วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 29:3 เล่ม 2 (9-17)

กิจกรรมการต้านแบคทีเรียของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ กรดลอริก และโมโนลอรินร่วมกับกรดแลกติกสำหรับทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *Listeria monocytogenes*

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

ผุสดี ตังวัชรินทร์[1] พัชนี ชอบธรรม[1] และมัทธิชา ช่างสนั่น[1]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ กรดลอริก โมโนลอริน กรดแลกติก และน้ำมันร่วมกับกรดแลกติกในการต้านเชื้อ *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, FBCI) และระยะเวลาในการทำลายแบคทีเรีย พบว่ากรดลอริก โมโนลอริน และกรดแลกติกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ได้ที่ความเข้มข้น ≥ 250.00 ≥ 0.04 mg/disc และ ≥ 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 นอกจากนี้ทำการศึกษาการออกฤทธิ์เสริมระหว่างน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ร่วมกับกรดแลกติก พบว่าออกฤทธิ์เสริมกันโดยที่ความเข้มข้น (6.25 + 0.5%(v/v)) มีค่า FBCI เท่ากับ 0.1875 ในขณะที่การใช้กรดลอริกร่วมกับกรดแลกติก (500 mg/ml + 1%(v/v)) และโมโนลอริน (0.16 mg/ml + 0.5%(v/v)) มีส่วนออกฤทธิ์เสริมกัน โดยมีค่า FBCI เท่ากับ 0.7500 และ 0.6250 ตามลำดับ นอกจากนี้การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายแบคทีเรียของสารละลายน้ำมันทั้ง 3 ชนิด ร่วมกับกรดแลกติกที่ความเข้มข้น FBCI แสดงให้เห็นว่าการใช้สารละลายน้ำมันร่วมกับกรดแลกติกออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรีย (bactericidal effect) โดยอัตราการทำลายแบคทีเรียขึ้นอยู่กับชนิดของสาร และระยะเวลาสัมผัสสาร

คำสำคัญ: กรดไขมัน สารต้านจุลชีพ *Listeria monocytogenes*

Abstract

The objectivee 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 (FBCI) and kill-time. The results were shown that lauric acid, monolaurin and lactic acid at ≥ 250.00, ≥ 0.04 mg/disc and ≥ 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

[1]คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง อ.ป่าพะยอม จ.พัทลุง 93110

ผุสดี ตังวัชรินทร์, พัชนี ชอบธรรม และมัทธิชา ช่างสนั่น. "กิจกรรมการต้านแบคทีเรียของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์กรดลอริกและโมโนลอรินร่วมกับกรดแลกติกสำหรับทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ Listeria monocytogenes" **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า** 29, 3-2 (ก.ย.-ธ.ค. 2554) 9-17

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

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ประสบปัญหาเกี่ยวกับการใช้วัตถุกันเสียเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและเพื่อการบริโภคเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ได้อย่างปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ดังนั้นจึงได้มีการนำกรดอินทรีย์มาใช้ในการผลิตเนื้อสัตว์เพื่อลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดแลกติก ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่นิยมใช้มากที่สุด (Huffman, 2002) เช่นเดียวกันกับน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ผลิตด้วยวิธีสกัดเย็นจะมีกรดลอริก (C_{12}, 51.05%) เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัวที่ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Kabara, 1978; ศิริพร แต้มสุวรรณ, 2551) และมีสารโมโนลอรินเป็นอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดลอริกมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในวงกว้าง โดยจะขัดขวางการทำงานของเอนไซม์และปัจจัยในการก่อโรคของแบคทีเรีย (Ruzin and Novick, 2000) นอกจากนี้สารโมโนลอรินเป็นสารอีมัลซิไฟเออร์ในอาหารที่มีความปลอดภัย (generally recognized as safe, GRAS) โดยได้รับการรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา (Kabara and Marshall, 2005)

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านและทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* ของน้ำมันมะพร้าว กรดลอริก โมโนลอริน และกรดแลกติกทั้งในรูปแบบการใช้สารชนิดเดียวและร่วมกัน

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±2°C เป็นเวลา 22-24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาวะ late log phase (non-stressed cells) ตามวิธีของ Tangwatcharin *et al.* (2006) เขี่ยแบคทีเรีย 2-3 โคโลนี มาใส่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland (ประมาณ 10^8 cfu/ml) จากนั้นทำการเจือจางเพื่อใช้ในการศึกษาต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 4 - 6 x 10^5 cfu/ml

