

กิจกรรมการต้านแบคทีเรียของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ กรดลอริก และโมโนลอรีนร่วมกับกรดแลคติกสำหรับทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *Listeria monocytogenes*

Antibacterial Activity of Virgin Coconut Oil, Lauric Acid and Monolaurin in Combination with Lactic Acid Against *Listeria monocytogenes*

ผู้สื ดั้งวัชรินทร์¹ พัทณี ขอบธรรม¹ และมัทธิดา ช่างสนัน¹

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ กรดลอริก โมโนลอรีน กรดแลคติก และน้ำมันร่วมกับกรดแลคติกในการต้านเชื้อ *Listeria monocytogenes* ที่แยกได้จากเนื้อสุกร โดยทำการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งและทำลายแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration, MIC และ minimum bactericidal concentration, MBC ตามลำดับ) ค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมกันเพื่อยับยั้งและทำลายแบคทีเรีย (fractional inhibitory concentration index, FICI และ fractional bactericidal concentration index, FBICI) และระยะเวลาในการทำลายแบคทีเรีย พบว่ากรดลอริก โมโนลอรีน และกรดแลคติกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ได้ที่ความเข้มข้น $\geq 250.00 \geq 0.04$ mg/disc และ $\geq 1\%$ (v/disc) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับค่า MIC ของสารทั้ง 3 ชนิด ที่มีค่าเท่ากับ 500.00 และ 0.16 mg/ml และ 1%(v/v) ตามลำดับ และค่า MBC เท่ากับ 1,000 และ 0.31 mg/ml และ 4%(v/v) ตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* ได้ นอกจากนี้ทำการศึกษากิจกรรมเสริมระหว่างน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ร่วมกับกรดแลคติก พบว่าออกฤทธิ์เสริมกันโดยที่ความเข้มข้น (6.25 + 0.5%(v/v)) มีค่า FBICI เท่ากับ 0.1875 ในขณะที่การใช้กรดลอริกร่วมกับกรดแลคติก (500 mg/ml + 1%(v/v)) และโมโนลอรีน (0.16 mg/ml + 0.5%(v/v)) มีส่วนออกฤทธิ์เสริมกัน โดยมีค่า FBICI เท่ากับ 0.7500 และ 0.6250 ตามลำดับ นอกจากนี้การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายแบคทีเรียของสารละลายน้ำมันทั้ง 3 ชนิด ร่วมกับกรดแลคติกที่ความเข้มข้น FBICI แสดงให้เห็นว่าการใช้สารละลายน้ำมันร่วมกับกรดแลคติกออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรีย (bactericidal effect) โดยอัตราการทำลายแบคทีเรียขึ้นอยู่กับชนิดของสาร และระยะเวลาสัมผัสสาร

คำสำคัญ: กรดไขมัน สารต้านจุลชีพ *Listeria monocytogenes*

Abstract

The objective of this study was to investigate the combined actions of virgin coconut oil, lauric acid, monolaurin, lactic acid and oil with lactic acid on *Listeria monocytogenes* which were isolated from pork by determination of minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), fractional inhibitory concentration index (FICI), fractional bactericidal concentration index (FBICI) and kill-time. The results were shown that lauric acid, monolaurin and lactic acid at ≥ 250.00 , ≥ 0.04 mg/disc and $\geq 1\%$ (v/disc), respectively, exhibited ability of inhibition of *L. monocytogenes*. Similarly, MIC of lauric acid, monolaurin and lactic acid were 500 and 0.16 mg/ml and 1% (v/v), respectively, while their MBC were 1,000.00 and 0.31 mg/ml and

¹คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง อ.ป่าพะยอม จ.พัทลุง 93110

4% (v/v), respectively. The effect of virgin coconut oil + lactic acid (6.25 + 0.5%(v/v)) combination was synergistic against this isolate which FBCI was 0.1875. Meanwhile, lauric acid + lactic acid (500 mg/ml + 1%(v/v)) and monolaurin + lactic acid (0.16 mg/ml + 0.5%(v/v)) combinations were partial synergistic against this isolate which FBCI were 0.7500 and 0.6250, respectively. In kill-time studies, FBCIs of combinations of three lipid solutions with lactic acid produced a bactericidal effect, depending on type of antibacterial and contact time.

