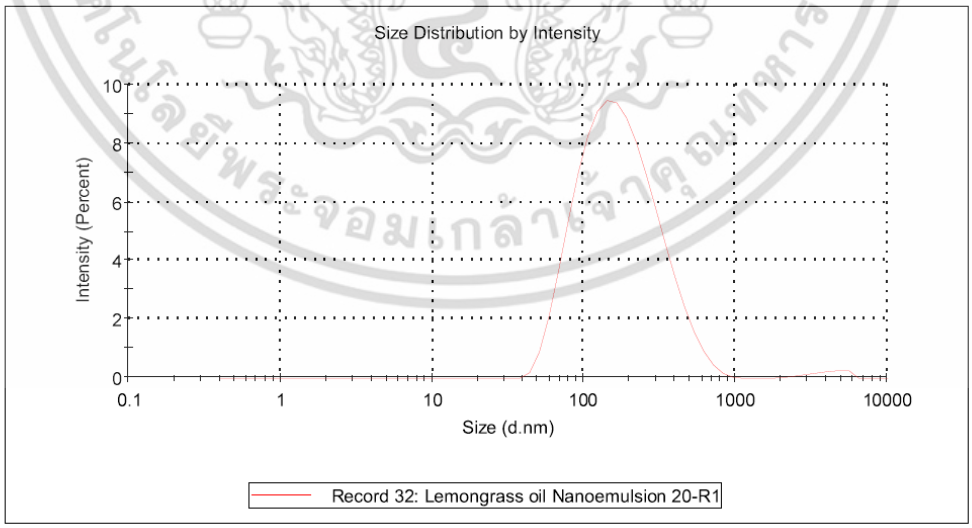
File Name:	S3-610037.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	32	**Dispersant RI:**	1.330
Material RI:	1.50	**Viscosity (cP):**	0.8872
Material Absorbtion:	0.100	**Measurement Date and Time:**	3 มกราคม 2561 17:24:48

System

Temperature (°C):	25.0	**Duration Used (s):**	20
Count Rate (kcps):	491.5	**Measurement Position (mm):**	0.65
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	2

Results

			Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	146.9	**Peak 1:**	195.1	98.7	121.7
PdI:	0.234	**Peak 2:**	4117	1.3	1040
Intercept:	0.922	**Peak 3:**	0.000	0.0	0.000
Result quality	Good				



ภาพที่ 4.11 ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 1 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 20 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Size Distribution Report by Intensity

v2.2

Malvern

Sample Details

Sample Name:	Lemongrass oil Nanoemulsion 20-R2
SOP Name:	mansettings.nano
General Notes:	

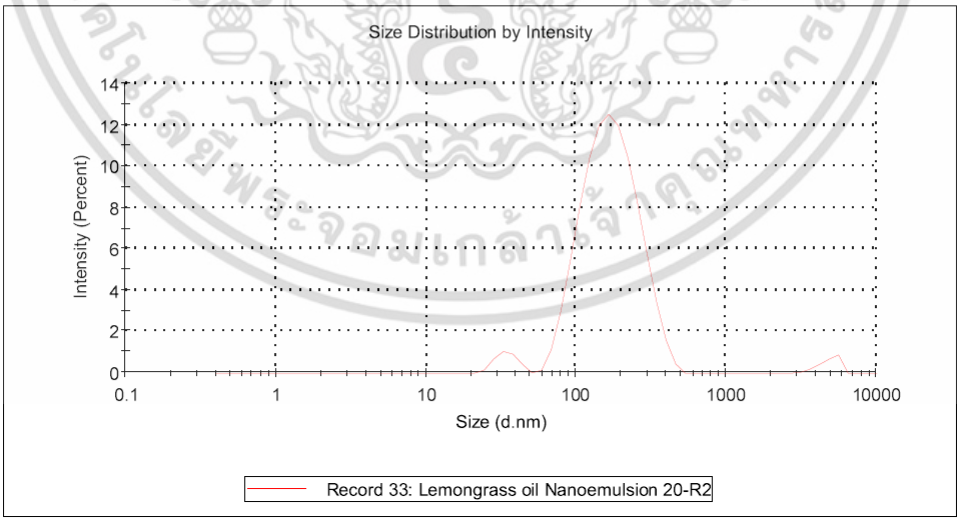
File Name:	S3-610037.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	33	**Dispersant RI:**	1.330
Material RI:	1.50	**Viscosity (cP):**	0.8872
Material Absorbtion:	0.100	**Measurement Date and Time:**	3 มกราคม 2561 17:25:40