2. ชนิดของสารต้านแบคทีเรีย

ทำการจัดซื้อน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ความเข้มข้น 98%(v/v) ที่ได้จากการสกัดเย็นจากบริษัทแกรนด์ สี่ซี จำกัด (กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย) กรดลอริกและสารโมโนลอรินความเข้มข้น 98 และ 99%(w/w)ตามลำดับ ทำการจัดซื้อจากบริษัท Sigma Adrich (Sigma, France) และกรดแลกติกความเข้มข้น 80%(v/v) จัดซื้อจากบริษัทวิกี้ เอ็นเตอร์ไพรซ์ จำกัด (กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย) จากนั้นนำน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ กรดลอริก และโมโนลอรินมาทำการเจือจางด้วยสารละลายไดเมทิลซัลโฟไซด์ (DMSO, Sigma, France) ความเข้มข้น 20% และกรดแลกติกทำการเจือจางด้วยน้ำปลอดเชื้อเพื่อใช้ในการศึกษาต่าง ๆ

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ กรดลอริก โมโนลอริน 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 และโมโนลอรินมาทำการเจือจางด้วยสารละลายไดเมทิลซัลโฟไซด์ (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 μg/ml ของสารแต่ละชนิดเป็นชุดควบคุม (negative control) คือ 20%(v/v) DMSO หรือน้ำปลอดเชื้อ จากนั้นใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อจุ่มสารละลายแบคทีเรียที่เตรียมไว้มาป้ายให้ทั่วผิวหน้าวุ้นอาหาร (MHA) วาง disc ที่หยดสารสกัดและชุดควบคุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2°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 โมโนลอริน 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 แบบดังนี้ 1) growth control คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB + แบคทีเรีย 2) negative control คือ ตัวทำละลาย + อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB + แบคทีเรีย 3) sterile control คือใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ และ 4) positive control คือ ยาปฏิชีวนะ Ciprofloxacin (Sigma, France) เช่นเดียวกับสารน้ำมัน ให้มีความเข้มข้น 0.5 - 250 μg/ml + อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB + แบคทีเรีย นำ microplate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2°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±2°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วทำการบันทึกค่า MBC ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายแบคทีเรียได้ไม่น้อยกว่า 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 โมโนลอริน และกรดแลกติกเช่นเดียวกันการวิเคราะห์ค่า MIC โดยสารแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นสุดท้ายจำนวน 6 ระดับ อยู่ในช่วง 1/16MIC-2MIC 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) โมโนลอรินร่วมกับกรดแลกติกลงใน microplate จะได้มีตัวอย่าง 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 เพื่อนำการวิเคราะห์ค่า Fractional inhibitory concentration index (FICI) และ Fractional bactericidal concentration index (FBCI) ตามลำดับ ตามวิธีของ European committee for antimicrobial susceptibility testing (Eucast) (2000) จากสมการดังนี้

FIC_A = MIC_A ในการใช้สารร่วม / MIC_A ในการใช้สารชนิดเดียว

FIC_B = MIC_B ในการใช้สารร่วม / MIC_B ในการใช้สารชนิดเดียว

FICI = $FIC_A + FIC_B$

เมื่อ A และ B คือสารต้านแบคทีเรีย 2 ชนิด

พิจารณาการออกฤทธิ์เสริมกัน ดังนี้ 1) FICI หรือ FBCI $\leq$ 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 $\geq$ 2.0 คือ antagonism

5. การวิเคราะห์ระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายแบคทีเรีย

ทำการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* ของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ กรดลอริก และโมโนลอรินร่วมกับกรดแลกติก ทั้งนี้ทำการวางแผนการทดลองแบบ 8x11 factorial in CRD โดยมีปัจจัย A คือ ชนิดของสาร 8 ชนิด ได้แก่ กลุ่มควบคุม (ไม่สัมผัสสาร) กลุ่มสัมผัสน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 100%(v/v) กลุ่มกรดลอริก โมโนลอริน และกรดแลกติกที่ความเข้มข้น MBC ของสารแต่ละชนิด (1,000 mg/ml 1 mg/ml และ 4%(v/v) ตามลำดับ) และกลุ่มน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ร่วมกับกรดแลกติก กรดลอริกร่วมกับกรดแลกติก และโมโนลอรินร่วมกับกรดแลกติกที่ความเข้มข้น 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 Tangwatcharin et al. (2006) โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียที่เหลืออยู่ภายหลังสัมผัสสารสกัดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA เพื่อหาปริมาณ Total culturable cells แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจนับจำนวนโคโลนี

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ของสารแต่ชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* ที่เหลืออยู่ภายหลังสัมผัสการสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่าง 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 และกรดแลกติกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *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 ของกรดลอริกและโมโนลอรินมีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของค่า MIC คือ 1,000 และ 0.31 mg/ml ตามลำดับ แต่ค่า MBC ของกรดแลกติกมีความเข้มข้นเป็น 4 เท่าของค่า MIC คือ 4.00%(v/v) (Table 1) ในขณะที่น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งพบว่ากรดลอริก โมโนลอริน และกรดแลกติกมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ (Skřivanová and Marounek, 2007) กรดลอริกเป็นกรดไขมันที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากที่สุด และสารอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดลอริกคือโมโนลอรินก็มีประสิทธิภาพดีกว่าสารอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดไขมันชนิดอื่นเช่นกัน (Kabara *et al.*, 1972) โดยโมโนลอรินจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีกว่ากรดลอริกเนื่องจากสารทั้ง 2 ชนิด เป็นไขมันมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำสูง จึงสามารถผ่านเข้าไปชั้นเมมเบรนไบเลเยอร์ของแบคทีเรีย และทำลาย glycerophospolipids ของเมมเบรน แต่ยิ่งไปกว่านั้น โมโนลอรินนอกจากจะทำลายเมมเบรนแล้วยังมีผลต่อระบบพลังงานและการหายใจของแบคทีเรีย (Kabara and Marshall, 2005) สำหรับกรดแลกติกนั้น สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้เนื่องจากส่วนที่ชอบไขมันของกรด ซึ่งจะอยู่ในรูปโมเลกุลที่ไม่แตกตัวและซึมผ่านเข้าไปในเมมเบรนของแบคทีเรียที่มีค่า pH ค่อนข้างเป็นกลาง (pH 7) ซึ่งสูงกว่าค่า pH ของไซโตพลาซึม ดังนั้นเมื่อกรดอยู่ในรูปที่กรดจะแตกตัวออกในรูปของโปรตอน และจับกับเบส ส่งผลในการทำลายออกซิเดทีฟ ฟอสฟอรีเลชั่น ฟอร์ม ของระบบการขนส่งอิเล็กตรอน รวมไปถึงการยับยั้งระบบขนส่งสารโมเลกุลเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้การลดค่า pH ของไซโตพลาซึม จะส่งผลให้ไปยับยั้งการสังเคราะห์สารโมเลกุลขนาดใหญ่หลายชนิด เช่น ส่วนประกอบของเมมเบรน ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ ไขมัน และโปรตีน (Doores, 2005)