Keywords: fatty acid, antimicrobial agent, *Listeria monocytogenes*

บทนำ

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ประสบปัญหาเกี่ยวกับการใช้วัตถุดิบเสียเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและเพื่อการบริโภคเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ได้อย่างปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ดังนั้นจึงได้มีการนำกรดอินทรีย์มาใช้ในการผลิตเนื้อสัตว์เพื่อลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดแลคติก ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่นิยมใช้มากที่สุด (Huffman, 2002) เช่นเดียวกับกับน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ผลิตด้วยวิธีสกัดเย็นจะมีกรดลอริก (C_{12} , 51.05%) เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัวที่ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Kabara, 1978; ศิริพร เต็มสุวรรณ, 2551) และมีสารโมโนลอรินเป็นอนุพันธ์ไอโซเทอร์ของกรดลอริกมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในวงกว้าง โดยจะขัดขวางการทำงานของเอนไซม์และปัจจัยในการก่อโรคของแบคทีเรีย (Ruzin and Novick, 2000) นอกจากนี้สารโมโนลอรินเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ในอาหารที่มีความปลอดภัย (generally recognized as safe, GRAS) โดยได้รับการรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา (Kabara and Marshall, 2005)

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านและทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* ของน้ำมันมะพร้าว กรดลอริก โมโนลอริน และกรดแลคติกทั้งในรูปแบบการใช้สารชนิดเดียวและร่วมกัน

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ คือ เชื้อ *L. monocytogenes* ที่แยกได้จากเนื้อสุกรในโรงฆ่าสุกรแห่งหนึ่งในภาคใต้ของประเทศไทย ตามวิธีของ BAM online (2003) และทำการจัดเก็บ stock culture ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เมื่อต้องการทำการทดลอง นำ stock culture มาละลายน้ำแข็ง และทำการเจริญเติบโตบน Mueller Hinton agar (MHA) (Merck, Germany) บ่มที่อุณหภูมิ $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 22-24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาวะ late log phase (non-stressed cells) ตามวิธีของ Tangwacharin *et al.* (2006) เชื้อแบคทีเรีย 2-3 โคโลนี มาใส่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland (ประมาณ 10^8 cfu/ml) จากนั้นทำการเจือจางเพื่อใช้ในการศึกษาต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง $4 - 6 \times 10^5$ cfu/ml

2. ชนิดของสารต้านแบคทีเรีย

ทำการจัดซื้อน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ความเข้มข้น 98%(v/v) ที่ได้จากการสกัดเย็นจากบริษัทแกรนด์ สี่ชี จำกัด (กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย) กรดลอริกและสารโมโนลอรินความเข้มข้น 98 และ 99%(w/w)ตามลำดับ ทำการจัดซื้อจากบริษัท Sigma Adrich (Sigma, France) และกรดแลคติกความเข้มข้น 80%(v/v) จัดซื้อจากบริษัทกิ๊ กิ๊ เอ็นเตอร์ไพร์ส จำกัด (กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย) จากนั้นนำน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ กรดลอริก และโมโนลอรินมาทำการเจือจางด้วยสารละลายไดเมทิลซัลไฟไซด์ (DMSO, Sigma, France) ความเข้มข้น 20% และกรดแลคติกทำการเจือจางด้วยน้ำปลอดเชื้อเพื่อใช้ในการศึกษาต่าง ๆ

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ กรดลอริก โมโนลอรีน และกรดแลกติกที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี diffusion agar ตามวิธีของ Bauer *et al.* (1966) ทั้งนี้ทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) โดยสารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสารละ 5 ระดับทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ รวมทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง ทั้งนี้ทำการเตรียมสารต้านแบคทีเรียด้วยการนำน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ กรดลอริก และ โมโนลอรีนมาทำการเจือจางด้วยสารละลายไดเมทิลซัลโฟไซด์ (DMSO) ความเข้มข้น 20% และกรดแลกติกทำการเจือจางด้วยน้ำปลอดเชื้อ และทำการเจือจางแบบลำดับสอง (two fold serial dilution) จำนวน 5 ระดับ แล้วหยดสารแต่ละชนิดลงบนแผ่น disc (กระดาษกรองเบอร์ 1, Whatman, Maidstone, UK) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 6.25-100%(v/disc) 62.5-1,000 และ 0.04-0.63 mg/disc และ 0.5-8%(v/disc) ตามลำดับ โดยความเข้มข้น 0 $\mu\text{g/ml}$ ของสารแต่ละชนิดเป็นชุดควบคุม (negative control) คือ 20%(v/v) DMSO หรือน้ำปลอดเชื้อ จากนั้นใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อจุ่มสารละลายแบคทีเรียที่เตรียมไว้มาป้ายให้ทั่วผิวหน้าวุ้นอาหาร (MHA) วาง disc ที่หยดสารสกัดและชุดควบคุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และทำการวัดขนาดวงใส (inhibition zone) ด้วย vernier caliper ทำการบันทึกค่า inhibition zone เป็นมิลลิเมตร

ทำการศึกษาวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งและทำลายแบคทีเรีย (minimal inhibition concentration, MIC และ minimal bactericidal concentration, MBC ตามลำดับ) ของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ กรดลอริก โมโนลอรีน และกรดแลกติกด้วยวิธี broth microdilution method ตามวิธีของ CLSI M7-A4 (2002) ทั้งนี้ทำการวางแผนการทดลองแบบ CRD โดยสารแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสารละ 10 ระดับ มีชนิดสารและความเข้มข้นสุดท้ายใน microplate อยู่ในช่วง 0-100%(v/v) 0-1,000 และ 0-40 mg/ml และ 0-8%(v/v) ตามลำดับ โดยทำการเจือจางแบบลำดับสอง (two fold serial dilution) ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ รวม 30 ตัวอย่าง/ชนิดของสาร รวมทั้งสิ้น 120 ตัวอย่าง และใส่เชื้อ *L. monocytogenes* เตรียมไว้ นอกจากนี้ทำการเตรียมกลุ่มควบคุมตัวอย่างละ 4 แบบ ดังนี้ 1) growth control คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB + แบคทีเรีย 2) negative control คือ ตัวทำลาย + อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB + แบคทีเรีย 3) sterile control คือ ใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ และ 4) positive control คือ ยาปฏิชีวนะ Ciprofloxacin (Sigma, France) เช่นเดียวกับสารน้ำมัน ให้มีความเข้มข้น 0.5 - 250 $\mu\text{g/ml}$ + อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB + แบคทีเรีย นำ microplate ไปบ่มที่อุณหภูมิ $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วทำการวัดความขุ่นด้วยเครื่อง UVM 340 microplate reader ที่ความยาวคลื่น 600 nm โดยความสามารถในการวัดความขุ่นต่ำสุดคือ < 0.05 และค่า MIC เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่เครื่องสามารถวัดค่าความขุ่นได้ จากนั้นทำการหาค่า MBC โดยนำสารละลายในหลุมของ microplate ที่ใสมาปริมาตร 10 μl เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วทำการบันทึกค่า MBC ที่ระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำลายแบคทีเรียได้ไม่น้อยกว่า 99.99% ของจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น

4. การทดสอบฤทธิ์เสริมกัน

ทำการศึกษาการต้านแบคทีเรียร่วมกันระหว่างน้ำมันและกรดแลกติก ด้วยวิธี antibacterial combination โดยวิเคราะห์แบบ checker board broth dilution ตามวิธีของ Bharadwaj *et al.* (2003) Doores (2005) Gutierrez *et al.* (2008) และ Vasconcelos de Oliveira *et al.* (2010) ทั้งนี้ทำการวางแผนการทดลองแบบ CRD โดยทำการเตรียมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ กรดลอริก โมโนลอรีน และกรดแลกติกเช่นเดียวกันการวิเคราะห์ค่า MIC โดยสารแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นสุดท้ายจำนวน 6 ระดับ อยู่ในช่วง $1/16\text{MIC}-2\text{MIC}$ คือ 3.13-100%(v/v) 31.25-1,000.00 0.01-0.31 mg/ml และ 0.06-2%(v/v) ตามลำดับ จากนั้นทำการเตรียมสารร่วม 3 ชนิด คือ 1) น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ร่วมกับกรดแลกติก 2) กรดลอริกร่วมกับกรดแลกติก และ 3) โมโนลอรีนร่วมกับกรดแลกติกลงใน microplate จะต้องมีตัวอย่าง 36 ตัวอย่าง/ชนิดของสารร่วมกัน/ซ้ำ ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ดังนั้นมีตัวอย่าง 108 ตัวอย่าง/ชนิดของสารร่วมกัน

