



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ประสิทธิภาพของกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค
(Effect of fatty acid from virgin coconut oil against pathogenic microorganisms)

โดย

หัวหน้าโครงการ
ผู้ร่วมวิจัย

นางสาวอุมพร ทาไธสง
นางสาววิษณีย์ ยืนยงพุทธกาล
นางสิริมา ชินสาร

29 มี.ค. 2555

301370

๕๕๐๕๗๒๘๕

เริ่มบริการ

24 พ.ค. 2555

โครงการวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๓-๒๕๕๔

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

หัวข้อวิจัย ประสิทธิภาพของกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค
(Effect of fatty acid from virgin coconut oil against pathogenic microorganisms)
หัวหน้าโครงการ นางสาวอุมาพร ทาไรสง
หน่วยงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ปีงบประมาณ 2553-2554

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของกรดไขมันที่แยกได้จากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจำนวน 6 ชนิด ซึ่งได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. จากการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion พบว่ากรดไขมัน (ความเข้มข้น 50 % v/v ปริมาตร 20 ไมโครลิตร) สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* และ *B. cereus* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 10.67 ± 0.50 , 9.00 ± 0.00 และ 8.33 ± 0.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อนำกรดไขมันมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ต่อเชื้อทดสอบ ด้วยวิธี agar dilution พบว่าค่า MIC ของกรดไขมันต่อ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* และ *B. cereus* เท่ากับ 0.04% v/v ส่วนค่า MIC ของกรดไขมันต่อ *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. เท่ากับ >2.5% v/v และจากการทดสอบฤทธิ์ต้าน *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* และ *B. cereus* ของกรดไขมันในตัวอย่างอาหาร พบว่าจำนวน *S. aureus* ลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ส่วนจำนวน *B. subtilis* และ *B. cereus* ในอาหารที่เติมกรดไขมันลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ส่วนการศึกษาคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ของอาหารที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นส่วนประกอบ ซึ่งได้แก่ โยเกิร์ตธรรมชาติ น้ำสลัดชนิดข้น ไข่กรอกเปรี้ยว และกระเทียม โดยทำการตรวจวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ทั้งหมด (aerobic plate count) โคลิฟอร์ม และ *E. coli* พบว่า จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างอาหารที่เติมและไม่เติมน้ำมันมะพร้าวไม่แตกต่างกัน และตรวจพบการปนเปื้อนโคลิฟอร์มในตัวอย่างไข่กรอกเปรี้ยวที่เติมและไม่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ (>1100 MPN/กรัม) ส่วนตัวอย่างอาหารที่นำมาวิเคราะห์ทั้งหมดตรวจไม่พบ *E. coli*

คำสำคัญ : กรดไขมัน น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ ฤทธิ์ยับยั้ง จุลินทรีย์ก่อโรค

ABSTRACT

This study was aimed to test antimicrobial activity of fatty acid extracted from virgin coconut oil in growth inhibition of 6 pathogenic bacteria including *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. The result from disc diffusion method showed that fatty acid could inhibit growth of *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis*, *B. cereus* which inhibition zones were 10.67 ± 0.50 , 9.00 ± 0.00 and 8.33 ± 0.50 mm, respectively. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the fatty acid determined by agar dilution method showed that MIC of the fatty acid against *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis*, *B. cereus* was 0.04% v/v. The MIC of the fatty acid against *E. coli*, *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. was >2.5% v/v. The fatty acid was tested against *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis*, *B. cereus* in food sample. The extract has a slight inhibitory effect on *S. aureus* ATCC 25923. Whereas significantly inhibition found in *B. subtilis* and *B. cereus* when compare with control. Microbiological quality of foods containing virgin coconut oil (natural yogurt, salad, fermented pork sausage, and garlic) showed that aerobic plate count value from the food samples did not different from control. Both of Fermented pork sausage containing virgin coconut oil and control were positive for coliform bacteria (>1100 MPN/ml). All food samples were negative for *E. coli*.

Keyword : fatty acid, virgin coconut oil, antimicrobial activity, pathogenic microorganisms

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง.....	ข
สารบัญภาพ.....	ค
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา.....	3
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	26
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	33
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	48
เอกสารอ้างอิง.....	51
ภาคผนวก.....	54
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ปริมาณของกรดไขมันที่สกัดได้ (AOAC Da 14-48).....	55
ภาคผนวก ข ชนิดของกรดไขมันที่สกัดได้จากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์แบบบีบเย็น.....	57
ภาคผนวก ค การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....	58
ภาคผนวก ง จำนวนเชื้อในตัวอย่างอาหารที่เค็มและไม่เค็มกรดไขมัน.....	63
ภาคผนวก จ ตาราง MPN.....	65
ภาคผนวก ฉ ปริมาณ โคลิฟอร์ม (MPN/กรัม) ในอาหาร.....	66

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone ของกรดไขมันจาก น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์และดิสค์ยาปฏิชีวนะต่อการเจริญของเชื้อ ทดสอบจำนวน 6 ชนิด.....	35
2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของกรดไขมันต่อการเจริญของแบคทีเรีย ทดสอบ.....	35
3 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่าง 4 ชนิด จำนวน 8 ตัวอย่าง.....	46
4 ปริมาณโคลิฟอร์มในตัวอย่างอาหาร (MPN/กรัม).....	47
5 ผลการทดสอบกรดไขมันที่สกัดจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์แบบบิบเย็น.....	57
6 จำนวน <i>B. subtilis</i> ในอาหารที่เติมและไม่เติมกรดไขมันที่เวลาต่างๆ.....	63
7 จำนวน <i>S. aureus</i> ในอาหารที่เติมและไม่เติมกรดไขมันที่เวลาต่างๆ.....	64
8 จำนวน <i>B. cereus</i> ในอาหารที่เติมและไม่เติมกรดไขมันที่เวลาต่างๆ.....	64
9 ค่า MPN/กรัม เมื่อเพาะตัวอย่างจากระดับความเจือจาง 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} ในอาหารเลี้ยงเชื้อระดับความเจือจางละ 3 หลอด.....	65
10 จำนวนผลบวกของหลอดอาหาร BGLB broth และปริมาณโคลิฟอร์ม (MPN/กรัม) ในอาหาร.....	66

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ขั้นตอนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบีบเย็นด้วยเครื่องบีบแบบสกรู.....	7
2 ลักษณะ Inhibition zone ของกรดไขมัน (ความเข้มข้น 50% v/v ปริมาตร 20 ไมโครลิตร) ในการยับยั้งการเจริญของ <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	36
3 ลักษณะ Inhibition zone ของกรดไขมัน (ความเข้มข้น 50% v/v ปริมาตร 20 ไมโครลิตร) ในการยับยั้งการเจริญของ <i>B. subtilis</i>	36
4 ลักษณะ Inhibition zone ของกรดไขมัน (ความเข้มข้น 50% v/v ปริมาตร 20 ไมโครลิตร) ในการยับยั้งการเจริญของ <i>B. cereus</i>	37
5 ประสิทธิภาพของกรดไขมัน (ความเข้มข้น 50% v/v ปริมาตร 20 ไมโครลิตร) ในการยับยั้งการเจริญของ <i>E. coli</i>	37
6 ประสิทธิภาพของกรดไขมัน (ความเข้มข้น 50% v/v ปริมาตร 20 ไมโครลิตร) ในการยับยั้งการเจริญของ <i>Shigella</i> spp.....	38
7 ประสิทธิภาพของกรดไขมัน (ความเข้มข้น 50% v/v ปริมาตร 20 ไมโครลิตร) ในการยับยั้งการเจริญของ <i>Salmonella</i> spp.	38
8 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของกรดไขมัน ความเข้มข้น 0.02% v/v ต่อเชื้อทดสอบด้วยวิธี agar dilution	39
9 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของกรดไขมัน ความเข้มข้น 0.04% v/v ต่อเชื้อทดสอบด้วยวิธี agar dilution	40
10 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของกรดไขมัน ความเข้มข้น 0.08% v/v ต่อเชื้อทดสอบด้วยวิธี agar dilution	41
11 ผลของ DMSO ต่อการเจริญของเชื้อทดสอบด้วยวิธี agar dilution.....	42
12 จำนวน <i>S. aureus</i> ATCC 25923 ในอาหารที่ไม่เติมและเติมกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าว หลังจากนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ.....	43
13 จำนวน <i>B. cereus</i> ในอาหารที่ไม่เติมและเติมกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าว หลังจากนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ.....	44
14 จำนวน <i>B. subtilis</i> ในอาหารที่ไม่เติมและเติมกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าว หลังจากนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ.....	45

บทที่ 1

บทนำ

น้ำมันมะพร้าวที่สกัดจากมะพร้าวแห้งถูกนำมาใช้บริโภคและใช้เป็นยาพื้นบ้านตั้งแต่สมัยโบราณ ปัจจุบันน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ (Virgin Coconut Oil) ที่ใช้กันอยู่ทั่วไปได้มาจากกระบวนการผลิตที่เรียกว่า การบีบเย็น ซึ่งเป็นกระบวนการบีบไม่ผ่านความร้อนสูง ผลิตจากเนื้อมะพร้าวสดเป็นน้ำมันมะพร้าวที่บริสุทธิ์ที่สุด สีใสเหมือนน้ำ มีวิตามินอี และไม่ผ่านขบวนการเติมออกซิเจน (oxidation) มีค่า peroxide และกรดไขมันอิสระต่ำ มีกลิ่นมะพร้าวอย่างอ่อน ๆ มะพร้าวบริสุทธิ์เป็นน้ำมันที่ผลิตโดยอุตสาหกรรมขนาดเล็ก หรือในครัวเรือน น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มีกรดไขมันอิ่มตัวประมาณ 92% ซึ่งประกอบด้วย กรดไขมันอิ่มตัวห่วงโซ่สั้น (C6:0) 0.5% กรดไขมันอิ่มตัวห่วงโซ่ปานกลาง (C8:0, C10:0 และ C12:0) 63% ซึ่งกรดไขมันที่สำคัญได้แก่ กรดคาปริก (capric acid, C10) 6-7% กรดลอริก (Lauric acid, C12) 48 – 53% และกรดไมริสติก (myristic acid, C14) นอกจากนี้ น้ำมันมะพร้าวยังประกอบไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) 9% ซึ่งแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid) ได้แก่ กรดลินโนเลอิก (linoleic acid, C18) 2.3% และ กรดโอเลอิก (Oleic acid, C18) น้ำมันมะพร้าวยังประกอบด้วยวิตามินอีอีกด้วย เป็นผลให้น้ำมันมะพร้าวโดดเด่นกว่าน้ำมันพืชชนิดอื่น ดังนั้นจึงถูกนำมาใช้เพื่อสุขภาพและความงามของผู้บริโภค ประโยชน์ของน้ำมันมะพร้าวได้แก่ เสริมภูมิคุ้มกัน ป้องกันคอเลสเตอรอล ป้องกันโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจและโรคเมรังคิวหน้ำ เป็นต้น บำรุงผิวและเส้นผม บำรุงร่างกายให้แข็งแรง เนื่องจากน้ำมันมะพร้าวประกอบด้วยกรดไขมันชนิดต่างๆ และโมโนกลีเซอไรด์ มีรายงานว่ากรดไขมันสามารถยับยั้งจุลชีพได้หลายชนิด ได้แก่ *Helicobacter pylori* (Bergsson et al., 2002), Streptococci group A, และ Streptococci group B, *Staphylococcus aureus* (Bergsson et al., 2001b), *Neisseria gonorrhoeae* (Bergsson et al., 1999), *Candida albicans* (Bergsson et al., 2001a) และ *Listeria monocytogenes* (Wang & Johnson, 1992) เป็นต้น ดังนั้นกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์น่าจะสามารถต้าน จุลชีพได้หลายชนิด และที่สำคัญสารดังกล่าวไม่เป็นพิษต่อมนุษย์และต่อแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ ดังนั้นการศึกษาประสิทธิภาพของกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จึงมีประโยชน์ในการส่งเสริมให้ประชาชนเห็นคุณค่าและหันมาบริโภคน้ำมันมะพร้าวมากขึ้น และนำกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ศึกษาประสิทธิภาพของกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด

ความสำคัญของการศึกษา

เพื่อทราบว่ากรดไขมันที่แยกได้จากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด

สมมติฐานของการศึกษา

กรดไขมันที่แยกได้จากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด

ขอบเขตของโครงการวิจัย

- 1) ทดสอบประสิทธิภาพของกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด ด้วยวิธี disc diffusion ทำให้ทราบว่ากรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มีฤทธิ์ต้านเชื้อชนิดใดบ้าง
- 2) หาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ด้วยวิธี agar dilution
- 3) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ในตัวอย่างอาหาร
- 4) ศึกษาคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ของอาหารที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นส่วนประกอบ

สถานที่ทดลอง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาแบ่งออกเป็น 5 ตอนคือ

1. รายละเอียดเกี่ยวกับน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์
2. องค์ประกอบของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์
3. รายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ
4. รายละเอียดเกี่ยวกับการทดสอบความไวของเชื้อต่อต้านจุลชีพ
5. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. รายละเอียดเกี่ยวกับน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์