System

Temperature (°C):	25.0	**Duration Used (s):**	20
Count Rate (kcps):	461.1	**Measurement Position (mm):**	0.65
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	2

Results

			Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	149.9	**Peak 1:**	180.6	94.5	74.87
PdI:	0.243	**Peak 2:**	34.37	3.3	5.497
Intercept:	0.924	**Peak 3:**	4843	2.2	703.3
Result quality	Good				



ภาพที่ 4.12 ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 2 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 20 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Size Distribution Report by Intensity

v2.2

Malvern

Sample Details

Sample Name: Lemongrass oil Nanoemulsion 20-R3
SOP Name: mansettings.nano
General Notes:

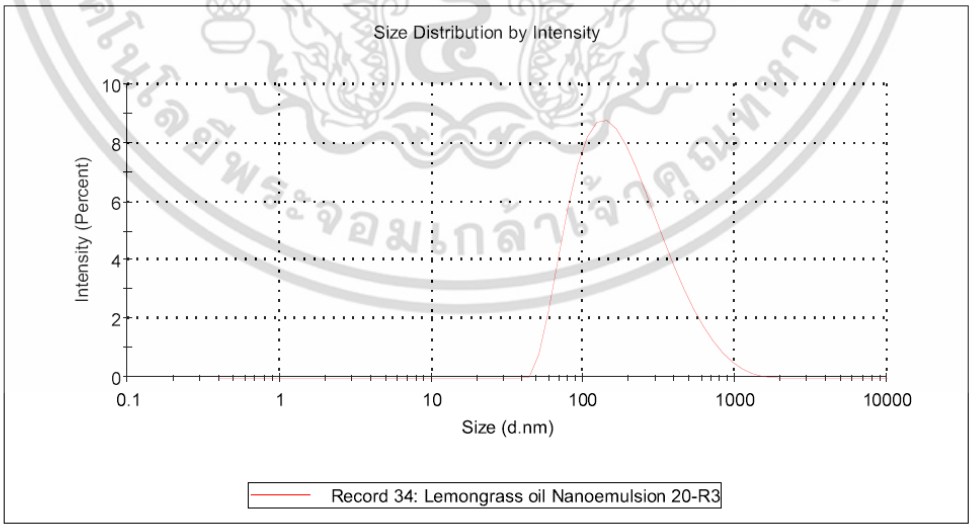
File Name:	S3-610037.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	34	**Dispersant RI:**	1.330
Material RI:	1.50	**Viscosity (cP):**	0.8872
Material Absorbtion:	0.100	**Measurement Date and Time:**	3 มกราคม 2561 17:26:32

System

Temperature (°C):	25.0	**Duration Used (s):**	20
Count Rate (kcps):	472.8	**Measurement Position (mm):**	0.65
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	2

Results

			Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	148.8	**Peak 1:**	220.1	100.0	174.7
PdI:	0.246	**Peak 2:**	0.000	0.0	0.000
Intercept:	0.926	**Peak 3:**	0.000	0.0	0.000
Result quality	Good				



ภาพที่ 4.13 ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 3 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 20 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Size Distribution Report by Intensity

v2.2

Malvern

Sample Details

Sample Name:	Lemongrass oil Nanoemulsion 30 1
SOP Name:	mansettings.nano
General Notes:	