รวมทั้งสิ้น 324 ตัวอย่าง จากนั้นทำการใส่เชื้อ *L. monocytogenes* ที่เตรียมไว้ ซึ่งมีระดับความเข้มข้นสุดท้ายใน microplate 5×10^5 cfu/ml นอกจากนี้ทำการเตรียมกลุ่มควบคุมตัวอย่างละ 5 แบบ โดย 1) - 4) ทำเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ค่า MIC สำหรับ 5) positive control คือ สารต้านแบคทีเรียชนิดเดียวที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว + อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB + แบคทีเรีย จากนั้นนำ microplate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วทำการวัดความขุ่นเพื่อหาค่า MIC และทำการหาค่า MBC เพื่อนำมาวิเคราะห์ค่า Fractional inhibitory concentration index (FICI) และ Fractional bactericidal concentration index (FBCI) ตามลำดับ ตามวิธีของ European committee for antimicrobial susceptibility testing (Eucast) (2000) จากสมการดังนี้

$$\text{FIC}_A = \text{MIC}_A \text{ ในการใช้สารรวม} / \text{MIC}_A \text{ ในการใช้สารชนิดเดียว}$$

$$\text{FIC}_B = \text{MIC}_B \text{ ในการใช้สารรวม} / \text{MIC}_B \text{ ในการใช้สารชนิดเดียว}$$

$$\text{FICI} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B$$

เมื่อ A และ B คือสารต้านแบคทีเรีย 2 ชนิด

พิจารณาการออกฤทธิ์เสริมกัน ดังนี้ 1) FICI หรือ FBCI ≤ 0.5 คือ Synergy 2) FICI หรือ FBCI > 0.5 to 1.0 คือ partial synergy/addition 3) FICI หรือ FBCI > 1.0 to < 2.0 คือ indifference และ 4) FICI หรือ FBCI ≥ 2.0 คือ antagonism

5. การวิเคราะห์ระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายแบคทีเรีย

ทำการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* ของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ กรดลอริก และโมโนลอรินร่วมกับกรดแลคติก ทั้งนี้ทำการวางแผนการทดลองแบบ 8×11 factorial in CRD โดยมีปัจจัย A คือ ชนิดของสาร 8 ชนิด ได้แก่ กลุ่มควบคุม (ไม่สัมผัสสาร) กลุ่มสัมผัสน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 100%(v/v) กลุ่มกรดลอริก โมโนลอริน และกรดแลคติกที่ความเข้มข้น MBC ของสารแต่ละชนิด (1,000 mg/ml 1 mg/ml และ 4%(v/v) ตามลำดับ) และกลุ่มน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ร่วมกับกรดแลคติก กรดลอริกร่วมกับกรดแลคติก และโมโนลอรินร่วมกับกรดแลคติกที่ความเข้มข้น FBCI ของสารแต่ละคู่ (6.25%(v/v) + 0.50%(v/v) 500 mg/ml + 1%(v/v) และ 0.16 mg/ml + 0.50%(v/v) ตามลำดับ) และปัจจัย B คือ ระยะเวลาที่แบคทีเรียสัมผัสสารสกัด โดยแบ่งเป็น 11 ช่วงเวลา ได้แก่ 0, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 360, 720 และ 1,080 นาที ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ รวมทั้งสิ้น 264 ตัวอย่าง จากนั้นทำการวิเคราะห์ Population density estimate โดยตามวิธีของ Tangwacharin et al. (2006) โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียที่เหลืออยู่ภายหลังสัมผัสสารสกัดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA เพื่อหาปริมาณ Total culturable cells แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจนับจำนวนโคโลนี

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ของสารแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* ที่เหลืออยู่ภายหลังสัมผัสสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดย GLM procedure และการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย Duncan's New Multiple Range Test ตามลำดับที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม SAS (Statistical Analysis System Institute, 1998)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

จากการทดสอบพบว่า กรดลอริก โมโนลอริน และกรดแลคติกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ที่ความเข้มข้น $\geq 250.00 \geq 0.04$ mg/disc และ $\geq 1.00\%$ (v/disc) ตามลำดับ (Figure 1) ซึ่งสอดคล้องกับค่า MIC ของสารทั้ง 3 ชนิด ที่มีค่าเท่ากับ 500.00 และ 0.16 mg/ml และ 1.00 mg/ml ตามลำดับ แต่