มะพร้าวเป็นพืชพื้นเมืองของไทย ซึ่งบรรพบุรุษได้นำมะพร้าวมาใช้ประโยชน์จากทุกส่วนของต้น จนมะพร้าวได้ชื่อว่าเป็นต้นไม้สารพัดประโยชน์ และเป็นพฤษภชาชีวิน หรือ Tree of life เนื่องจากเป็นที่มาของปัจจัยสี่ ได้แก่ อาหาร เครื่องนุ่งห่ม ยารักษาโรค และที่อยู่อาศัย มาตั้งแต่โบราณกาล (ณรงค์ โฉมเฉลา, 2548) คนไทยนิยมที่จะใช้กะทิในการประกอบอาหารทั้งอาหารคาวและอาหารหวานเพราะกะทิทำให้อาหารมีรสอร่อย หวาน มัน กลมกล่อม เป็นเอกลักษณ์และสร้างชื่อเสียงให้กับอาหารไทยไปทั่วโลก นอกจากนี้ยังมีการใช้ในรูปของน้ำมันมะพร้าว ซึ่งน้ำมันมะพร้าวเป็นน้ำมันพืชที่เก่าแก่ที่สุดอันหนึ่งของโลก ตามตำราอายุรเวทของอินเดีย ได้มีการใช้น้ำมันมะพร้าวเป็นยารักษาโรคมานานกว่า 4,000 ปี ในประเทศจีน ได้นำน้ำมันมะพร้าวไปใช้ในตำรายาจีนมากกว่า 2,000 ปี โดยใช้รักษาโรค 69 โรค ส่วนในประเทศต่างๆ ในทวีปอเมริกากลาง และแอฟริกาตะวันออก ได้ใช้น้ำมันมะพร้าวต้มเป็นแกว ๆ เพื่อรักษาอาการของโรค ชาวฟิลิปปินส์ซึ่งเป็นผู้ผลิตน้ำมันมะพร้าวรายใหญ่ที่สุดในโลก ก็ได้ใช้น้ำมันมะพร้าวเป็นยา ทั้งกินและทา มาช้านาน ส่วนคนไทยก็ใช้น้ำมันมะพร้าวตามตำราแพทย์แผนไทย ชื่อโอสถพระนารายณ์ มาตั้งแต่สมัยอยุธยาตอนกลาง (ณรงค์ โฉมเฉลา, 2552)

น้ำมันมะพร้าวเป็นน้ำมันที่มีความคงตัวสูง เพราะมีองค์ประกอบเป็นไขมันที่อิ่มตัว ที่มีอะตอมของคาร์บอนเชื่อมต่อกันเป็นสายโซ่ด้วยแขนเดี่ยว (single bond) ทำให้อะตอมของออกซิเจน หรือไฮโดรเจน ไม่สามารถเข้าแทนที่ได้ ผิดกับไขมันไม่อิ่มตัวที่อะตอมของคาร์บอนเชื่อมต่อกันด้วยแขนคู่ (Double bond) ที่เป็นจุดอ่อนของโมเลกุล เพราะออกซิเจนหรือไฮโดรเจน สามารถเข้าไปเติมได้ การเติมออกซิเจน (oxidation) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นตลอดเวลา ก่อให้เกิดความเสื่อมของโมเลกุล กล่าวคือ เกิดอนุมูลอิสระเนื่องจากการเติมออกซิเจน เป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า อนุมูลอิสระ

เป็นตัวการของการเกิดโรคแห่งความเสื่อมมากมาย เช่น โรคหัวใจ โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคอ้วน เป็นต้น

การเติมไฮโดรเจน (hydrogenation) แม้ว่าจะไม่ได้เกิดขึ้นเองเหมือนการเติมออกซิเจน แต่สามารถเกิดได้ง่ายๆ เมื่อนำอาหารที่มีไขมันไม่อิ่มตัว ไปถูกกับอุณหภูมิสูง เช่น ในการทอดอาหารในน้ำมันท่วม (deep fat fry) จะเกิดสารตัวใหม่คือ ไขมันทรานส์ (trans fat) (ณรงค์ โจมเจลา, 2551) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไป และก่อให้เกิดผลเสียขึ้นกับเซลล์ เช่น ทำให้เยื่อเซลล์บุบสลาย ทำให้เชื้อโรคหรือสารพิษเข้าสู่เซลล์ได้หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงของ DNA ของเซลล์ ทำให้เกิดเป็นเซลล์มะเร็ง นอกจากนั้นการเกิดไขมันทรานส์ ยังเกิดได้จากการนำไขมันไม่อิ่มตัว ไปเติมไฮโดรเจนบางส่วน (partially hydrogenated) ในทางอุตสาหกรรม โดยต้องใช้ความดันและใช้สารแคตาไลสต์เข้าช่วย เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นไขมันไม่อิ่มตัว เปลี่ยนเป็นไขมันที่อิ่มตัว เพื่อจะได้ไม่เกิดการหืน (การเติมออกซิเจน) และให้น้ำมันอยู่ในรูปที่แข็งตัว ทำให้จำเป็นต้องผลิตภัณฑ์ได้สะดวก ไม่เหนียวเหนอะหนะ

1.1 ชนิดของน้ำมันมะพร้าว

น้ำมันมะพร้าว แบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ ตามกระบวนการผลิต (ณรงค์ โจมเจลา, 2548) ดังนี้

1.1.1 น้ำมันมะพร้าว RBD

สกัดได้จากเนื้อมะพร้าวห้าวโดยการบีบ หรือใช้ตัวทำละลายผ่านความร้อนสูง และกระบวนการทางเคมี RBD คือการทำให้บริสุทธิ์ (refining) ฟอกสี (bleaching) และกำจัดกลิ่น (deodorization) (Marina, Che Man & Amin, in press; ณรงค์ โจมเจลา, 2548; สลิตา อัฒนโน, 2548) หลังจากที่ได้สกัดได้ เพื่อให้เหมาะสำหรับการบริโภค ได้น้ำมันสีเหลืองอ่อนไม่มีกลิ่นและรส ปราศจากวิตามินอี (เพราะถูกขจัดออกไปโดยกระบวนการทางเคมี) มีปริมาณกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ไม่เกิน 0.1% วิธีการผลิตเริ่มจากการนำเนื้อมะพร้าวออกจากผลมะพร้าว ทำการตากแห้งหรืออบแห้งจากนั้นจึงบดขยี้เนื้อมะพร้าวแห้งให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วบีบน้ำมันออกด้วยเครื่องบีบแบบเกลียวอัด น้ำมันที่ได้มักจะมีเศษเนื้อมะพร้าวแห้งปะปนมาด้วย ต้องนำไปกรองเพื่อให้ได้น้ำมันมะพร้าวดิบสีน้ำตาลเข้มใสปราศจากเศษเจือปน สำหรับกากเนื้อมะพร้าวที่บีบน้ำมันออกแล้วจะถูกส่งขายเป็นอาหารสัตว์ สำหรับกระบวนการกลั่นน้ำมันให้บริสุทธิ์มี 2 วิธี คือ ทางเคมีและทางกายภาพ ถ้าเป็นทางเคมีจะใช้ด่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ทำปฏิกิริยากับกรดไขมันอิสระในปริมาณที่พอเหมาะ กับปริมาณกรดไขมันอิสระที่มีอยู่ จากนั้นจึงล้างสบู่และด่างที่เดิมมากเกินไปออกจนน้ำมันมีสภาพเป็นกลาง แต่วิธีนี้มีการสูญเสียน้ำมันสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อน้ำมันมะพร้าวดิบมีปริมาณกรดไขมันอิสระสูงจากนั้นจึงทำการฟอกสีและขจัดกลิ่นตามลำดับ ส่วนการทำให้

บริสุทธิ์ด้วยวิธีทางกายภาพ บางครั้งเรียกว่า การกลั่นให้บริสุทธิ์ เป็นกรรมวิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ทำได้โดยนำน้ำมันมะพร้าวดิบจากกระบวนการสกัด มาทำการกำจัดยางเหนียวด้วยกรดฟอสฟอริก ฟอกสีด้วยผงฟอกสีจากนั้นจึงส่งน้ำมันเข้าสู่กระบวนการกลั่นที่อุณหภูมิสูงและความดันต่ำกว่าบรรยากาศ เพื่อแยกกรดไขมัน กลิ่น และสีออก และกรองอีกครั้ง จึงได้น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่รอการจำหน่ายต่อไป โดยมะพร้าวผล 1 กก. จะให้เนื้อมะพร้าว 0.25 กก. ซึ่งคิดเป็นเนื้อมะพร้าวแห้ง 0.20 กก. เมื่อนำเนื้อมะพร้าวแห้ง 1 กก. มาผ่านกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวดิบจะให้ผลผลิตของน้ำมันมะพร้าวดิบเท่ากับ 0.55 กก. (ลลิตา อัคน โถ, 2548)

1.1.2 น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ (Virgin Coconut Oil) หรือ น้ำมันมะพร้าวบีบเย็น (cold pressed coconut oil)

โดยกระบวนการผลิตใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส ผลิตจากเนื้อมะพร้าวสดเป็นน้ำมันมะพร้าวที่บริสุทธิ์ที่สุด สีใสเหมือนน้ำ มีวิตามินอี และไม่ผ่านกระบวนการเติมออกซิเจน (oxidation) มีค่า peroxide และกรดไขมันอิสระต่ำมีกลิ่นมะพร้าวอย่างอ่อนๆ ถึงแรง (ขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิต) มีความชื้นไม่เกิน 0.1% เพื่อป้องกันการหืนของน้ำมันเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน เรียกน้ำมันมะพร้าวชนิดนี้ว่า น้ำมันมะพร้าวพรหมจรรย์ หรือน้ำมันมะพร้าวบีบเย็น คุณภาพสูงซึ่งจะมีลักษณะของกลิ่นและรสที่แตกต่างจากน้ำมันมะพร้าวซึ่งผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยสารเคมี กรรมวิธีผลิตน้ำมันมะพร้าวคุณภาพสูงในปัจจุบันมีรายละเอียดดังนี้

-Traditional hand pressed method เป็นวิธีการผลิตน้ำมันมะพร้าวในระดับครัวเรือนแบบดั้งเดิม การผลิตเริ่มต้นโดยบีบน้ำกะทิจากเนื้อมะพร้าวขูดที่เก็บเกี่ยวมาเป็นเวลาไม่เกิน 24 ชม. องค์ประกอบในน้ำกะทิประกอบด้วยน้ำมัน น้ำ โปรตีนและอื่นๆ จากนั้นหมักน้ำกะทิเป็นเวลา 24-48 ชม. น้ำมันจะแยกชั้นออกจากชั้นน้ำ ให้ความร้อนแก่น้ำมันเพื่อกำจัดความชื้นและกรอง ข้อเสียของวิธีการนี้ คือการผลิตจะเป็นในระดับกำลังการผลิตขนาดเล็ก ทำให้การควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้สม่ำเสมอเป็นไปได้ยาก

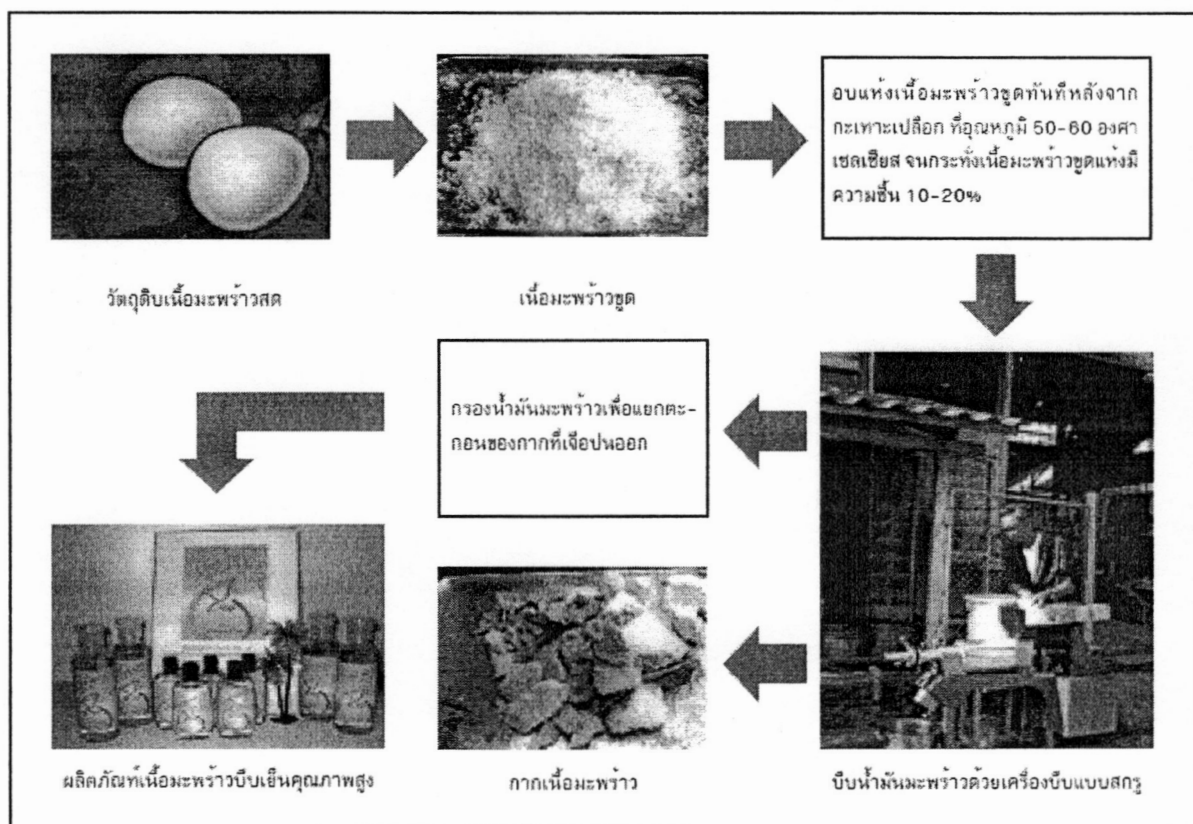
-Centrifuge process การผลิตน้ำมันมะพร้าวด้วยวิธีนี้จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสูงกว่าวิธีข้างต้น เนื่องจากไม่มีการให้ความร้อนแก่น้ำมันในขั้นตอนการผลิต หลักการ คือ นำน้ำกะทิมาเหวี่ยงแยกของแข็ง และน้ำออกจากชั้นน้ำมัน ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ คือ ชั้นน้ำมันที่อยู่ด้านบน วิธีการนี้จะมีค่าใช้จ่ายในการลงทุนสูง เนื่องจากต้องใช้อุปกรณ์เหวี่ยงแยก ซึ่งมีราคาแพง การแยกน้ำมันออกจากน้ำและองค์ประกอบอื่นๆ ในน้ำกะทิ นอกจากการหมัก และเหวี่ยงแยก ในข้อ 1 และ 2 แล้ว ยังสามารถใช้การต้ม การแช่เย็น และการใช้เอนไซม์ได้ด้วย