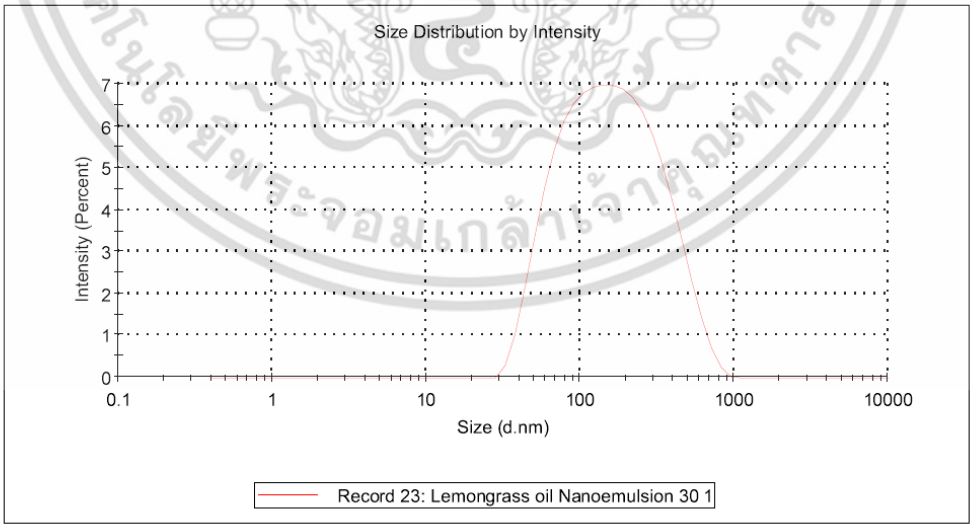
File Name:	S3-610037.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	23	**Dispersant RI:**	1.330
Material RI:	1.50	**Viscosity (cP):**	0.8872
Material Absorbtion:	0.100	**Measurement Date and Time:**	3 มกราคม 2561 17:33:45

System

Temperature (°C):	25.0	**Duration Used (s):**	20
Count Rate (kcps):	512.5	**Measurement Position (mm):**	0.85
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	2

Results

			Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	127.0	**Peak 1:**	195.4	100.0	141.3
PdI:	0.275	**Peak 2:**	0.000	0.0	0.000
Intercept:	0.907	**Peak 3:**	0.000	0.0	0.000
Result quality	Good				



ภาพที่ 4.14 ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 1 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Size Distribution Report by Intensity

v2.2

Malvern

Sample Details

Sample Name: Lemongrass oil Nanoemulsion 30 2
SOP Name: mansettings.nano
General Notes:

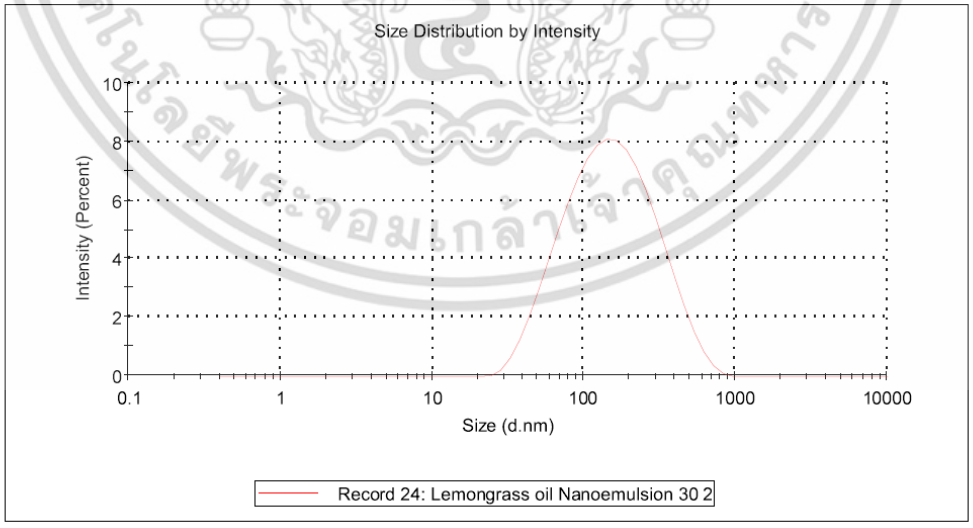
File Name:	S3-610037.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	24	**Dispersant RI:**	1.330
Material RI:	1.50	**Viscosity (cP):**	0.8872
Material Absorbtion:	0.100	**Measurement Date and Time:**	3 มกราคม 2561 17:34:37

System

Temperature (°C):	25.0	**Duration Used (s):**	20
Count Rate (kcps):	455.8	**Measurement Position (mm):**	0.85
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	2

Results

			Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	122.5	**Peak 1:**	180.8	100.0	123.4
PdI:	0.268	**Peak 2:**	0.000	0.0	0.000
Intercept:	0.920	**Peak 3:**	0.000	0.0	0.000
Result quality	Good				



ภาพที่ 4.15 ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 2 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Size Distribution Report by Intensity

v2.2

Malvern

Sample Details

Sample Name:	Lemongrass oil Nanoemulsion 30 3
SOP Name:	mansettings.nano
General Notes:	