อย่างไรก็ตาม ค่า MBC ของกรดลอริกและโมโนลอรีนมีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของค่า MIC คือ 1,000 และ 0.31 mg/ml ตามลำดับ แต่ค่า MBC ของกรดแลคติกมีความเข้มข้นเป็น 4 เท่าของค่า MIC คือ 4.00%(v/v) (Table 1) ในขณะที่ น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งพบว่า กรดลอริก โมโนลอรีน และกรดแลคติกมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ (Skřivanová and Marounek, 2007) กรดลอริกเป็นกรดไขมันที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากที่สุด และสารอนุพันธ์ เอสเทอร์ของกรดลอริกคือโมโนลอรีนก็มีประสิทธิภาพดีกว่าสารอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดไขมันชนิดอื่นเช่นกัน (Kabara *et al.*, 1972) โดยโมโนลอรีนจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีกว่ากรดลอริกเนื่องจากสารทั้ง 2 ชนิด เป็นไขมันมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำสูง จึงสามารถผ่านเข้าไปชั้นเมมเบรนไบเลเยอร์ของแบคทีเรีย และทำลาย glycerophospholipids ของเมมเบรน แต่ยิ่งไปกว่านั้น โมโนลอรีนนอกจากจะทำลายเมมเบรนแล้วยังมีผลต่อระบบ พลังงานและการหายใจของแบคทีเรีย (Kabara and Marshall, 2005) สำหรับกรดแลคติกนั้น สามารถยับยั้งการเจริญ ของแบคทีเรียได้เนื่องจากส่วนที่ชอบไขมันของกรด ซึ่งจะอยู่ในรูปโมเลกุลที่ไม่แตกตัวและซึมผ่านเข้าไปในเมมเบรนของแบคทีเรียที่มีค่า pH ค่อนข้างเป็นกลาง (pH 7) ซึ่งสูงกว่าค่า pH ของไซโตพลาซึม ดังนั้นเมื่อกรดอยู่ในรูปที่กรดจะ แตกตัวออกในรูปของโปรตอน และจับกับเบส ส่งผลในการทำลายออกซิเดทีฟ ฟอสฟอริเลชัน ฟอรัม ของระบบการ ขนส่งอิเล็กตรอน รวมไปถึงการยับยั้งระบบขนส่งสารโมเลกุลเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้การลดค่า pH ของไซโตพลาซึม จะ ส่งผลให้ไปยับยั้งการสังเคราะห์สารโมเลกุลขนาดใหญ่หลายชนิด เช่น ส่วนประกอบของเมมเบรน ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ ไขมัน และโปรตีน (Doores, 2005)

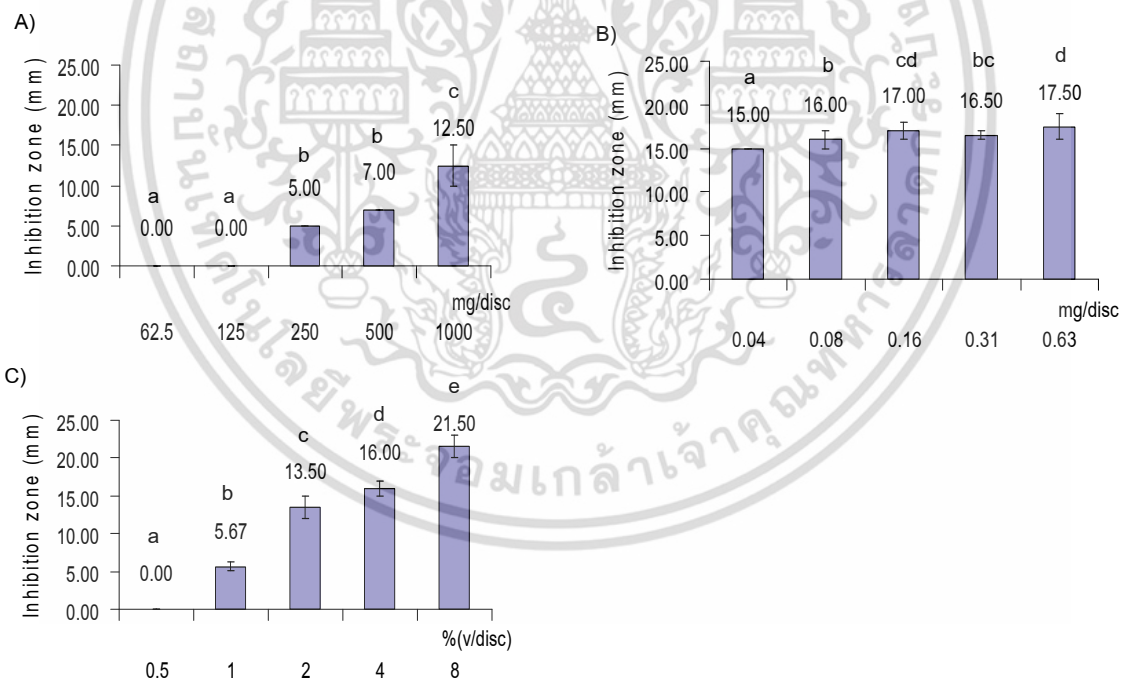


Figure 1 Antimicrobial activity (inhibition zone) of (A) lauric acid, (B) monolaurin and (C) lactic acid against *L. monocytogenes*