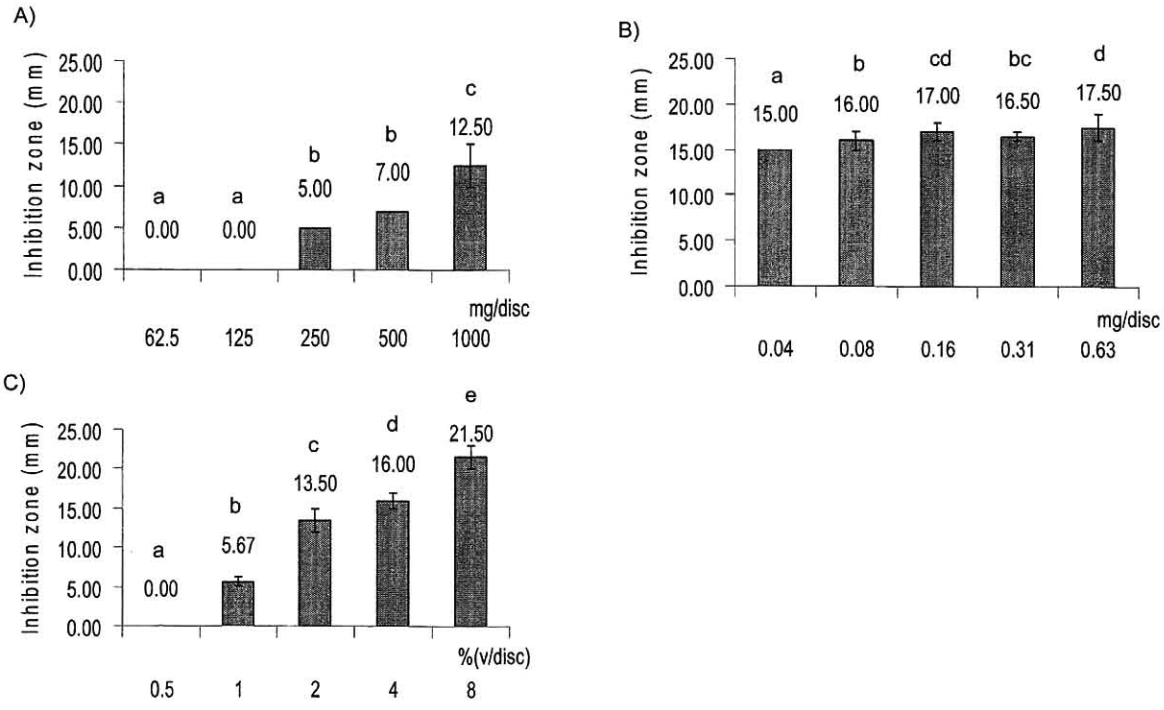

Figure 1 Antimicrobial activity (inhibition zone) of (A) lauric acid, (B) monolaurin and (C) lactic acid against *L. monocytogenes*

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

Table 1 The MIC and MBC values[1] of oil and lactic acid against *L. monocytogenes*

Antimicrobials[2]	*L. monocytogenes*	
	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 พบว่าการใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ร่วมกับกรดแลกติกมีฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งและทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* โดยมีค่า FICI และ FBCI เท่ากับ 0.3125 และ 0.1875 ตามลำดับ และการใช้กรดลอริกหรือโมโนลอรินร่วมกับกรดแลกติกมีฤทธิ์เสริมกันบางส่วนในการทำลายแบคทีเรีย โดยมีค่า FBCI เท่ากับ 0.7500 และ 0.6250 ตามลำดับ และการใช้สารเพียงชนิดเดียวที่ความเข้มข้นต่ำกว่าค่า MIC (≤ ½MIC) ของสารแต่ละชนิดไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ทั้งการออกฤทธิ์เสริมกันระหว่างสารต้านแบคทีเรีย 2 ชนิด จะทำให้ความเข้มข้นที่ต้องใช้ของสารแต่ละชนิดในการยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียลงลดต่ำกว่าค่า MIC หรือ MBC ของการใช้สารเพียงชนิดเดียว (Gutierrez, Barry-Ryan and Bourke, 2008) และการที่น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ กรดลอริก หรือโมโนลอรินมร่วมกับกรดแลกติกมีประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียได้ดีกว่าการใช้สารเพียงชนิดเดียวนั้น เนื่องมาจากกรดแลกติกจะช่วยให้สารละลายไขมันสามารถซึมผ่านเมมเบรนได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งอาจมีผลต่อการทำงานของเมมเบรนและสูญเสียความสามารถในการควบคุมการแลกเปลี่ยนของเหลวระหว่างภายในและภายนอกเซล (Oh and Marshall, 1994; Tokarskyy and Marshall, 2008) ดังนั้นกรดลอริก สารโมโนลอริน และกรดแลกติกมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* ที่แยกได้จากเนื้อสุกร และการใช้สารน้ำมันร่วมกับกรดแลกติกมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *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 antimicrobial	Index type	Index value	Interpretation
L. monocytogenes	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 โมโนลอริน และกรดแลกติกที่ความเข้มข้น MBC (1,000 mg/ml 1 mg/ml และ 4%(v/v) ตามลำดับ) น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ร่วมกับกรดแลกติก กรดลอริกร่วมกับกรดแลกติก และโมโนลอรินร่วมกับกรดแลกติกที่ความเข้มข้น 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) มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วภายหลังสัมผัสกรดลอริก โมโนลอริน กรดแลกติก เพียงอย่างเดียวและที่ใช้สารละลายน้ำมัน 2 ชนิดดังกล่าวร่วมกับกรดแลกติก เป็นเวลา 240 นาที ($P \leq 0.05$) โดยกรดแลกติกมีประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียชนิดนี้ได้ดีที่สุด คือใช้เวลาในการทำลายแบคทีเรียทั้งหมดเพียง 15 นาที รองลงมาคือ โมโนลอรินร่วมกับกรดแลกติก และกรดลอริกร่วมกับกรดแลกติกโดยใช้เวลาในการทำลายแบคทีเรียทั้งหมด 30 และ 60 นาที ตามลำดับ ส่วนการใช้โมโนลอริน และกรดลอริกเพียงอย่างเดียวต้องใช้เวลาในการทำลายแบคทีเรียทั้งหมดถึง 240 นาที ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้สารละลายน้ำมันร่วมกับกรดแลกติก กรดแลกติกจะเพิ่มการดูดซึมโมโนลอรินและกรดลอริกให้เข้าไปสู่เซลล์ได้มากขึ้น (Skřivanova *et al.*, 2006) ในทางตรงกันข้ามกลุ่มที่สัมผัสน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์กลับมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่มที่นานขึ้นเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มาใช้ร่วมกับกรดแลกติกพบว่าแบคทีเรียทั้งหมดมีปริมาณลดลงเหลือน้อยกว่า 1 log ภายหลังสัมผัสสาร 720 นาที และแบคทีเรียถูกทำลายทั้งหมดได้ภายหลังสัมผัสสาร 1,080 นาที ซึ่งอาจเนื่องมาจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มีกรดลอริกเป็นองค์ประกอบสูงถึง 47.16%(w/w) (ไม่ได้แสดงข้อมูล) และเมื่อนำน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มาใช้ร่วมกับกรดแลกติก จึงอาจทำให้กรดลอริกในน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ซึมเข้าไปสู่เซลล์ได้มากขึ้น ส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* ได้