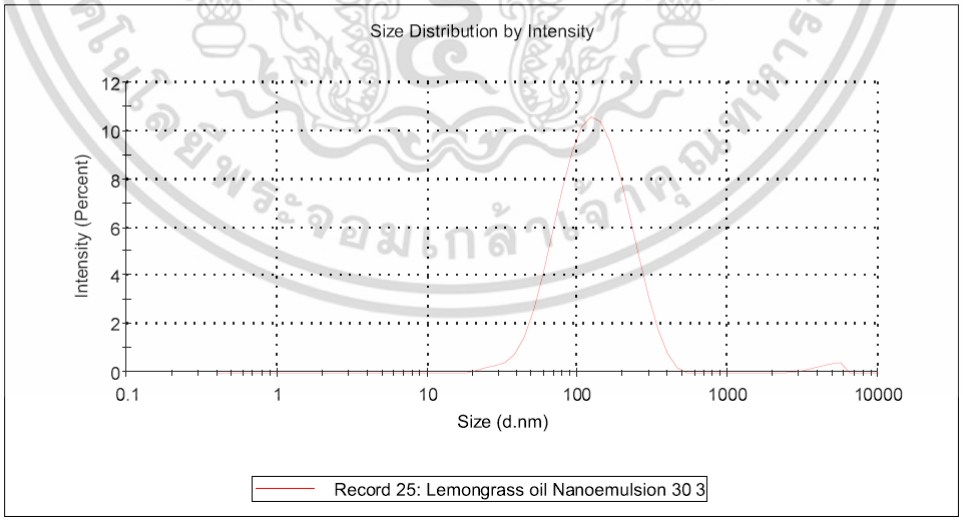
File Name:	S3-610037.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	25	**Dispersant RI:**	1.330
Material RI:	1.50	**Viscosity (cP):**	0.8872
Material Absorbtion:	0.100	**Measurement Date and Time:**	3 มกราคม 2561 17:35:29

System

Temperature (°C):	25.0	**Duration Used (s):**	20
Count Rate (kcps):	448.5	**Measurement Position (mm):**	0.85
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	2

Results

			Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	112.6	**Peak 1:**	140.8	98.6	73.33
PdI:	0.228	**Peak 2:**	4591	1.4	831.4
Intercept:	0.927	**Peak 3:**	0.000	0.0	0.000
Result quality	Good				



ภาพที่ 4.16 ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 3 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Size Distribution Report by Intensity

v2.2

Malvern

Sample Details

Sample Name: Lemongrass oil Nanoemulsion 40-R1
SOP Name: mansettings.nano
General Notes:

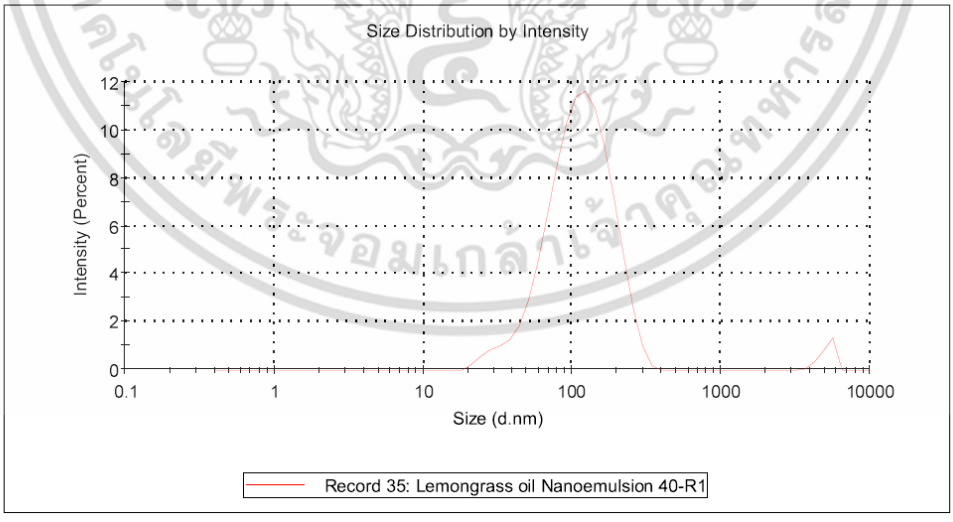
File Name:	S3-610037.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	35	**Dispersant RI:**	1.330
Material RI:	1.50	**Viscosity (cP):**	0.8872
Material Absorbtion:	0.100	**Measurement Date and Time:**	3 มกราคม 2561 17:15:55