^{a-e} Different letters within each solution indicate that values are significantly different ($P \leq 0.05$)

Table 1 The MIC and MBC values¹ of oil and lactic acid against *L. monocytogenes*

Antimicrobials ²	<i>L. monocytogenes</i>	
	MIC	MBC
virgin coconut oil	NI ³	NI
lauric acid	500	1,000
monolaurin	0.16	0.31
lactic acid	1.00	4.00

¹ MIC, minimum inhibitory concentration; MBC, minimum bactericidal concentration.

² The units of antimicrobial are mg/ml for lauric acid and monolaurin and %(v/v) for virgin coconut oil and lactic acid.

³ NI, not inhibition.

2. การทดสอบฤทธิ์เสริมกัน

จาก Table 2 พบว่าการใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ร่วมกับกรดแลคติกมีฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งและทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* โดยมีค่า FICI และ FBCI เท่ากับ 0.3125 และ 0.1875 ตามลำดับ และการใช้กรดลอริกหรือโมโนลอรินร่วมกับกรดแลคติกมีฤทธิ์เสริมกันบางส่วนในการทำลายแบคทีเรีย โดยมีค่า FBCI เท่ากับ 0.7500 และ 0.6250 ตามลำดับ และการใช้สารเพียงชนิดเดียวที่ความเข้มข้นต่ำกว่าค่า MIC ($\leq \frac{1}{2}$ MIC) ของสารแต่ละชนิดไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ทั้งการออกฤทธิ์เสริมกันระหว่างสารด้านแบคทีเรีย 2 ชนิด จะทำให้ความเข้มข้นที่ต้องใช้ของสารแต่ละชนิดในการยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียลดลงต่ำกว่าค่า MIC หรือ MBC ของการใช้สารเพียงชนิดเดียว (Gutierrez, Barry-Ryan and Bourke, 2008) และการที่น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ กรดลอริก หรือโมโนลอรินร่วมกับกรดแลคติกมีประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียได้ดีกว่าการใช้สารเพียงชนิดเดียวนั้น เนื่องมาจากกรดแลคติกจะช่วยให้สารละลายไขมันสามารถซึมผ่านเมมเบรนได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งอาจมีผลต่อการทำงานของเมมเบรนและสูญเสียความสามารถในการควบคุมการแลกเปลี่ยนของเหลวระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ (Oh and Marshall, 1994; Tokarsky and Marshall, 2008) ดังนั้นกรดลอริก สารโมโนลอริน และกรดแลคติกมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* ที่แยกได้จากเนื้อสุกร และการใช้น้ำมันมะพร้าวร่วมกับกรดแลคติกมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* ได้ดีกว่าการใช้สารเพียงชนิดเดียว

Table 2 FICI and FBCI of the combined action of oil with lactic acid to *L. monocytogenes*

Strain	Combinations of oil and lactic acid ¹	Concentration of	Index type	Index value	Interpretation
		antimicrobial			
<i>L. monocytogenes</i>	virgin coconut oil + lactic acid	6.25 + 0.25	FICI	0.3125	Synergy
		6.25 + 0.50	FBCI	0.1875	Synergy
	lauric acid + lactic acid	500.00 + 0.125	FICI	1.1250	Indifference
		500.00 + 1.00	FBCI	0.7500	Partial synergy
	monolaurin + lactic acid	0.08 + 0.50	FICI	1.0000	Partial synergy
		0.16 + 0.50	FBCI	0.6250	Partial synergy

¹ The units of antimicrobial are mg/ml for lauric acid and monolaurin and %(v/v) for lactic acid.

3. ระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายแบคทีเรีย

จาก Figure 2 แสดงอัตราการทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* ของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 100%(v/v) กรดลอริก โมโนลอรีน และกรดแลคติกที่ความเข้มข้น MBC (1,000 mg/ml 1 mg/ml และ 4%(v/v) ตามลำดับ) น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ร่วมกับกรดแลคติก กรดลอริกร่วมกับกรดแลคติก และโมโนลอรีนร่วมกับกรดแลคติก ที่ความเข้มข้น FBCI (6.25%(v/v) + 0.50%(v/v) 500 mg/ml + 1%(v/v) และ 0.16 mg/ml + 0.50%(v/v) ตามลำดับ) พบว่า แบคทีเรียทั้งหมด (total culturable bacteria) มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วภายหลังสัมผัสสาร กรดลอริก โมโนลอรีน กรดแลคติก เพียงอย่างเดียวและที่ใช้สารละลายน้ำมัน 2 ชนิดดังกล่าวร่วมกับกรดแลคติก เป็นเวลา 240 นาที ($P \leq 0.05$) โดยกรดแลคติกมีประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียชนิดนี้ได้ดีที่สุด คือใช้เวลาในการทำลายแบคทีเรียทั้งหมดเพียง 15 นาที รองลงมาคือ โมโนลอรีนร่วมกับกรดแลคติก และกรดลอริกร่วมกับกรดแลคติกโดยใช้เวลาในการทำลายแบคทีเรียทั้งหมด 30 และ 60 นาที ตามลำดับ ส่วนการใช้โมโนลอรีน และกรดลอริกเพียงอย่างเดียวต้องใช้เวลาในการทำลายแบคทีเรียทั้งหมดถึง 240 นาที ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้สารละลายน้ำมันร่วมกับกรดแลคติก กรดแลคติกจะเพิ่มการดูดซึมโมโนลอรีนและกรดลอริกให้เข้าไปสู่เซลล์ได้มากขึ้น (Skřivanova *et al.*, 2006) ในทางตรงกันข้ามกลุ่มที่สัมผัสน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์กลับมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่มที่นานขึ้น เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มาใช้ร่วมกับกรดแลคติกพบว่าแบคทีเรียทั้งหมดมีปริมาณลดลงเหลือน้อยกว่า 1 log ภายหลังจากสัมผัสสาร 720 นาที และแบคทีเรียถูกทำลายทั้งหมดได้ภายหลังจากสัมผัสสาร 1,080 นาที ซึ่งอาจเนื่องมาจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มีกรดลอริกเป็นองค์ประกอบสูงถึง 47.16%(w/w) (ไม่ได้แสดงข้อมูล) และเมื่อนำน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มาใช้ร่วมกับกรดแลคติก จึงอาจทำให้กรดลอริกในน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ซึมเข้าไปสู่เซลล์ได้มากขึ้น ส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* ได้

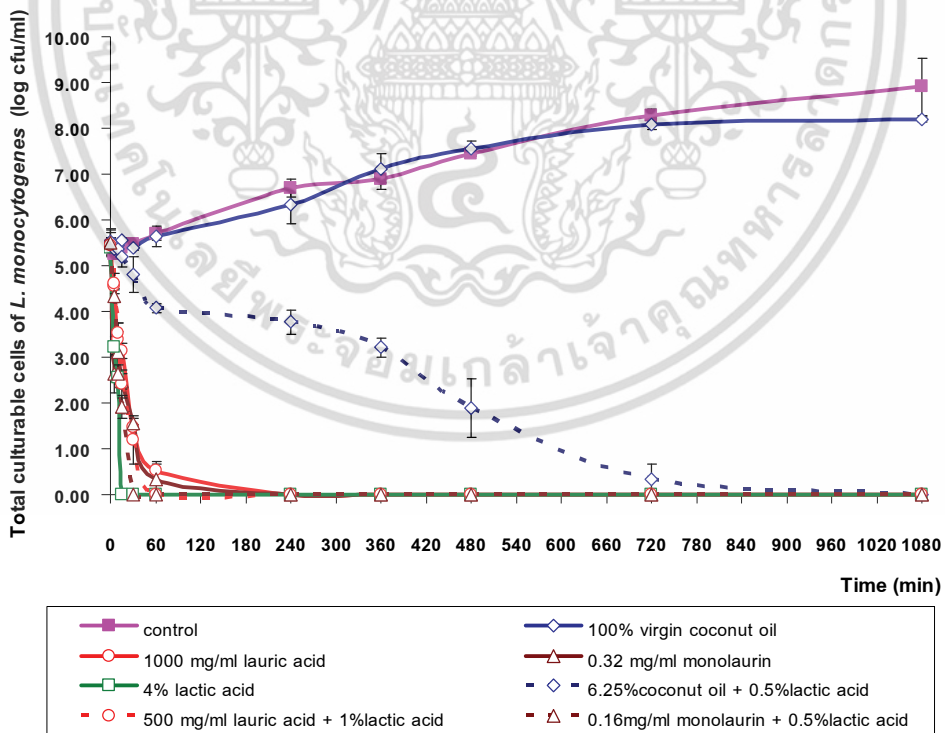


Figure 2 Survival curves for total culturable cells of *L. monocytogenes* in MHB at 35°C as a function of antibacterial agents.