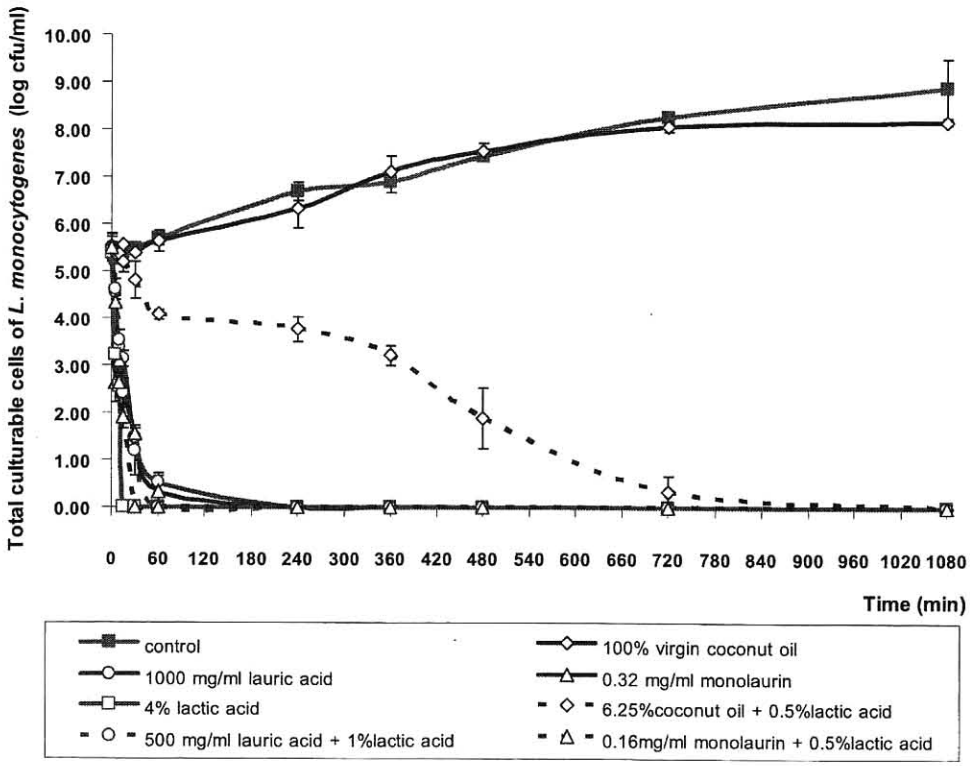

Figure 2 Survival curves for total culturable cells of *L. monocytogenes* in MHB at 35°C as a function of antibacterial agents.

สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สรุปผลการทดลอง

ดังนั้นอัตราการทำลายแบคทีเรียของสารสกัดขึ้นอยู่กับชนิดของสารและระยะเวลาสัมผัสสาร นอกจากนี้ควรมีการศึกษาการประยุกต์ใช้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ กรดลอริก และโมโนลอรินร่วมกับกรดแลกติกที่ความเข้มข้น FBCI ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

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

เอกสารอ้างอิง

ศิริพร แต้มสุวรรณ. 2551. ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Salmonella derby, Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* บนผิวเนื้อสุกรด้วยน้ำมันมะพร้าวและกรดแลกติก. 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 norfloxacid 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. Swieezkowski, 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 Microbiology. 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. Morpholological and physiological responses of *Campylobacter jejuni* to stress. Journal of Food Protection. 69 (11): 2747-2753.

Tokarskyy, O. and D.L. Marshall. 2008. Mechanism of synergistic inhibition of *Listeria moncytogenes* 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.