System

Temperature (°C):	25.0	**Duration Used (s):**	20
Count Rate (kcps):	467.8	**Measurement Position (mm):**	0.85
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	3

Results

			Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	104.7	**Peak 1:**	121.1	97.5	56.33
PdI:	0.292	**Peak 2:**	5116	2.5	534.7
Intercept:	0.926	**Peak 3:**	0.000	0.0	0.000
Result quality	Good				



ภาพที่ 4.17 ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 1 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 40 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Size Distribution Report by Intensity

v2.2

Malvern

Sample Details

Sample Name:	Lemongrass oil Nanoemulsion 40-R2
SOP Name:	mansettings.nano
General Notes:	

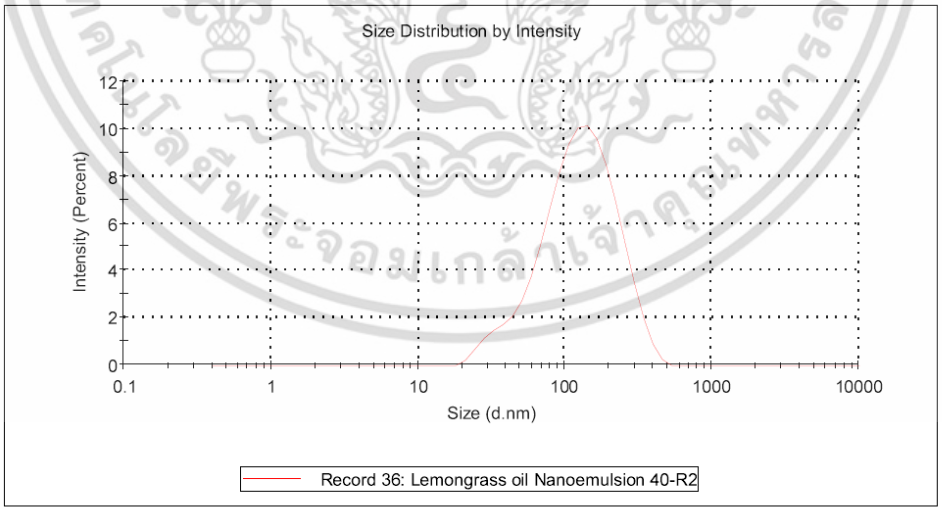
File Name:	S3-610037.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	36	**Dispersant RI:**	1.330
Material RI:	1.50	**Viscosity (cP):**	0.8872
Material Absorbtion:	0.100	**Measurement Date and Time:**	3 มกราคม 2561 17:16:47

System

Temperature (°C):	25.0	**Duration Used (s):**	20
Count Rate (kcps):	461.6	**Measurement Position (mm):**	0.85
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	3

Results

		Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	105.3	**Peak 1:**	141.0	100.0	77.67
PdI:	0.245	**Peak 2:**	0.000	0.0	0.000
Intercept:	0.922	**Peak 3:**	0.000	0.0	0.000
Result quality	Good				



ภาพที่ 4.18 ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 2 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 40 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Size Distribution Report by Intensity

v2.2

Malvern

Sample Details

Sample Name: Lemongrass oil Nanoemulsion 40-R3
SOP Name: mansettings.nano
General Notes:

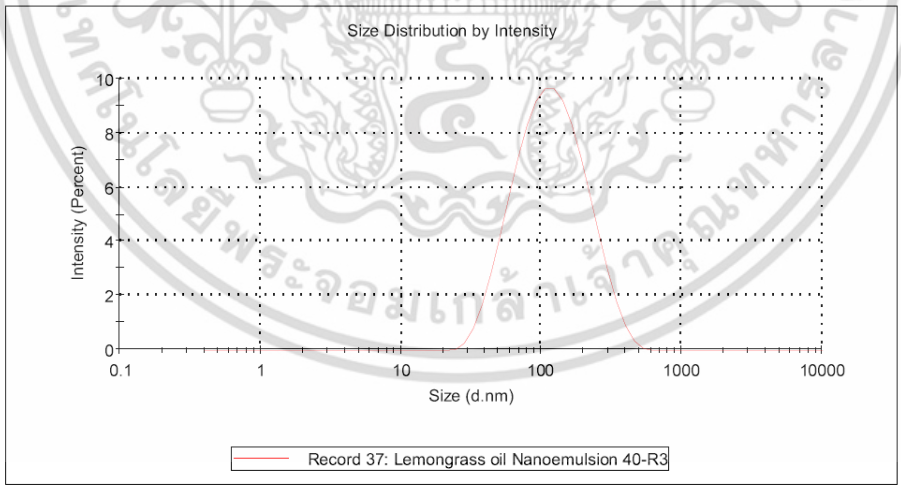
File Name:	S3-610037.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	37	**Dispersant RI:**	1.330
Material RI:	1.50	**Viscosity (cP):**	0.8872
Material Absorbtion:	0.100	**Measurement Date and Time:**	3 มกราคม 2561 17:17:39