-Direct Micro Expeller (DME)-Fresh dry process เป็นการบีบน้ำมัน โดยเครื่องบีบแบบสกรู (screw type press) จากเนื้อมะพร้าวสดที่ผ่านการขูดและอบแห้ง เนื้อมะพร้าวขูดควรผ่านการ

อบแห้งใน 4 ชม. หลังจากกะเทาะเปลือก เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ซึ่งทำให้คุณภาพของน้ำมันมะพร้าวลดลง กรณีที่ใช้กระบวนการ low pressure oil extraction จะใช้เนื้อมะพร้าวหูดแห้งที่มีความชื้น 10-12% ทำให้น้ำมันมะพร้าวที่บีบได้มีองค์ประกอบของน้ำที่มาจากความชื้นในเนื้อมะพร้าวประมาณ 10% ของน้ำมันที่ผลิตได้ วางทิ้งไว้ให้น้ำมันและน้ำแยกชั้น โดยอาจใช้ความร้อนในการกำจัดปริมาณน้ำที่เหลืออยู่ ระยะเวลาดำเนินงานประมาณ 1.5 ชม./ครั้งในการผลิต, oil extraction efficiency (OEE) มากกว่า 85% ของปริมาณน้ำมันกรรมวิธีผลิตน้ำมันมะพร้าวบีบเย็น

คุณภาพสูงที่วิจัยพัฒนาและผลิตโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ด้วยการสนับสนุนจากองค์การอาหารแห่งสหประชาชาติ (FAO) เป็นวิธีการบีบน้ำมันโดยเครื่องบีบแบบ สกรู (Screw type press) จากเนื้อมะพร้าวสดที่ผ่านการหูดและอบแห้ง เนื้อมะพร้าวหูดจะผ่านการอบแห้งทันทีหลังจากกะเทาะเปลือก เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ซึ่งทำให้คุณภาพของน้ำมันมะพร้าวลดลง อุณหภูมิที่เหมาะสมในการอบเนื้อมะพร้าวหูด คือ 50-60 องศาเซลเซียส และจะใช้ระยะเวลาในการอบสั้น ซึ่งจะช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้น้ำมันมีสีเหลืองเนื้อมะพร้าวหลังอบแห้งจะมีความชื้น 10-20% จุดสำคัญของขั้นตอนการผลิตน้ำมันมะพร้าวด้วยวิธีการนี้คือ อุณหภูมิในการอบ และปริมาณความชื้นของเนื้อมะพร้าวหลังอบเมื่อนำเนื้อมะพร้าวหูด 1 กก. มาผ่านกระบวนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบีบเย็นด้วยวิธีการข้างต้น จะให้ผลผลิตของน้ำมันมะพร้าวเท่ากับ 0.17 กก.

ขั้นตอนการผลิต



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการผลิตน้ำมันมะพร้าวบีบเย็นด้วยเครื่องบีบแบบสกรู (ลลิตา อัดนโ, 2548)

ขั้นตอนที่สำคัญของการผลิต คือ

1. การเตรียมวัตถุดิบ
2. การอบแห้ง
3. การบีบสกัดน้ำมัน
4. การกรอง

กระบวนการผลิตทุกขั้นตอนจะมีผลต่อคุณภาพของน้ำมันมะพร้าวที่ผลิตได้ ไม่ว่าจะเป็นการเตรียมวัตถุดิบ เวลา ปริมาณความชื้นของเนื้อมะพร้าวแห้งก่อนเข้าขั้นตอนการบีบน้ำมัน ดังนั้นการควบคุมคุณภาพของน้ำมันมะพร้าวจึงต้องควบคุมขั้นตอนการผลิตทั้งหมด โดยหลักการที่สำคัญของการผลิตน้ำมันมะพร้าวบีบเย็นคุณภาพสูง คือขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ โดยใช้เนื้อมะพร้าวสดที่มีคุณภาพเป็นวัตถุดิบเริ่มต้น โดยจะต้องเข้าขั้นตอนการอบที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียสทันที

หลังจากกะเทาะเปลือกจนได้เนื้อมะพร้าวแห้งที่มีความชื้นอยู่ในช่วง 10-20% โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นความชื้นที่เหมาะสมสำหรับการสกัดน้ำมันด้วยเครื่องบีบแบบสกรู

2. องค์ประกอบของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์

น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ประกอบไปด้วยองค์ประกอบที่สำคัญ ดังนี้

2.1 กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids) น้ำมันมะพร้าวอุดมไปด้วยกรดไขมันขนาดกลาง (medium chain fatty acids หรือ MCFA) ที่ดีต่อระบบการย่อยอาหาร (Marina, Che-Man, Nazimah & Amin, 2009) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่อิ่มตัวกว่า 90% อะตอมของธาตุคาร์บอนของกรดไขมันที่อิ่มตัวจะต่อกันเป็นเส้น (chain) โดยมีพันธะเดี่ยว (single bond) จับกันเองเป็นเส้นยาวตามจำนวนของคาร์บอน กรดไขมันอิ่มตัวในน้ำมันมะพร้าวส่วนใหญ่ มีจำนวนอะตอมของคาร์บอน 8 – 14 ตัว กรดไขมันที่สำคัญได้แก่ caprylic acid: C8, capric acid: C10, lauric acid: C12 และ myristic acid: C14 ซึ่งการศึกษาของ Marina (2009) ได้ทำการศึกษาปริมาณของกรดไขมันที่มีในน้ำมันมะพร้าว โดยทำการทดสอบด้วย gas chromatography พบกรดไขมันที่มี Carbon atom ตั้งแต่ C6-C18 ซึ่งส่วนมากเป็น medium chain fatty acids (C8-C14) มากกว่า 75% ซึ่งตัวอย่าง virgin coconut oil ที่นำมาทดลองจำหน่ายในประเทศมาเลเซียและอินโดนีเซีย เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เป็นน้ำมันมะพร้าว RBD (RBDCO) ซึ่งนักวิจัยได้ทำการผลิตขึ้นเองตามกระบวนการทางอุตสาหกรรม พบว่า lauric acid มีปริมาณมากที่สุดถึง 47% รองลงมาคือ myristic acid ปริมาณ 18% และพบกรดไขมันอื่นๆ ที่มีคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 6-18 อะตอม มีสัดส่วนโดยประมาณดังนี้ caprylic acid 8%, capric acid 6%, palmitic 9%, stearic acid 3%, oleic 5% และ linoleic 1%

2.2 ไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) แต่มีเพียง 9% ซึ่งแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acid) คือ กรดไขมันที่มีอะตอมของคาร์บอน 1 ตัว ไม่มีไฮโดรเจน 2 ตัวมาจับ จึงต้องจับคู่กันเองด้วยพันธะคู่ (double bond) จึงเป็น กรดไขมันที่มีพันธะคู่เพียงหนึ่งคู่ กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid) คือ กรดไขมันที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 คู่ ส่วนใหญ่กรดไขมันไม่อิ่มตัวจะมีจำนวนอะตอมของคาร์บอนมาก จึงทำให้โมเลกุลมีความยาวมาก เช่น oleic acid (C18:1) และ linoleic acid (C18:2) กรดไขมันทั้งสองชนิดมีปริมาณรวมกันประมาณ 6-8%

2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) แม้ว่าน้ำมันมะพร้าวจะมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวในปริมาณที่ไม่มากนัก แต่ก็สามารถเกิดการเติมออกซิเจน (oxidation) และเกิดกลิ่นหืนได้ แต่จากการทดลองวางน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลาไม่นาน ไม่เกิดการหืนเกิดขึ้น

สันนิษฐานว่า น้ำมันมะพร้าวมี antioxidant ช่วยในการต่อต้านการเกิดออกซิเจน (oxidation) ของ ส่วนไขมันที่ไม่อิ่มตัว จึงมีผู้ได้ทำการศึกษาค้นคว้าพบ antioxidant ใน น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ดังนี้

2.3.1 วิตามินอี (vitamin E) น้ำมันมะพร้าว ที่ผลิตจากมะพร้าวแห้งที่เก็บไว้นาน ๆ จะมี จุลินทรีย์ปนเปื้อน ตลอดจนถูกแสงแดดและความร้อน เมื่อนำไปสกัดน้ำมันมะพร้าวโดยวิธีหีบหรือ การใช้ตัวทำละลาย จึงสูญเสียคุณสมบัติที่ดี โดยเฉพาะสิ่งที่ทำให้มันไม่หืน และเมื่อถูกนำไปผ่าน กระบวนการทางเคมี RBD ก่อนที่จะนำไปบริโภคจะสูญเสียวิตามินอีไป แต่ก็ยังเป็นน้ำมันที่ดีต่อ สุขภาพ ทรานส์ไขมันไม่ได้ถูกเปลี่ยนแปลงทางเคมีโดยกระบวนการเติมไฮโดรเจนหรือเติมสารกันเสีย (preservatives) เพื่อรักษาสภาพให้คงทนและไม่หืน แต่ Virgin Coconut Oil ซึ่งสกัดได้โดยวิธีหมัก หรือวิธีบีบเย็น ไม่ใช้อุณหภูมิสูง และไม่ผ่านกระบวนการทางเคมี จะยังคงมีวิตามินอีเหลืออยู่ และก็เป็นอีกสิ่งหนึ่งที่ทำให้ น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์โดดเด่นกว่าน้ำมันพืชชนิดอื่น ๆ วิตามินอี ทำหน้าที่ เป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยการป้องกันเซลล์ไม่ให้ถูกเติมออกซิเจน และเป็นตัว ต่อต้านอนุมูลอิสระ (free radicals) ซึ่งเกิดจากมลพิษในสิ่งแวดล้อม อาหารและเครื่องดื่ม การสูบบุหรี่ รังสี ความเครียด ฯลฯ โดยปกติร่างกายของมนุษย์มีสารต่อต้านอนุมูลอิสระคอยทำลายอนุมูล อิสระอยู่แล้ว แต่เมื่อบริโภคน้ำมันพืชประเภทไม่อิ่มตัวซึ่งถูกเติมออกซิเจน(oxidized) ได้ง่าย ๆ ตั้งแต่เริ่มสกัด ตลอดจนระหว่างกระบวนการขนส่ง การวางจำหน่าย และการเก็บรักษาก่อนบริโภคจึงเกิดเป็น อนุมูลอิสระได้ง่าย อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะไปปลงล้างประสิทธิภาพ (neutralize) ของสารต้าน อนุมูลอิสระที่มีอยู่ในร่างกาย ทำให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดผลเสียแก่เซลล์และเนื้อเยื่อ เนื่องจาก อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่เปลี่ยนสภาพโดยสูญเสียอิเล็กตรอน (electron) จึงไปจับกับโมเลกุลที่อยู่ ใกล้เคียงต่อไปเรื่อย ๆ เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ เป็นผลทำให้เซลล์ผิดปกติไป เช่น เยื่อเซลล์ฉีกขาด เปลี่ยนสารพันธุกรรมในนิวเคลียส เกิดการกลายพันธุ์ ทำให้เกิดโรคที่เกี่ยวกับความเสื่อม (degenerative diseases) เช่น โรคหัวใจ มะเร็ง ไขข้ออักเสบ เบาหวาน โรคภูมิแพ้ ฆราภาพก่อนวัย เป็นต้น มีรายงานว่า น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มีวิตามินอีในรูปของ tocopherol (1.1 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม) และ tocotrienol (3.1 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม) สำหรับ tocopherol เป็น alpha tocopherol 0.5 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และ delta tocotrienol 0.6 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และ gamma tocotrienol 2.0 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (ณรงค์ โฉมเฉลา, 2552) เป็นที่ทราบกันดีว่าวิตามินอีเป็น antioxidant ที่มี ประสิทธิภาพสูงโดยเฉพาะ tocotrienol มีประสิทธิภาพสูงกว่า tocopherol