สรุปผลการทดลอง

ดังนั้นอัตราการทำลายแบคทีเรียของสารสกัดขึ้นอยู่กับชนิดของสารและระยะเวลาสัมผัสสาร นอกจากนี้ควรมีการศึกษาการประยุกต์ใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ กรดลอริก และโมโนลอรินร่วมกับกรดแลคติกที่ความเข้มข้น FBCCI ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.ดร.ประภาพร ขอโพนุลย์ ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำ งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินแผ่นดิน มหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

เอกสารอ้างอิง

- ศิริพร แต่มสุวรรณ. 2551. ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Salmonella derby*, *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* บนผิวเนื้อสุกรด้วยน้ำมันมะพร้าวและกรดแลคติก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- Bacteriological Analytical Manual (BAM) Online. 2003. *Listeria monocytogenes*. U.S. Food and Drug Administration. Available at: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/aboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManual/BAM/ucm071400.htm>. 9 May. 2009.
- Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris, and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45 (4): 493-496.
- Bharadwaj, R., A. Vidya, B. Dewan and A. Pal. 2003. An *in vitro* study to evaluate the synergistic activity of norfloxacin and metronidazole. *Indian Journal of Pharmacology*. 35 (4): 220-226.
- CLSI. 2002. Reference method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
- Doores, S. 2005. Organic acid. pp.91-142. In P.M. Davidson, J.N. Sofos and J.I. Brannen (ed). *Antimicrobials in foods*, 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- European committee for antimicrobial susceptibility testing (Eucast). 2000. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clinical Microbiology and Infection*. 6 (9): 503-508.
- Gutierrez, J., C. Barry-Ryan and P. Bourke. 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*. 124 (1): 91-97.
- Huffman, R.D. 2002. Current and future technologies for the decontamination of carcass and fresh meat. *Meat Science*. 62 (3): 285-294.
- Kabara, J.J. 1978. Health oils from the tree of life. pp. 624-629. In J.J. Kabara (ed). *Pharmacological effect of lipids*. AOCs Press, London.
- Kabara, J.J. and D.L. Marshall. 2005. Medium-chain fatty acids and esters. pp. 327-360. In P.M. Davison, J.N. Sofos and J.L. Brannen (ed). *Antimicrobials in food*, 3rd ed. CRD Press, Boca Raton, FL
- Kabara, J.J., D.M. Swieczkowski, A.J. Conley and J.P. Truant. 1972. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2 (1): 23-28.
- Oh, D.H. and D.L. Marshall. 1994. Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* by glycerol monolaurate with organic acids. *Journal of Food Science*. 59 (6): 1258-1261.
- Ruzin, A. and R.P. Novick. 2000. Equivalence of lauric acid and glycerol monolaurate as inhibitors of signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 182 (9): 2668-2671.
- SAS. 1998. SAS/STAT User's Guide. Version 6.12. USA: Statistical Analysis Systems Institute Inc.
- Skřivanová, E. and M. Marounek. 2007. Influence of pH on antimicrobial activity of organic acids against rabbit enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. *Folia Microbiologica*. 52 (1): 70-72.
- Skřivanová, E., M. Marounek, V. Benda, and P. Brezina. 2006. Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. *Veterinary Medicine*. 51 (3): 81-88.
- Tangwatcharin, P., S. Chanthachum, P. Khopaibool and M.W. Griffiths. 2006. Morphological and physiological responses of *Campylobacter jejuni* to stress. *Journal of Food Protection*. 69 (11): 2747-2753.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Tokarsky, O. and D.L. Marshall. 2008. Mechanism of synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* growth by lactic acid, monolaurin and Nisin. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (23): 7126-7129.
- Vasconcelos de Oliveira, C.E., T.L.M. Stamford, N.J.G. Neto, and E. Leite de Souza. 2010. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acid. *International Journal of Food Microbiology*. 137 (2-3): 312-316.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้