System

Temperature (°C):	25.0	**Duration Used (s):**	20
Count Rate (kcps):	426.5	**Measurement Position (mm):**	0.85
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	3

Results

		Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	100.5	**Peak 1:**	133.6	100.0	76.88
PdI:	0.219	**Peak 2:**	0.000	0.0	0.000
Intercept:	0.916	**Peak 3:**	0.000	0.0	0.000
Result quality	Good				



ภาพที่ 4.19 ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 3 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 40 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Size Distribution Report by Intensity

v2.2

Malvern

Sample Details

Sample Name:	Lemongrass oil Nanoemulsion 50-R1
SOP Name:	mansettings.nano
General Notes:	

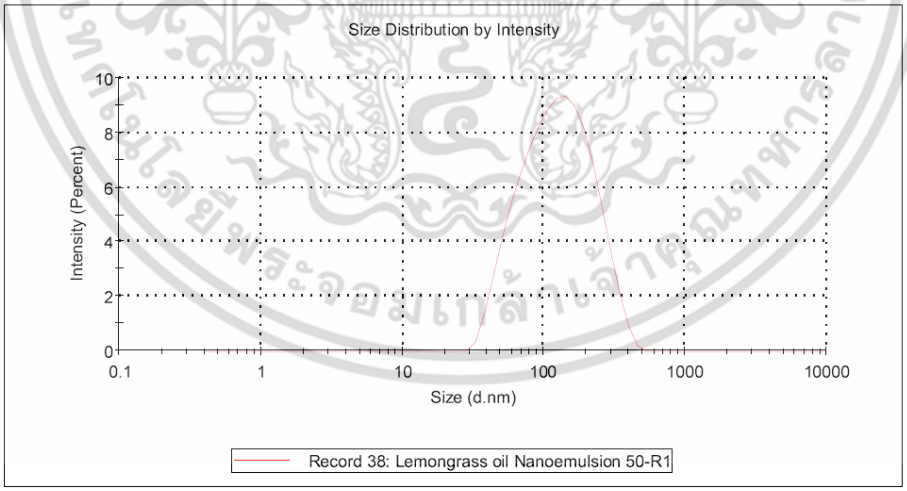
File Name:	S3-610037.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	38	**Dispersant RI:**	1.330
Material RI:	1.50	**Viscosity (cP):**	0.8872
Material Absorbtion:	0.100	**Measurement Date and Time:**	3 มกราคม 2561 17:07:14

System

Temperature (°C):	25.0	**Duration Used (s):**	20
Count Rate (kcps):	404.6	**Measurement Position (mm):**	0.85
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	2

Results

			Size (d.nm...	**% Intensity:**	**St Dev (d.n...**
Z-Average (d.nm):	106.1	**Peak 1:**	141.0	100.0	77.93
PdI:	0.223	**Peak 2:**	0.000	0.0	0.000
Intercept:	0.942	**Peak 3:**	0.000	0.0	0.000
Result quality	Good				



ภาพที่ 4.20 ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 1 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 50 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Size Distribution Report by Intensity

v2.2

Malvern

Sample Details

Sample Name: Lemongrass oil Nanoemulsion 50-R2
SOP Name: mansettings.nano
General Notes:

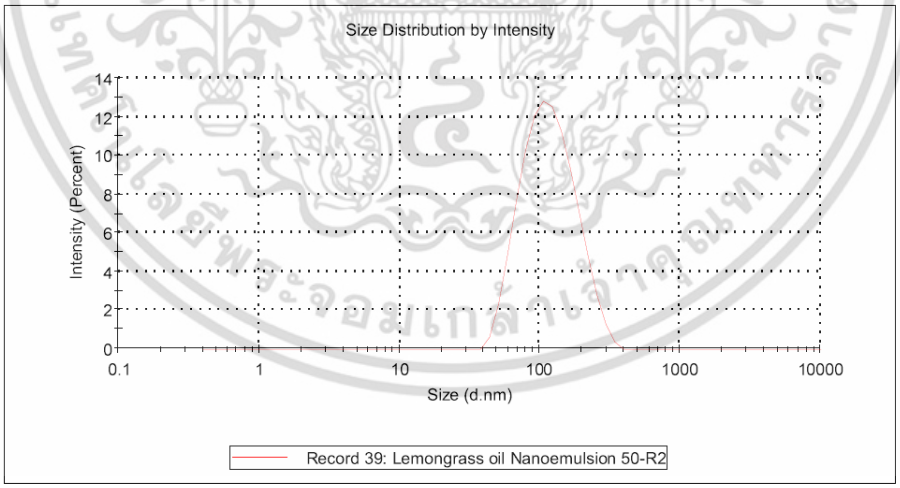
File Name:	S3-610037.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	39	**Dispersant RI:**	1.330
Material RI:	1.50	**Viscosity (cP):**	0.8872
Material Absorbtion:	0.100	**Measurement Date and Time:**	3 มกราคม 2561 17:08:06

System

Temperature (°C):	25.0	**Duration Used (s):**	20
Count Rate (kcps):	392.1	**Measurement Position (mm):**	0.85
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	2

Results

		Size (d.nm...	**% Intensity:**	**St Dev (d.n...**
Z-Average (d.nm):	106.3	**Peak 1:** 124.9	100.0	54.45
PdI:	0.176	**Peak 2:** 0.000	0.0	0.000
Intercept:	0.945	**Peak 3:** 0.000	0.0	0.000
Result quality	Good			



ภาพที่ 4.21 ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 2 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 50 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Size Distribution Report by Intensity

v2.2

Malvern

Sample Details

Sample Name:	Lemongrass oil Nanoemulsion 50-R3
SOP Name:	mansettings.nano
General Notes:	

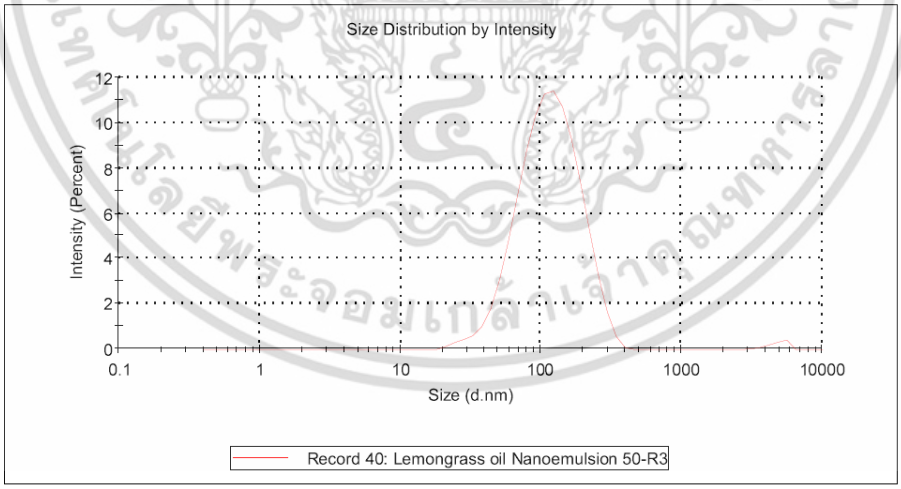
File Name:	S3-610037.dts	**Dispersant Name:**	Water
Record Number:	40	**Dispersant RI:**	1.330
Material RI:	1.50	**Viscosity (cP):**	0.8872
Material Absorbtion:	0.100	**Measurement Date and Time:**	3 มกราคม 2561 17:08:58

System

Temperature (°C):	25.0	**Duration Used (s):**	20
Count Rate (kcps):	379.2	**Measurement Position (mm):**	0.85
Cell Description:	Disposable sizing cuvette	**Attenuator:**	2

Results

		Size (d.nm...	**% Intensity:**	**St Dev (d.n...**
Z-Average (d.nm):	103.1	**Peak 1:** 125.7	99.0	60.34
PdI:	0.213	**Peak 2:** 4843	1.0	702.6
Intercept:	0.944	**Peak 3:** 0.000	0.0	0.000
Result quality	Good			



ภาพที่ 4.22 ขนาดอนุภาคของสาร lemongrass oil nano-emulsion ตัวอย่างที่ 3 ที่ผ่านเครื่อง Ultrasonicator (Brand: Qsonica, model: Q55) ที่ 55 วัตต์ และ 80 แอมปลิจูด เป็นเวลา 50 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

1. ข้อกำหนดคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*)

บริษัท อุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย - จีน จำกัด
THAI - CHINA FLAVOURS AND FRAGRANCES INDUSTRY CO., LTD.