2.3.2 สารฟีนอล (Phenolic compounds) : Virgin Coconut Oil มีสารฟีนอล (phenolic compound) ในรูปของกรดแกลลิก (galic acid) (ณรงค์ โฉมเฉลา, 2009) Seneviratne, Hapuarachchi and Dissanayake (2009) ได้รายงานว่าน้ำมันมะพร้าว มีสารฟีนอลซึ่งประกอบด้วย caffeic acid, p-

coumaric acid, ferulic acid และ catechin ยังพบอีกว่า Virgin Coconut Oil ที่สกัดโดยวิธีสกัดเย็นมี สารฟีนอลอยู่ $618 \pm 46 \text{ mg/Kg}$ ซึ่งมากกว่าวิธีทางอุตสาหกรรม (RBD) ถึง 7 เท่า

2.3.3 สารไฟโตสเตอรอล (Phytosterols) : Virgin Coconut Oil มีสารไฟโตสเตอรอลอยู่ 400-1200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ประกอบด้วย campesterol, stigmasterol, beta-sitosterol และ delta-5-avenasterol

3. รายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

3.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม มีการจัดเรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยว เป็นคู่หรืออยู่เป็นกลุ่มสี่เชลล์ติดกัน หรืออาจพบเรียงต่อกัน 3-4 เชลล์ เป็นโซ่สั้นๆ หรือเป็นกลุ่มคล้ายพวงอุ้งน ไม่สร้างสปอร์ และไม่เคลื่อนที่ สร้างเอนไซม์ catalase และ coagulase ได้ ลักษณะโคโลนีเมื่อเจริญบนอาหารแข็งจะมีลักษณะกลม ผิวเรียบ เป็นมัน โคโลนีมีสีเหลืองจนถึงสีขาวครีม ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี และสามารถมีชีวิตรอดได้เป็นสัปดาห์ในหนองหรือเสมหะแห้ง *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางด้านการแพทย์มากเนื่องจากสามารถก่อให้เกิดโรคทางผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อนทำให้เกิดการติดเชื้อภายในหลอดเลือดและอวัยวะภายในของร่างกายได้ (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537)

3.1.1 ปัจจัยที่ทำให้เกิดโรค (Virulence factor)

กลไกการก่อโรคของเชื้อที่สำคัญ เกิดจากการที่เชื้อเข้าบุกรุกและทำลายเนื้อเยื่อที่บุกรุกได้โดยตรง และจากการสร้างสารคัดหลั่งหลายชนิด เช่น เอนไซม์ และสารพิษชนิดต่างๆ นอกจากนี้ ยังรวมถึงองค์ประกอบของเซลล์ของเชื้อด้วย ปัจจัยในการก่อโรคของเชื้อ *S. aureus* แบ่งเป็นดังต่อไปนี้

- โครงสร้างที่ผิวเซลล์ ส่วนประกอบที่ผิวเซลล์มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคและต่อต้านระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย แคปซูลมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเคลื่อนตัวเข้าหาและการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว ทำให้เชื้อแพร่กระจายในเนื้อเยื่อได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังช่วยในการเกาะติดกับเครื่องมือทางการแพทย์ เช่น สายสวน เป็นต้น เป็นผลทำให้เชื้อสามารถรวมกลุ่มกัน และเจริญเพิ่มจำนวนซึ่งทำให้สามารถก่อให้เกิดโรคได้ที่ตำแหน่งดังกล่าวและยังทำให้ทนต่อยาต้านแบคทีเรียได้อีกด้วย กรดไทโคอิก (teichoic acid) มีส่วนช่วยให้เชื้อเข้าเกาะติดกับผิวของเนื้อเยื่อได้ดี โปรตีน เอ (protein A) จะสามารถจับกับส่วน Fc portion ของแอนติบอดีชนิด IgG ได้ มีผลทำให้ยับยั้งขบวนการ opsonization ขบวนการ phagocytosis และสามารถยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ เป็นต้น

-เอนไซม์ เชื้อ *S. aureus* จัดเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงชนิดหนึ่งซึ่งสิ่งที่มีบทบาทในการก่อโรคของเชื่อดังกล่าวนั้น เกิดจากการที่เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดโรคได้หลายชนิด ดังนี้

Coagulase เป็นเอนไซม์ที่ทำให้พลาสมาเกิดการแข็งตัว โดยเอนไซม์ดังกล่าวจะกระตุ้นให้เปลี่ยนเส้นใยไฟบริโนเจนไปเป็นไฟбрิน ซึ่งสามารถเกาะกับผิวเซลล์ของเชื้อและทำให้เชื้อเกิดการรวมกลุ่มกัน มีผลช่วยป้องกันเชื้อจากขบวนการ phagocytosis การสะสมของไฟบรินมีส่วนทำให้เกิดผนังล้อมรอบบริเวณที่ติดเชื้อเกิดเป็นฝีหนองได้

Catalase เอนไซม์ดังกล่าวมีฤทธิ์ในการสลาย hydrogen peroxide ให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจน เพื่อปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากการถูกทำลายในเซลล์เม็ดเลือดขาว

Hyaluronidase เป็นเอนไซม์ที่มีการสลายกรด hyaluronic ที่พบเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน มีผลทำให้เชื้อสามารถแพร่กระจายก่อให้เกิดการติดเชื้อลุกลามในชั้นเนื้อเยื่อได้

Lipase เอนไซม์ดังกล่าวสามารถสลายไขมันได้ จึงมีบทบาทสำคัญในการติดเชื้อในชั้นผิวหนังและใต้ผิวหนังที่ประกอบไปด้วยต่อมไขมันและเนื้อเยื่อไขมัน

-สารพิษ (toxin) สารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นนั้นนับว่ามีความเป็นอันตรายเป็นอย่างมากโดยมีบทบาททำให้ความรุนแรงในการดำเนินโรคสูงมากยิ่งขึ้น สำหรับสารพิษที่เชื้อ *S. aureus* สร้างได้นั้นมีดังต่อไปนี้

Cytotoxin เป็นกลุ่มของสารพิษที่ออกฤทธิ์ทำลายเซลล์ ซึ่งบางครั้งอาจเรียกว่า ฮีโมไลซิน (hemolysin) เนื่องจากสารพิษบางชนิดมีความสามารถที่จะสลายเม็ดเลือดแดงได้ โดยที่สารพิษฮีโมไลซินสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ชนิด ได้แก่ แอลฟาฮีโมไลซิน เบต้าฮีโมไลซิน เดลต้าฮีโมไลซิน และแกมมาฮีโมไลซิน

Exfoliative toxin สารพิษดังกล่าวมีผลทำให้เกิดโรคที่มีการหลุดลอกของผิวหนังที่เรียกว่า staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS) โดยสารพิษชนิดนี้จะทำการย่อยสลายเซลล์ที่เกาะติดกันระหว่างเซลล์ของชั้นผิวหนังกำพืด จึงมีผลทำให้ผิวหนังหลุดลอก แต่ไม่ทำให้เกิดการอักเสบหรือไม่ทำให้เซลล์ตาย ส่วนใหญ่มักพบโรคนี้ในทารกหรือเด็กเล็ก โดยหลังจากมีการติดเชื้อร่างกายสามารถสร้างแอนติบอดีต่อสารพิษที่มีคุณสมบัติในการป้องกันการติดเชื้อซ้ำได้

Toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) เป็นสารพิษที่ทำให้เกิดอาการไข้และช็อก สารพิษจะสามารถกระจายเข้าสู่กระแสเลือดและก่อให้เกิดอาการตามระบบต่างๆ ของร่างกายได้ ผู้ป่วยจะมีอาการไข้สูง หนาวสั่น มีผื่นขึ้นตามผิวหนัง ความดันเลือดลดต่ำลงเนื่องจากการสูญเสียสารน้ำออก นอกกระบบไหลเวียนเลือดจนเกิดภาวะ hypovolemic shock ส่งผลทำให้การทำงานของอวัยวะต่างๆ ล้มเหลว และเสียชีวิตได้ในที่สุด

Enterotoxin เป็นสารพิษที่มีความสามารถในการทนทานต่อกรดและน้ำย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้ ทำให้ผู้ป่วยเกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยจะมีอาการท้องร่วงอย่างรุนแรง และ มีการอาเจียนร่วมด้วย (ภัทรชัย กิริติสิน, 2549)

3.2 *Bacillus cereus*

B. cereus เป็นแบคทีเรียรูปท่อนขนาดใหญ่ที่สร้างสปอร์ได้ ดิจีสแกรมบวก เคลื่อนที่ได้ ดำรงชีวิตเป็นแซโรไฟต์ พบอยู่ในดิน น้ำ พืชผักต่างๆ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2547) โคโลนีมีลักษณะกลมแบนราบ แห้ง ผิวขรุขระ สีขาวครีม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-5 มิลลิเมตร (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537) *B. cereus* ก่อโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) พบว่ามีการระบาดเป็นครั้งคราว เนื่องจากมีการรับประทานอาหารประเภทข้าวผัดที่มีการปรุงเสร็จแล้วรอการจำหน่าย หรือรอที่จะรับประทานเป็นระยะเวลานาน (อิสยา จันทรวิทย์ยานุชิต และวัชรินทร์ รังษิภานุรัตน์, 2551) *B. cereus* ทำให้เกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษ 2 แบบ คือ แบบที่มีอาการอาเจียนและแบบท้องร่วง (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2547) แบบที่มีอาการอาเจียน (emetic form) เกี่ยวข้องกับการกินอาหารจำพวกข้าวที่มีเชื้อปนเปื้อน ระยะฟักตัวของเชื้อกินเวลา 1-6 ชั่วโมง หลังจากกินเอนเทอโรทอกซินเข้าไปคนไข้จะมีอาการของโรคอยู่เพียงระยะเวลานั้นๆ เท่านั้น (น้อยกว่า 24 ชั่วโมง) อาการที่สำคัญคือ อาเจียน คลื่นไส้ ปวดท้อง แต่จะไม่มีไข้และท้องร่วง (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2547) อีกแบบหนึ่งคือ แบบอุจจาระร่วง (diarrheal form) มีระยะการฟักตัวยาวนานกว่า 10-12 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการปวดท้อง อุจจาระร่วงเป็นน้ำ (อิสยา จันทรวิทย์ยานุชิต และวัชรินทร์ รังษิภานุรัตน์, 2551)

3.3 *Bacillus subtilis*

B. subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน เคลื่อนที่ได้ สร้างสปอร์และเจริญในสภาพที่มีออกซิเจน (Kunkel, 2007) สร้างเอนโดสปอร์รูปไข่อยู่ตรงกลางหรือก่อนไปทางปลายเซลล์และเอนโดสปอร์ทำให้เซลล์บวม (ภัทรชัย กิริติสิน, 2549) *B. subtilis* เป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมจะพบได้ทั่วไปในดินและอินทรีย์วัตถุที่เน่าสลาย ซึ่ง *B. subtilis* สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในตา (Kunkel, 2007) ปอดบวมชนิดรุนแรง ติดเชื้อในกระแสเลือด ติดเชื้อของบาดแผลผ่าตัดและโรคท้องร่วง (ภัทรชัย กิริติสิน, 2549) *B. subtilis* ทำให้ขนมปังเสียโดยขนมปังเกิดเมือก (บุษกร อุดรชาติ, 2545) และยังปนเปื้อนอยู่ในนมพลาสเจอร์ไรซ์ได้ รวมทั้งพบในอาหารกระด้าที่บรรจุกระป๋องที่ผลิตในครัวเรือนที่ผ่านความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส (สุมาลี เหลืองสุนทร, 2539)

3.4 *Escherichia coli*

เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญเนื่องจากก่อโรคได้ ไม่ว่าจะอยู่ในลำไส้หรืออวัยวะอื่นๆ ของมนุษย์และยังมีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ *E. coli* ส่วนใหญ่จัดเป็นแบคทีเรีย

ประจำถิ่นในลำไส้ของมนุษย์ซึ่งไม่ก่อโทษ แต่มีเพียง *E. coli* บางสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงได้ *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน เซลล์มีขนาด 1.1-1.5 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 2.0-6.0 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้รวดเร็วด้วย peritrichous flagella และมีบางชนิดไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากนอกลำไส้สามารถสร้างแคปซูลได้ *E. coli* เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ ไปที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารที่แสดงความแตกต่าง (differential media) เช่น MacConkey agar ส่วนมากจะให้โคโลนีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร โคโลนีขนาดใหญ่และมีสีชมพูแดง เนื่องจากเฟอร์เมนต์น้ำตาลแล็กโทสได้ กรดที่เกิดจากการเฟอร์เมนต์น้ำตาลจะทำให้สีของอินดิเคเตอร์ในอาหารเปลี่ยนไปจากเดิม โดยบางสายพันธุ์ไม่สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาลแล็กโตสได้จึงให้ลักษณะโคโลนีที่ไม่มีสี หรือเลี้ยงในอาหาร Eosin methylene blue agar (EMB) และ Endo agar โคโลนีมีสีมันวาวคล้ายโลหะ มีบางสายพันธุ์ที่เฟอร์เมนต์แล็กโทสได้ช้า ถ้าเลี้ยงบนอาหารผสมเลือด บางสายพันธุ์เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบปิตาฮิโมไลซิส เชื้อนี้เจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง (15-45 องศาเซลเซียส) บางสายพันธุ์ทนความร้อน 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หรือ 55 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

E. coli พบแพร่กระจายทั่วไปทั้งในดิน น้ำและลำไส้ของมนุษย์และสัตว์โดยไม่ทำให้เกิดโรค มีบางสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในมนุษย์

3.4.1 ชนิดของ *E. coli* ที่ก่อโรคอุจจาระร่วง จำแนกได้เป็น 5 กลุ่ม ได้แก่

-Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงในเด็กแรกเกิด พบว่ามีการทำลาย microvilli ของลำไส้ ซึ่งจะเกิดขึ้นหลังจากที่แบคทีเรียไปเกาะเซลล์เยื่อบุลำไส้ และมีการยื่นส่วนของเซลล์ออกมาล้อมรอบแบคทีเรีย โดยไม่พบร่องรอยของการแทรกผ่านเข้าไปในลำไส้ ลักษณะอาการของโรคคือ มีไข้ คลื่นไส้ อาเจียน และอุจจาระเป็นมูก

-Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงในผู้ป่วยทุกกลุ่มอายุ แต่จะพบมากในผู้ป่วยอายุต่ำกว่า 5 ปี และผู้ที่ต้องเดินทางอยู่เสมอ การเกิดโรคเกิดจากเชื้อจะเข้าไปเกาะที่บริเวณผนังลำไส้เล็กแล้ว สร้างสารพิษ enterotoxin ออกมาทำลายเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ สารพิษที่สำคัญต่อการเกิดโรคมี 2 ชนิดคือ Heat-labile enterotoxin ถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสและ Heat-stable enterotoxin ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ลักษณะอาการของโรคคือ มีไข้ต่ำ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดเกร็งในช่องท้องและถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ จึงทำให้ผู้ป่วยเสียน้ำมาก

-Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วงในผู้ป่วยทุกกลุ่มอายุ เช่นเดียวกับ ETEC การเกิดโรคเกิดจากการที่เชื้อเข้าไปและเพิ่มจำนวนที่ epithelial cell ของ

ผนังลำไส้ใหญ่ทำให้เซลล์ถูกทำลาย ผู้ป่วยมีอาการคล้ายโรคบิดที่เกิดจาก *Shigella* ลักษณะอาการของโรคคือ มีไข้สูง ถ่ายอุจจาระเป็นมูกเลือดและตรวจพบเม็ดเลือดขาวจำนวนมาก

-Enteraggative *E. coli* (EAEC) สร้าง heat stable toxin และ hemolysin ซึ่งมีความสำคัญในการก่อโรคในทางเดินปัสสาวะ hemolysin จะไปทำลายเม็ดเลือดแดงและเซลล์อื่นๆ ทำให้เซลล์หลั่ง cytokine และกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ อาการอุจจาระร่วงที่เกิดจากเชื้อ EAEC จะถ่ายเป็นน้ำและอาเจียน

-Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) โดยทั่วไปพบเชื้อ EHEC อยู่ในลำไส้ของสัตว์บางชนิด เช่น วัว ซึ่งในโรงฆ่าสัตว์บางแห่ง อาจไม่รักษาความสะอาดอย่างเพียงพอ อาจทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อนี้ไปสู่ผู้บริโภคได้ เชื้อนี้ติดต่อกันจากการกินอาหารและน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ จากรายงานส่วนใหญ่ พบว่าการแพร่กระจายของโรค เกิดจากการกินเนื้อวัวบดที่ไม่ได้ทำให้สุกดีเสียก่อน เชื้อกลุ่ม EHEC สามารถสร้างสารพิษได้อย่างน้อย 2 ชนิดคือ shiga-like toxin 1 (verotoxin 1) และ shiga-like toxin 2 (verotoxin 2) ซึ่งเป็นสารพิษที่มีลักษณะคล้ายกับสารพิษของเชื้อบิดไม่มีตัว (*Shigella dysenteriae*) ลักษณะอาการของโรคคือ อาการปวดท้อง บางรายมีอาการปวดท้องอย่างแรง (severe cramping) อาจมีการอาเจียน มีไข้ต่ำๆ หรือ ไม่มีไข้ มีอาการอุจจาระร่วง ซึ่งในระยะแรกจะถ่ายเป็นน้ำ ถ้ามีอาการมากขึ้นจะมีเลือดปนออกมากับอุจจาระ แต่ในผู้ป่วยบางราย อาจไม่แสดงอาการเลยก็ได้ ในผู้ป่วยที่เป็นผู้ใหญ่อาการมักหายได้เองภายใน 5-8 วัน แต่มีรายงานว่าผู้ป่วยประมาณ 2-7% อาการรุนแรงขึ้นและอาจเกิด hemorrhagic colitis คือภาวะที่มีเลือดออกในลำไส้และ hemolytic uremic syndrome (HUS) ซึ่งเป็นโรคแทรกซ้อนที่สำคัญได้ ลักษณะของ HUS คือเกิดภาวะโลหิตจาง แกร็ดเลือดต่ำและเกิดไตวายเฉียบพลัน ผู้ป่วยที่เกิด HUS จะมีอัตราการตายประมาณ 3-10% (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2547)

ในปัจจุบันพบว่าเชื้อ *E. coli* มากกว่า 50 serotype ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ EHEC (shiga-like toxin) เช่น serotype O157:H7, O26:H11, O111:H8 และ O113:H21 เป็นต้น แต่เนื่องจาก serotype O157:H7 เป็น serotype ที่พบได้บ่อยและเป็นปัญหาทางสาธารณสุขมาก *E. coli* serotype O157:H7 เป็นเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์หนึ่งที่มีรายงานว่าทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงได้ ด้วยย่อ "O" มาจากคำภาษาเยอรมันคือ "Ohne" หมายถึง somatic antigen หรือแอนติเจนที่อยู่บนผนังเซลล์ของเชื้อ ส่วน "H" มาจากภาษาเยอรมันว่า "Hauch" หมายถึง Flagella antigen หรือแอนติเจนที่พบที่ flagella การจัดลำดับหรือการจำแนกชนิดของแอนติเจนนี้ทำได้ โดยการทำให้ปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะ จึงเรียกการจำแนกชนิดของแอนติเจนด้วยวิธีนี้ว่า serotyping

3.5 *Salmonella* spp.

เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่มีความรุนแรง นอกจากเป็นสาเหตุให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษระดับสูงเป็นอันดับหนึ่งของประเทศสหรัฐอเมริกา อังกฤษ และอีกหลายประเทศยังทำให้ประชากรเสียชีวิตสูงที่สุด แบคทีเรียกลุ่มนี้อยู่ในตระกูลของเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Family Enterobacteriaceae) เช่นเดียวกันกับแบคทีเรียพวกโคลิฟอร์มและ *E. coli* ดังนั้น จึงคาดได้ว่า *Salmonella* จะมีรูปร่างเป็นท่อนสั้น แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ชอบอุณหภูมิปานกลางแม้ว่าที่ 37 องศาเซลเซียส จะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม แต่ที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่นิยมใช้บ่มเพาะเชื้อในขั้นซีเลกทีฟเอนริชเมนต์ (Selective Enrichment) เพราะอุณหภูมินี้ *Salmonella* เจริญแข่งขันกับเชื้ออื่นๆ ได้ดีกว่า คนและสัตว์เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติแหล่งแรก (primary habitat) ของเชื้อซัลโมเนลลา การเกิดโรคอาหารเป็นพิษสืบเนื่องมาจากการบริโภคอาหารหรือน้ำดื่มที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนผ่านทางอาหาร

ได้มีการปรับปรุงวิธีการจำแนก *Salmonella* ครั้งใหญ่เมื่อไม่นานมานี้ ในอดีตการจำแนก *Salmonella* อาศัยชนิดของซีโรวาร์ (serovars) ที่ได้จากการทดสอบปฏิกิริยาทางซีโรวิทยา (Serology) คือปฏิกิริยาการตกตะกอนของโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียที่ผิว (somatic) และที่แส (flagellar cells) ซึ่งมีความสัมพันธ์กันเป็นตัวกำหนดสปีชี แต่หลังจากเทคนิคอื่นที่ใช้จีนส์เป็นตัวทดสอบที่เรียกว่า DNA-DNA hybridization และ Multilocus Enzyme Electrophoresis (MEE) typing ประสบความสำเร็จทำให้ *Salmonella* ทั้งหมดถูกนำมาจัดใหม่เป็น 2 สปีชี คือ *Salmonella enteric* และ *Salmonella bongori* แต่ละสปีชีจำแนกออกเป็นอีกหลายสปีชีย่อย (subspecies) เชื้อ *Salmonella* กว่า 2,000 ซีโรวาร์ถูกนำมาจัดอยู่ในสปีชี *Salmonella enteric* ซึ่งจำแนกย่อยออกเป็น 5 กลุ่มหรือ subspecies ดังนี้

Group II : *S. enteric subsp. salamae*

Group III a : *S. enteric subsp. arizonae*

Group III b : *S. enteric subsp. diarizonae*

Group IV : *S. enteric subsp. houtenae*

Group VI : *S. enteric subsp. indica*

แบคทีเรียกลุ่ม V เดิมถูกยกฐานะขึ้นเป็นสปีชี คือ *Salmonella bongori* การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนำไปสู่พัฒนาการของวิธีการเขียนชื่อแบคทีเรียใหม่ กล่าวคือเดิมเคยเขียนว่า *Salmonella typhimurium* ต่อไปนี้จะต้องเขียนว่า *Salmonella enteric serovar Typhimurium* (หรือเขียนย่อว่า *Salmonella Typhimurium*) โดยชื่อจันส์ใช้ตัวเอน ส่วนชื่อสปีชีย่อยใช้ตัวธรรมดาและตัวอักษรแรกให้เป็นตัวพิมพ์ใหญ่ หรือเขียนย่อว่า *S. Typhimurium*

Salmonella ในทางระบาดวิทยาสามารถจำแนกได้ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

-*Salmonella* ที่อาศัยคนเป็นโฮสต์เพียงอย่างเดียว ประกอบไปด้วย *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi C* เป็นชนิดที่ทำให้เกิดโรคไทฟอยด์และไข้รากสาดน้อยจัดเป็นเชื้อซัลโมเนลลาที่มีความรุนแรงมากที่สุด จะมีอัตราการตายสูงสุดในบรรดา *Salmonella* ทั้งหมด เชื้อไข้ไทฟอยด์ใช้ระยะเวลาฟักตัวนานที่สุด ผู้ป่วยมักมีไข้ขึ้นสูงมาก อาจแยก *S. Typhi* ได้จากเลือดและอุจจาระ และ/หรือ ปัสสาวะของผู้ป่วยได้ก่อนและหลังอาการไข้ขึ้นสูง ส่วนไข้รากสาดน้อยมีอาการรุนแรงน้อยกว่าไทฟอยด์

-*Salmonella* ที่ปรับตัวตามโฮสต์ (สามารถทำให้เกิดโรคกับคนโดยผ่านทางอาหาร) ประกอบด้วย *S. Enteritidis* สายพันธุ์ PT4, *S. Pullorum* และ *S. Gallinarum* อาศัยเปิด ไข่เป็นโฮสต์ประจำ *S. Dublin* อาศัยวัวเป็นโฮสต์ประจำ *S. Abortus-equi* อาศัยม้าเป็นโฮสต์ประจำ *S. Abortusovis* อาศัยแกะเป็นโฮสต์ประจำ และ *S. Choleraesuis* อาศัยห่านเป็นโฮสต์ประจำ

-*Salmonella* ที่มาจำกัดโฮสต์ ได้แก่ *Salmonella* ส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดโรคกับคนและสัตว์ ประกอบด้วยเชื้อซัลโมเนลลาที่เหลือทั้งหมดซึ่งทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ

การจำแนก *Salmonella* โดยอาศัยเทคนิคทางซีโรวิทยา อาศัยสมบัติของโปรตีนที่มีความจำเพาะตามลักษณะทางพันธุกรรมที่ประยุกต์มาใช้ทดสอบสปีชีของเชื้อแบคทีเรีย สำหรับ *Salmonella* นั้น ในขั้นแรกจะทำการทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองต่อชนิดของโปรตีนที่ผิวเซลล์ เรียกว่า somatic antigens (O-antigens) ก่อน โดยจำแนกซีโรวาร์ออกเป็นกลุ่มๆ ตามตัวอักษรอังกฤษ ตัวพิมพ์ใหญ่ เช่น A, B, C เรื่อยไป ตัวอย่างเช่น *Salmonella* ที่มี O-antigens 6 และ 7 ได้รับการจัดไว้ในกลุ่ม C₁ ในขั้นที่สองเป็นการทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองต่อชนิดของโปรตีนที่หนวดหรือแหของแบคทีเรียเรียกว่า flagellar antigens (H-antigens) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ เฟส 1 หรือเฟสจำเพาะ (specific phase) และเฟส 2 หรือเฟสกลุ่ม (group phase) เฟส 1 ประกอบด้วย *Salmonella* ไม่ก่ีสปีชี *Salmonella* ส่วนใหญ่จัดอยู่ในเฟส 2 ท *Salmonella* หนึ่งๆ อาจมี H-antigens ตกอยู่ในเฟสใดเฟสหนึ่งเพียงเฟสเดียว หรือตกอยู่ทั้งสองเฟสก็ได้ เฟส 1 ใช้สัญลักษณ์เป็นตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวเล็ก ส่วนเฟส 2 ใช้ตัวเลขอารบิก ตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์แอนติเจนของ *S. Choleraesuis* ปรากฏผลเป็น 6, 7, c, 1, 5 เลข 6, 7 เป็นตัวแทนของ O-antigens gr. C₁ ตัวอักษร c แทน H-antigens เฟส 1 และเลข 1, 5 แทน H-antigens เฟส 2

ชื่อของ *Salmonella* เป็นข้อตกลงระหว่างประเทศ ซีโรวาร์ที่บ่งถึงสปีชีถูกตั้งชื่อขึ้นตามสถานที่ที่แยกเชื้อนั้น ได้เป็นครั้งแรก เช่น *S. London*, *S. Miami*, *S. Richmond*, *S. Muenchen*, *S. Bangkok* และ *S. Rachaburi* เป็นต้น ก่อนหน้านี้ ได้มีการตั้งชื่อ *Salmonella* หลายแบบ ตัวอย่างเช่น *S. Typhimurium* ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์ในหนูทดลอง แหล่งที่อยู่อาศัย

ลำดับแรกของ *Salmonella* คือ ลำไส้ของสัตว์ เช่น สัตว์ปีก สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์เลี้ยง มนุษย์ รวมทั้งแมลง แต่บางทีอาจพบ *Salmonella* อยู่ตามร่างกายของมนุษย์และสัตว์ก็ได้ จากลำไส้แบคทีเรียออกมาทางอุจจาระ อาศัยสัตว์ แมลง และน้ำแพร่กระจายไปสู่สิ่งแวดล้อม ดิน น้ำ ปุ๋ย ชากสัตว์ที่เน่าเปื่อย วนเวียนเข้าสู่วงจรของห่วงโซ่อาหารสู่ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ วนเวียนเป็นวัฏจักร การขนส่งสัตว์และอาหารระหว่างประเทศทำให้เชื้อกระจายไปทั่วโลก

Salmonella แม้ว่าจะพบในสัตว์แทบทุกชนิด แต่บริเวณที่พบเชื่อนั้นอาจมากหรือน้อยต่างกัน เช่น บางครั้งอาจพบเชื้อในค่อมน้ำเหลืองมากกว่าอุจจาระก็ได้ จากการศึกษาซากสุกรในโรงฆ่าพบ *Salmonella* ในม้าม ตับ ถุงน้ำดี ค่อมน้ำเหลืองและกระบังลม พอๆ กับที่พบในอุจจาระ การแพร่ *Salmonella* จากสัตว์ที่มีเชื้อไปยังสัตว์ที่ปลอดเชื้อมักเกิดขึ้นบ่อยๆ เพราะมนุษย์และสัตว์อาจเป็นพาหะ คือ มี *Salmonella* อยู่ในร่างกายหรือในอุจจาระ แต่ไม่แสดงอาการของโรคออกมา *Salmonella* สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดที่เลือกเฉพาะแგრมาลบ ซึ่งใช้เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ แม้ว่าการแข่งขันจะไม่ดีเท่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่เป็นสมาชิกในตระกูลเดียวกันก็ตาม *Salmonella* ส่วนมากไม่ใช้น้ำตาลสองชั้นโดยผ่านกระบวนการหมักเช่น แลคโตส ซูโครส รวมทั้งซาลิซิน (salicin) แต่สามารถหมักน้ำตาลชั้นเดียว เช่น น้ำตาลกลูโคส ให้ก๊าซ แม้ว่าส่วนมาก *Salmonella* ต้องการกรดอะมิโนเป็นแหล่งธาตุไนโตรเจน แต่ *S. Typhimurium* สามารถใช้ในเตรทไนไทรท์ และก๊าซแอมโมเนียเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งธาตุไนโตรเจนได้ *Salmonella* เจริญในช่วง pH เป็นกลาง ระหว่าง pH 4.0-9.0 ปัจจัยร่วมที่ประกอบด้วย pH, a_w , สารอาหาร และอุณหภูมิมีความสัมพันธ์กัน และมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของ *Salmonella* เชื้อ *Salmonella* ไม่ทนต่อแรงดันออสโมติก และไม่เจริญในอาหารที่มีเกลือแกงเข้มข้นร้อยละ 9 เกลือไนไตรท์มีประสิทธิผลยับยั้งเชื้อได้ดีขึ้นในสถานะที่มี pH ลดลง แสดงว่าการทำงานของไนไตรท์เกิดจากกรด HNO_2 ในสถานะที่เป็นโมเลกุล หรือกรดที่ไม่แตกตัวมากกว่าในสถานะที่แตกตัว ตามปกติ *Salmonella* ที่ไม่เลือกโฮสต์สามารถทำให้ผู้บริโภครู้สึกมีอาการของโรคอาหารเป็นพิษได้ภายในเวลา 12-14 ชั่วโมง หลังการบริโภคอาหาร ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง (อาการปวดท้องไม่รุนแรงเท่ากับอาการที่ได้รับเชื้อ *Staphylococcus*) ปวดศีรษะ หนาวสั่น และท้องเดิน ตามด้วยอาการเหงื่อแตก อ่อนเพลีย ปวดเมื่อยตามกล้ามเนื้อ เป็นลม มีไข้ปานกลาง มึนงง อาการมักทรงตัวอยู่ราว 2-3 วัน อัตราการตายเฉลี่ยร้อยละ 4.1 ทั้งนี้จะแตกต่างกันตามกลุ่มเสี่ยงคือ ทารกที่อัตราการตายประมาณร้อยละ 5.8 ผู้สูงอายุประมาณร้อยละ 15 และผู้ป่วยในวัยกลางคนประมาณร้อยละ 2 สถิติที่เป็นสาเหตุให้มีอัตราการตายสูงสุดถึงร้อยละ 21 คือ *S. Choleraesuis* หลังจากป่วยแล้วประมาณ 5% ของผู้ติดเชื้อยังคงมีเชื้อซัลโมเนลลาอยู่ในร่างกาย และกลายเป็นพาหะของเชื้อนี้ต่อไป เนื่องจากทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยปฐมภูมิของ *Salmonella* จึงคาดเดาได้ว่าอุจจาระของ

มนุษย์และสัตว์อาจมีเชื้อซัลโมเนลลาด้วย แต่ในอุจจาระของสัตว์มีโอกาสดพบ *Salmonella* ได้มากกว่าอุจจาระของมนุษย์ เพราะสัตว์กินอาหารไม่เลือก อีกทั้งอาหารสัตว์มีโอกาที่จะปนเปื้อนได้มากกว่าอาหารของมนุษย์ ตามร่างกายและสิ่งปกปิดได้ชน ข้อพับของสัตว์อาจมีเชื้อซัลโมเนลลาด้วย แหล่งสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่ *Salmonella* ไปยังเนื้อสัตว์ฆ่าแหละ คือ สัตว์ที่เป็นพาหะ และอาหารสัตว์ การปนเปื้อนในลำดับต่อมา คือ ผู้ปฏิบัติงานที่สัมผัสกับอาหาร ยิ่งผู้ทำหน้าที่ต้องสัมผัสกับอาหารเป็นพาหะของ *Salmonella* ด้วยแล้ว ความเสี่ยงของผู้บริโภคก็จะยิ่งสูงขึ้น ที่ปลายทางก่อนบริโภค การเตรียมและการเคลื่อนย้ายอาหารจำเป็นจะต้องกระทำอย่างถูกต้องทั้งในระดับครัวเรือนและสถาบันจัดบริการอาหาร ต้องมั่นใจว่าวิธีการจัดเตรียมและการบริการอาหารได้ทำลายเชื้อซัลโมเนลลาจนมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคแล้ว หากไม่แล้วจะเป็นการส่งมอบอันตรายให้กับผู้บริโภคโดยมิได้ตั้งใจ การควบคุม *Salmonella* จำเป็นต้องกระทำตลอดห่วงโซ่อาหาร นับตั้งแต่ระดับฟาร์มหรือเกษตรกรผู้ทำการฟักไข่และผู้เลี้ยง ความเข้าใจในเรื่อง *S. Enteritidis* จะช่วยให้ความพยายามที่จะตัดวงจรการแพร่กระจายของเชื้อประสบความสำเร็จได้ มิติหนึ่งของความพยายามที่จะตัดวงจรดังกล่าวคือ การจัดสถานะในลำไส้ของไก่มีชีวิตให้กับแบคทีเรียที่ไม่มีอันตราย เพื่อที่จะให้เจริญเติบโตได้รวดเร็ว และเพิ่มจำนวนมากเพื่อแข่งขันกับแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในการเกาะกับลำไส้ของไก่ วิธีนี้คือการส่งเสริมสิ่งมีชีวิตให้แข่งขันกันเองตามธรรมชาติ โดยการจัดหาสถานะแวดล้อมเหมาะสมให้กับแบคทีเรียที่ไม่มีเป็นอันตรายต่อสุขภาพ เป็นการควบคุม *Salmonella* ในไก่มีชีวิต นั่นคือการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติก

3.6 *Shigella* spp.

เป็นแบคทีเรียอยู่ในตระกูล Enterobacteriaceae ซึ่งเป็นตระกูลเดียวกันกับซัลโมเนลลาและเอสเชอริเชีย เชื้อนี้เป็นสาเหตุของโรคบิด *Shigella* มี 4 สปีชีส์ คือ *Shigella dysenteriae*, *Sh. flexneri*, *Sh. boydii* และ *Sh. sonnei* ทุกสปีชีส์ทำให้เกิดโรคกับมนุษย์ที่มีความรุนแรงแตกต่างกัน โดย *Sh. Dysenteriae* เป็นสปีชีส์ที่มีความรุนแรงมากที่สุด เพราะทำให้เกิดโรคบิด ซึ่งทำให้ผู้ป่วยถ่ายเป็นมูกเลือด (Classical dysenteric syndrome) ส่วนสปีชีส์อื่นเพียงทำให้เกิดอาการท้องร่วงในลักษณะของการถ่ายเป็นน้ำเท่านั้น สำหรับ *Sh. flexneri* และ *Sh. boydii* ส่วน *Sh. sonnei* มีความรุนแรงน้อยกว่าสปีชีส์อื่นๆ โรคบิดเกิดขึ้นมากในประเทศที่มีอากาศร้อนและการสุขาภิบาลของอาหารและน้ำไม่ค่อยดีนัก *Shigella* ไม่ไวต่อปฏิชีวนะทางชีวเคมีเมื่อเปรียบเทียบกับ *E. coli* จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางจีนส์ (DNA) ปรากฏว่า *Shigella* ทั้ง 4 สปีชีส์อยู่ในสปีชีส์เดียวกัน แต่เหตุที่ยังคงไว้แบบเดิม เพราะ *Shigella* มีเพียง 4 สายพันธุ์เท่านั้น และทุกสายพันธุ์ทำให้เกิดโรคที่มีระดับความรุนแรงต่างกัน การจัดแบ่งใหม่อาจมีผลเสียเนื่องจากความสับสนมากกว่า *Shigella* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีอากาศและไม่มียากาส ไม่สร้าง