SPECIFICATION

Product name	: Lemongrass Oil
Product code	: 40003 (น้ำมันตะไคร้บ้าน)
Country of Origin	: Thailand
Product type	: Essential Oil 100%
INCI Name	: Cymbopogon Citratus Leaf Oil
CAS No.	: 89998-14-1
Production	: The natural essential oil is obtained by steam distillation the grass of *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steudel) W.Watson or *Cymbopogon citratus* Stapf. (Family of Gramineae)
Application	: Raw material for the production of foods, beverages, cosmetics and household products.
Colour and appearance	: Yellow, yellow-brown or reddish-brown and clear liquid
Odour	: Fresh green - sweet lemon fruit odour
Specific gravity (20/20°C)	: 0.8750-0.8850
Refractive index (20°C)	: 1.4800-1.4900
Principal Constituents	: Citral 60-80%
Solubility Test	: Clear liquid.(in 0.5 part of 90% ethyl alcohol)
Storage	: Keep in cool, preferably at about 20- 25°C dry place and protect from light. Keep containers tightly sealed
Shelf life	: 24 Months quality should be checked visually & olfactory before each use and fully checked after the shelf life period

The document is computer generated and no signature is required.
In case of enquiry, please contact
Nutchanath Koomklang
Quality Control Supervisor

40003/EFF210111

สำนักงาน
Office :
510/3-4 ซอยงามวงศ์วาน 25 ถนนงามวงศ์วาน อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
510/3-4 Ngamwongwan 25, Ngamwongwan Rd. Muang, Nonthaburi 11000 Thailand.
Tel: + 66 2952-5380-4, +66 2591-6050 (Auto 3 line)
Fax:+66 2952 - 5385

โรงงาน
Factory:
99 หมู่ 2 ต.ลาดบัวหลวง อ.ลาดบัวหลวง พระนครศรีอยุธยา 13230
99 Moo 2 , Lat Bua Luang , Phra Nakhon Si Ayutthaya 13230 Thailand.
Tel:+66 3537 - 9501 - 3, +66 3537 - 9211 - 3
Fax:+66 3537 - 9504 - 5

ภาพที่ 4.23 ข้อกำหนดคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	**นางสาวกัลยา ยิ่งยง**
วัน เดือน ปีเกิด	7 ตุลาคม 2525
ที่อยู่	72 ม.1 ต.บ่อทอง อ.บ่อทอง จ.ชลบุรี 20270
E-mail	kallaya.yingyong@gmail.com

ประวัติการศึกษา

2547 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล

2560 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการจัดการความปลอดภัยอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประสบการณ์การทำงาน

พ.ศ.2547-2548	ตำแหน่ง ผู้ช่วยนักวิจัย สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา
พ.ศ.2548-2552	ตำแหน่ง Regulatory Affairs Officer บริษัท Kim Chua Trading จำกัด
พ.ศ.2552-2553	ตำแหน่ง Consumer Information Center Supervisor บริษัท T.C. Pharmaceutical Industries จำกัด
พ.ศ.2554-2557	ตำแหน่ง Food Safety Supervisor บริษัท Kerry Ingredients (Thailand) จำกัด
ปัจจุบัน	ตำแหน่ง ผู้จัดการฝ่ายประกันคุณภาพ บริษัท เนชั่นแนล สตาร์ช แอนด์ เคมิเคิล (ไทยแลนด์) จำกัด

การนำเสนอผลงาน **เรื่อง** "Effect of lemongrass oil nano-emulsion on inhibition of *Escherichia coli*: An *in vitro* study" FOOD INNOVATION ASIA CONFERENCE 2018, 14-16th June 2018, BITEC, Bangkok, Thailand

รางวัล: Second Runner-up The Poster Presentation Award in FOOD INNOVATION ASIA CONFERENCE 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้