เอนไซม์ออกซิเดส ใช้น้ำตาลโดยการหมักให้กรด แต่ไม่เกิดก๊าซ ไม่เจริญในอุณหภูมิที่ มีโปแตสเซียมไฮยาไนด์ และไม่ให้อากาศผ่าน ตามปกติเจริญได้ไม่คืนักในอาหารทั่วไปที่ให้ออกซิเจน เชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 10-48 องศาเซลเซียส pH เหมาะสมอยู่ระหว่าง 6-8 และถูกยับยั้งโดยไนไตรท์ในสภาวะที่เป็นกรดหรือด่าง เพราะเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ หรือในสภาวะที่มีเกลือแกงสูง *Shigella* สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มี a_w ต่ำกว่า a_w ค่าสุดของ *Shigella* และ *E. coli* *Shigella* ไวต่อความร้อนซึ่งแตกต่างจาก *E. coli* ที่ค่อนข้างทนร้อน *Shigella* ต่างจาก *Salmonella* คือ สัตว์ทุกชนิดไม่ได้เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของ *Shigella* เชื้อนี้อาศัยอยู่เฉพาะในลำไส้ของคนและสัตว์ชั้นสูงที่เลี้ยงลูกด้วยนม จึงไม่ทำให้เกิดโรคระบาดในสัตว์ และไม่เป็นปัญหาจากการแพร่กระจายมากเหมือนกับ *Salmonella* และ *Shigella* ไม่ใคร่มีชีวตรอดในสิ่งแวดล้อม การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษของเชื้อนี้จึงเป็นเรื่องไม่ปกติ เพราะ *Shigella* เป็นแบคทีเรียที่เลือกโฮสต์ การเกิดโรคอาหารเป็นพิษจาก *Shigella* ตามปกติมาจากการใช้คนที่ เป็นพาหะเป็นผู้จัดเตรียมอาหาร หรือใช้วัตถุดิบที่ได้มาจากสิ่งแวดล้อมซึ่งไม่ถูกหลักการสุขาภิบาล หรืออาจมีแมลงวันเป็นตัวแพร่เชื้อ อาหารที่ปรุงสุกๆ ดิบๆ หรืออาหารที่ต้องใช้มือสัมผัส แล้วไม่ผ่านการทำให้สุกอีก เช่น กุ้ง คอกเทล สลัดทูน่า เคยเป็นสาเหตุของการระบาดของชิเกลโลซิสมมาแล้ว *Shigella* ทำให้เกิดโรคบิดคับคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเท่านั้น จากการศึกษาปริมาณของเชื้อต่ำเพียง 10-100 cfu/g ก็สามารถทำให้เกิดโรคขึ้นได้ ระยะเวลาบ่มเพาะเชื้อแตกต่างกันมากประมาณ 7 ชั่วโมง ถึง 7 วัน แต่ในกรณีที่เกิดโรคอาหารเป็นพิษระยะเวลาที่เชื้อพักตัวน่าจะสั้น คือ 36 ชั่วโมง อาการของโรคคือ ปวดท้อง อาเจียน และมีไข้ ตามด้วยอาการถ่ายท้อง ในกรณีที่รุนแรงซึ่งเป็นอาการของโรคบิด ผู้ป่วยจะถ่ายเป็นมูกเลือด แต่ถ้าเกิดจาก *Shigella* อีก 3 สปีชี อาการจะเบาลงเพียงการถ่ายท้องที่มีลักษณะเป็นน้ำก็เป็นได้ อาการป่วยอาจจะทรงอยู่ราว 14 วัน ก็จะทุเลาลง แต่ถ้าเกิดจาก *Sh. Dysenteriae* ซึ่งทำให้เกิดอาการของโรคบิดแท้ที่มีอันตรายรุนแรง ควรพบแพทย์ หรือให้น้ำเกลือ หรือกินเกลือแร่ เพื่อรักษาสมดุลของของเหลวในร่างกาย และถ้ารุนแรงก็อาจจะต้องให้ยาปฏิชีวนะ เพื่อทำลายเชื้อ ลักษณะความเป็นพิษของเชื้อมีสองแบบคือ เกิดจากการแพร่กระจายของเชื้อ (invasiveness) เกิดจากการที่ชิเกลลาเพิ่มจำนวนขึ้นในลำไส้และสามารถทำลายเยื่อเมือกในลำไส้หรือเลือดที่ไปเลี้ยงอวัยวะในบริเวณดังกล่าวอาการถ่ายเป็นมูกเลือดเกิดจากเซลล์ที่ถูกทำลายหลุดปนไปกับอุจจาระ และเกิดจากสารพิษที่แบคทีเรียสร้างขึ้น (Enterotoxin) อีกชื่อหนึ่งเรียกว่า ชิกาทอกซิน (Shiga toxin) สารพิษเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่แบคทีเรีย *Sh. Dysenteriae* สร้างขึ้น แม้ว่าชิเกลลาสปีชีอื่นจะผลิตสารพิษนี้ออกมาด้วย แต่ก็มีปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ *Sh. Dysenteriae* สารพิษนี้มีแนวโน้มจะจับกับไกลโคโปรตีน สารพิษจึงไวต่อความร้อนที่ใช้ในการหุงต้มอาหารให้สุก

4. รายละเอียดเกี่ยวกับการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

4.1 การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพทั่วไปนั้น หมายถึงการใช้เทคนิควิธีในหลอดทดลองเพื่อตรวจสอบความไวหรือการค้ำยาด้านจุลชีพของเชื้อ โดยนำมาหาค่า MIC (Minimum inhibitory concentration) หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดของยาต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยหน่วยที่นิยมใช้คือ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่า MIC สามารถใช้เป็นค่าเพื่อดูความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดได้ หลังจากนั้นนำมาหาค่า MBC (Minimum bactericidal concentration) หมายถึง ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ ซึ่งอาจเป็นค่าเดียวกันกับค่า MIC หรือไม่ใช้ค่าเดียวกันก็ได้ (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537) การทดสอบความไวนั้นมีวิธีการหลัก 2

ประการคือ Dilution method และ Diffusion method

4.1.1 Dilution method (ภัทรชัย กิริติสิน, 2549)

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธีการเจือจางยา (dilution) เป็นลำดับให้มีความเข้มข้นต่างกัน โดยทั่วไปจะเจือจางยาให้มีความเข้มข้นลดลง 2 เท่าตามลำดับ (two-fold dilution) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีตามมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) คือ broth dilution method และ agar dilution method

4.1.1.1 Broth dilution method เป็นการทดสอบโดยใช้อาหารเหลว สามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ macrodilution method และ microdilution method

-วิธี macrodilution method จะทำการทดสอบในหลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิเมตร ด้วยการเจือจางยาในอาหารเหลวปริมาตร 1 ถึง 2 มิลลิลิตร

-วิธี microdilution method จะทำการทดสอบในถาดหลุม (microtiter plate) โดยการเจือจางยาในอาหารเหลวปริมาตรประมาณ 0.05 ถึง 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นอ่านผลโดยสังเกตความขุ่นหรือดูความใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ อ่านผลค่า MIC สำหรับวิธี macrodilution จะมีความยุ่งยากมากกว่าวิธี microdilution เพราะต้องใช้หลอดทดลองจำนวนมาก สำหรับการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยทั่วไปจึงนิยมวิธี microdilution มากกว่าโดย

ใช้ถาดหลุม ซึ่งสามารถใช้ทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันในถาดเดียวกัน

4.1.1.2 Agar dilution method เป็นการทดสอบโดยใช้อาหารวุ้น เป็นการทดสอบโดยการผสมกันระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น agar medium กับยาปฏิชีวนะที่ระดับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบในอัตราส่วน 1 ต่อ 19 (ยา ต่อ agar medium) ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงในจานอาหาร

เลี้ยงเชื้อ การทดสอบโดยใช้อาหารวุ้นเป็นการทดสอบที่ให้ผลมาตรฐานเชื่อถือได้ และสามารถใช้ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดได้พร้อมกัน แต่โดยทั่วไปไม่นิยมทำเนื่องจากมีความยุ่งยากและเสียเวลามากในการเตรียมอาหารวุ้นที่ผสมยาในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยเฉพาะหากต้องการทดสอบกับยาหลายชนิด ปัจจุบันจึงนิยมใช้การทดสอบด้วยวิธี broth dilution method มากกว่า

4.1.2 Diffusion method

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธีการแพร่ของยา (diffusion) อาศัยการแพร่ของยาจากแผ่นกระดาษกรองชุบยาต้านจุลชีพ (antibiotic disc หรือ Kirby-bauer disc) ตู้อาหารเลี้ยงเชื้อ วิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือการวางแผ่นกระดาษกรองบนผิวหน้าของอาหารวุ้นเพื่อให้ยาแพร่กระจายออกไปสู่เนื้ออาหารวุ้นที่เรียกว่า disc diffusion test หรือ Kirby-bauer test บริเวณอาหารวุ้นที่อยู่รอบแผ่นกระดาษกรองจะมีความเข้มข้นของยาสูง และลดลงตามลำดับในบริเวณที่อยู่ห่างออกไป ในการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion test จะแสดงถึงความสัมพันธ์ของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone รอบๆ disc ยาต้านจุลชีพ ซึ่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone จะเป็นสิ่งที่บ่งบอกถึงความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ โดยนำมาแปลผลความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ โดยเทียบกับค่ามาตรฐานสำหรับเชื้อและยาชนิดนั้น การทดสอบด้วยวิธีนี้เป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบันเนื่องจากสามารถทำได้ง่าย การแปลผลมีความน่าเชื่อถือสูง และราคาถูกเมื่อเทียบกับการทดสอบด้วยวิธีอื่น อย่างไรก็ตาม การทดสอบด้วยวิธีนี้มีข้อควรระวังในการแปลผล ค่ามาตรฐานที่ใช้ในการตัดสินความไวต่อยาชนิดหนึ่งอาจแตกต่างกันสำหรับเชื้อต่างชนิดกัน ดังนั้นห้องปฏิบัติการควรมีความระมัดระวังในการแปลผลโดยไม่นำค่าที่ใช้ในการแปลผลสำหรับเชื้อชนิดหนึ่งไปใช้กับเชื้อชนิดอื่นที่ไม่ได้ระบุไว้ตามมาตรฐานอ้างอิง

4.2 การรายงานผลความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

การรายงานผลความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพนิยมแปลผลโดยเทียบกับค่ามาตรฐานอ้างอิง โดยแบ่งออกเป็น 3 ลักษณะ คือ

4.2.1 เชื้อไวต่อยา (susceptible : S) ค่า MIC ที่ได้จากการทดสอบอยู่ในระดับไม่เกินระดับของยาที่สามารถใช้ได้อย่างปลอดภัยในเนื้อเยื่อ และสามารถให้ยาในปริมาณปกติเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อบ่งชี้ว่าสามารถใช้ยาในการรักษาทางคลินิกได้

4.2.2 เชื้อไวต่อยาปานกลาง (intermediate susceptible : I) ค่า MIC ที่ได้จากการทดสอบอยู่ในระดับที่สูงกว่าระดับที่บ่งชี้ว่าเชื้อมีความไวต่อยา แต่ต่ำกว่าระดับที่บ่งชี้ว่าเชื้อคือดื้อยา

4.2.3 เชื้อดื้อต่อยา (resistance : R) ค่า MIC ที่ได้จากการทดสอบอยู่ในระดับสูงกว่าระดับของยาที่สามารถใช้ได้อย่างปลอดภัยในเนื้อเยื่อ ซึ่งบ่งชี้ว่าไม่สามารถให้ยาในการรักษาทางคลินิกได้ (ภทรชย์ กิรติสิน, 2549)

5. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

Ekwenye & Ijeomah (2005) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันจากเมล็ดปาล์มและน้ำมันจากเปลือกปาล์มในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพ 5 ชนิดคือ *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* และ *Aspergillus niger* พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลชีพที่ทำมาทดสอบ แต่เมื่อทำการผสมน้ำมันทั้งสองชนิดแล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพการต้านจุลชีพพบว่าสามารถยับยั้ง *E. coli* ได้เพียงชนิดเดียวและยับยั้งได้เพียงเล็กน้อย

Bergsson *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของกรดไขมันห่วงโซ่ปานกลาง จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ caprylic acid, capric acid, lauric acid, myristic acid, palmitoleic acid และ oleic acid และ โมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ monocaprylin, monocaprin, monolaurin, monomyristin, monopalmitolein และ monoolein เมื่อใช้ความเข้มข้น 0.15, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5 และ 10 mM ในการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* spp., *E. coli* และ *Helicobacter pylori* พบว่าสารทั้งสองกลุ่มไม่สามารถยับยั้ง *Salmonella* spp. และ *E. coli* แต่พบว่ามีสาร 8 ชนิดจาก 12 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของ *H. pylori* ได้แก่ capric acid, lauric acid, myristic acid, palmitoleic acid, monocaprin, monolaurin, และ monopalmitolein เมื่อใช้ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 mM ส่วน caprylic acid และ monomyristin สามารถยับยั้ง *H. pylori* ได้เมื่อใช้ความเข้มข้น 10 mM

Bergsson *et al.* (2001a) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของกรดไขมันห่วงโซ่ปานกลาง จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ caprylic acid, capric acid, lauric acid, myristic acid และ oleic acid และ โมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ monocaprylin, monocaprin, monolaurin, monomyristin, monopalmitolein และ monoolein เมื่อใช้ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 mM ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida albicans* 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ I, II และ III พบว่า caprin acid และ lauric acid สามารถฆ่า *Candida albicans* ทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อใช้ความเข้มข้น 10 mM และ 5 mM ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kabara และคณะ (1972) ซึ่งพบว่า capric, lauric, palmitoleic acids สามารถยับยั้ง *C. albican* ได้หลัง 18 ชั่วโมง เมื่อทำการศึกษารูปร่างของ *C. albican* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี capric acid 10 mM ด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่ารูปร่างและขนาดของผนังเซลล์ไม่ผิดปกติ แต่การเรียงตัวของออร์แกเนลล์ภายในไซโตพลาซึมผิดปกติไป

Bergsson *et al.* (2001b) ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ กรดไขมันห่วงโซ่ปานกลาง (medium-chain fatty acid), กรดไขมันห่วงโซ่ยาว (long-chain fatty acid) และ โมโนกลีเซอไรด์บริสุทธิ์ (monoglyceride) ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus*, *Streptococci* group B (GBS) และ *Streptococci* group A (GSA) พบว่า lauric acid, palmitoleic acid และ monocaprin สามารถยับยั้งเชื้อ

Streptococci group B และ *Streptococci* group A ได้ ซึ่ง monocaprin ยับยั้งได้ดีที่สุด และพบว่า monocaprin สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้อีกด้วย เมื่อทำการศึกษากลไกของ monocaprin ในการยับยั้งเชื้อ *Streptococci* group B โดยใช้วิธี two-color fluorescent assay แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียไม่รวมกับไขมันทำให้เซลล์แบคทีเรียถูกทำลาย ดังนั้น monocaprin อาจจะใช้เป็นสารเพื่อใช้ป้องกันและรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย

Hinton & Ingram (2005) ทดสอบประสิทธิภาพของ tripatassium phosphate (TPP) และกรดไขมัน 2 ชนิดคือ lauric acid และ myristic acid ในการยับยั้งเชื้อ *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Candida ernobii* และ *Yarrowia lipolytica* พบว่าเมื่อใช้ tripatassium phosphate (TPP) ร่วมกับกรดไขมันสามารถฆ่าแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ได้

Ogbolu *et al.* (2007) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Candida* จำนวน 52 isolates ที่แยกได้จากผู้ป่วย ได้แก่ *Candida albicans* 17 isolates, *Candida glabrata* 9 isolates, *Candida tropicalis* 7 isolates, *Candida parapsilosis* 7 isolates, *Candida stellotoidea* 6 isolates, *Candida krusei* 6 isolates พบว่าสามารถยับยั้ง *Candida* ได้ทุกสายพันธุ์ และมีค่า MIC เท่ากับ 50% ยกเว้น *C. krusei* ที่ทนต่อน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มากที่สุดซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 100% ดังนั้นน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ควรจะทำมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อรา

Bergsson *et al.* (1999) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของกรดไขมันห่วงโซ่ปานกลาง จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ caprylic acid, capric acid, lauric acid, myristic acid และ oleic acid และ โมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ monocaprylin, monocaprin, monolaurin, monomyristin, monopalmitolein และ monoolein ในการยับยั้งการเจริญของ *Neisseria gonorrhoeae* 5 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ I, II, III, IV และ V พบว่ากรดไขมันห่วงโซ่ปานกลาง lauric acid และ palmitoleic acid สามารถยับยั้ง *N. gonorrhoeae* ทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้ดีเมื่อใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.63 mM และ 0.31 mM ตามลำดับ ส่วน โมโนกลีเซอไรด์ monocaprin และ monolaurin สามารถยับยั้ง *N. gonorrhoeae* ทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้ดีเมื่อใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.63 mM และ 0.31 mM ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 0.31 monolaurin สามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่า palmitoleic acid

Bergsson *et al.* (1998) ศึกษาประสิทธิภาพของกรดไขมันและ โมโนกลีเซอไรด์ ในการยับยั้ง *Chlamydia trachomatis* พบว่า ที่ความเข้มข้น 10 mM caprylic acid, monocaprylin, monolauric, myristic acid, palmitoleic acid, monopalmitolein, oleic acid และ monoolein ไม่สามารถยับยั้ง *Chlamydia trachomatis* ส่วน lauric acid, capric acid และ monocaprin สามารถยับยั้งเชื้อได้ดี เมื่อทำการศึกษากลไกการยับยั้งเชื้อของ capric acid โดยเลี้ยง *C. trachomatis* ใน

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี monocarpic acid 10 mM แล้วนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์พบว่า *C. trachomatis* ถูกฆ่าเนื่องจากเซลล์เมมเบรนของ element bodies ถูกทำลาย ดังนั้น monocarpic acid ควรจะนำมาใช้เป็นสารฆ่าจุลชีพในการป้องกันโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ของ *C. trachomatis*

Bartolotta *et al.* (2001) ศึกษาผลของกรดไขมันต่อการ replication ของ arenavirus โดยทำการเลี้ยง Vero เซลล์ใน 24-well plates ซึ่งมีกรดไขมันความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นเติมไวรัสลงไป แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างเซลล์ แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อตรวจหาจำนวนไวรัสที่อยู่นอกเซลล์ด้วยวิธี plaque assay พบว่า การ replication ของไวรัสถูกยับยั้งด้วย monocarboxylic acids ได้แก่ capric acid, myristic acid, palmitic acid, stearic acid และ lauric acid ซึ่งเมื่อใช้ความเข้มข้นสูงขึ้นสามารถยับยั้งการ replication ของไวรัสได้ดีขึ้น โดย lauric acid สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด

Petschow *et al.* (1998) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของ medium chain monoglyceride และ free fatty acid ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค แบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้แก่ *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei* และ enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) เมื่อบ่มเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดกับ medium chain monoglyceride หรือ free fatty acid พบว่ามีเพียง lauric acid ที่สามารถฆ่าแบคทีเรียที่ทำมาทดสอบได้ จากนั้นทำการศึกษาในสัตว์ทดลอง โดย treat หนูไม่ซ้ด้วย streptomycin แล้วให้หนูกินเชื้อ enterotoxigenic *Escherichia coli* หรือ *Vibrio cholerae* และ medium chain monoglyceride พบว่าหนูไม่ซ้ที่ treat ด้วย streptomycin และ ได้รับ เชื้อและ medium chain monoglyceride เข้าไปในร่างกายพร้อมกัน มีเชื้อ *V. cholerae* ที่ลำไส้้น้อยมากเมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่อย่างไรก็ตามจำนวนเชื้อ enterotoxigenic *E. coli* ในลำไส้ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แสดงว่า medium chain monoglyceride ป้องกันการ colonization ของ *V. Cholerae* ที่ได้รับเข้าไปพร้อมกับกรดไขมันได้

Wang & Johnson (1992) ศึกษาฤทธิ์ต้าน Scott A *Listeria monocytogenes* ของ fatty acid และ monoglyceride พบว่า C12:0, C18:3 และ monolaurin สามารถที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดี และเมื่อใช้ความเข้มข้น 10-20 µg/ml สามารถฆ่าเชื้อได้ ส่วน potassium-conjugated linoleic acids และ C18:2 สามารถฆ่าเชื้อได้เมื่อใช้ความเข้มข้น 50-200 µg/ml เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อในนม 2 ชนิดคือ skim milk และ whole milk พบว่า potassium-conjugated linoleic acids สามารถยืด lag phase ของเชื้อได้เมื่อบ่มนมทั้ง 2 ชนิดที่ 4 องศาเซลเซียส และพบว่า monolaurin สามารถยับยั้งเชื้อในนม skim milk ที่เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ได้ แต่ยับยั้งได้น้อยที่ 23 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม monolaurin ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ในนม whole milk ได้

ดังนั้น potassium conjugated linoleic acids และ monolarin สามารถใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในอาหารได้

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์

2. แบคทีเรียทดสอบ

2.1 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

2.2 *Bacillus subtilis*

2.3 *Bacillus cereus*

2.4 *Escherichia coli*

2.5 *Salmonella* spp.

2.6 *Shigella* spp.

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ค)

3.1 Mueller-Hinton agar (MHA)

3.2 Trypticase soy broth (TSB)

3.3 Nutrient agar (NA)

3.4 Plate count agar (PCA)

3.5 Baird Parker Egg Yolk Tellurite (BPEY) Agar

3.6 Mannitol Egg Yolk Phenol Red Polymyxin (MYP) Agar

3.7 Lauryl Sulphate Tryptose (LST) Broth

3.8 Brilliant Green Lactose (BGLB) Broth

3.9 EC Broth

4. ตัวอย่างอาหาร

4.1 โยเกิร์ตธรรมชาติที่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ 20%

4.2 โยเกิร์ตธรรมชาติที่ไม่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์

4.3 น้ำสลัดชนิดข้นที่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ 26%

4.4 น้ำสลัดชนิดข้นที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง 26%

4.5 ไข่กรอกเปรี้ยวที่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ 20%

4.6 ไข่กรอกเปรี้ยวที่ไม่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์

4.7 น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ผสมกระเทียม 16%

4.8 น้ำมันถั่วเหลืองผสมกระเทียม 16%

5. สารเคมี (ภาคผนวก ก)

5.1 Dimethyl sulfoxide (DMSO)

5.2 NaCl 0.85%

5.3 Standard McFarland No. 0.5

5.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

5.5 Peptone water 0.1%

6. อุปกรณ์

6.1 Micropipette และ tip

6.2 กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร

6.3 Sterile cotton swab

6.4 น้ำกลั่น

6.5 จานเพาะเชื้อ

6.6 แผ่นดิสก์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

6.7 หลอดฝาเกลียว

6.8 อะลูมิเนียมฟลอยด์

6.9 ตู้บ่ม (Incubator) 37 องศาเซลเซียส

6.10 ปีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร

6.11 ปีเปตปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร

7. ยาปฏิชีวนะ

7.1 tetracycline (ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม/ดิสก์) จากบริษัท Oxoid

7.2 ampicillin ดิสก์ (ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ดิสก์) จากบริษัท Oxoid

วิธีการทดลอง

1. ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของกรดไขมันที่แยกได้จากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ โดยวิธี Disc diffusion (Collins, Lyne, Grange & Falkinham, 2004)

1.1 การแยกกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์

1.1.1 นำน้ำมันมะพร้าว โซเดียมไฮดรอกไซด์ และน้ำในอัตรา 3.5:0.5:12 มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส กวนในอัตรา 750 rpm จนสารละลายใส และทิ้งไว้ให้เย็น

1.1.2 เติมกรดไฮโดรคลอริกเท่ากับ 5 เท่าของปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์เริ่มต้น ทำการกวนในอัตรา 750 rpm. เป็นเวลา 2 ชั่วโมงหรือจนกว่าสารจะแยกชั้น โดยที่สารที่แยกชั้นจะมีลักษณะเป็นของเหลวใสลอยอยู่บริเวณผิวหน้าของสารละลาย

1.1.3 แยกสารที่อยู่ด้านบนออกใส่ลงในกรวยแยกสาร ล้างด้วยน้ำกลั่นจนแน่ใจว่าไม่มีกรดไฮโดรคลอริกหรือเกลือหลงเหลือ ตรวจสอบด้วยการไตเตรทน้ำล้างกรดไขมันกับโซเดียมไฮดรอกไซด์เปรียบเทียบกับน้ำกลั่น

1.1.4 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาระเหยน้ำออกด้วยความร้อนและเก็บไว้ในภาชนะปิดสนิท

1.1.5 ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันที่สกัดได้ (AOAC Da 14-48)(ภาคผนวก ก) และส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์หาชนิดของกรดไขมันที่สกัดได้ตามวิธีของ AOAC 996.06 (2005) ด้วย Gas Chromatography (ภาคผนวก ข)

1.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับทดสอบ

1.2.1 เลี้ยงเชื้อลงในอาหาร Nutrient agar บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2.2 เชื้อโคโลนีของเชื้อทดสอบประมาณ 4-6 โคโลนี บนอาหาร NA ใส่ลงใน Trypticase soy broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง

1.2.3 ปรับความเข้มข้นของเชื้อทดสอบด้วย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความขุ่นเท่ากับ Standard McFarland No. 0.5 ซึ่งมีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml

1.3 การเตรียมกรดไขมันเพื่อทดสอบ

1.3.1 นำกรดไขมันปริมาตร 10 มิลลิลิตร ละลายใน DMSO 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดไขมันเป็น 50% v/v

1.3.2 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร จะได้สารละลายกรดไขมันเพื่อทดสอบในขั้นต่อไป

1.4 วิธีการทดสอบ

1.4.1 หยดสารละลายกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ปริมาตรคิดละ 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที

1.4.2 ใช้ Sterile cotton swab จุ่มเชื้อในข้อ 1.2.3 บิดกับข้างหลอดให้พอหมด จากนั้นป้ายลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar

1.4.3 ใช้ปากคีบปราศจากเชื้อหยิบแผ่นดิสก์ที่เตรียมไว้ วางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย 1 เพททวงดิสก์บรรจุสารละลายกรดไขมันจำนวน 3 ดิสก์ และวางดิสก์ยาปฏิชีวนะ เพื่อเป็น positive control (tetracycline ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม/ดิสก์ ใช้สำหรับ *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus* และ *Salmonella* spp. ส่วน ampicilin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ดิสก์ ใช้สำหรับ *Shigella* spp.) ดิสก์บรรจุ DMSO ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใช้เป็น negative control

1.4.4 นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone

2. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของกรดไขมันที่แยกได้จากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ โดยวิธี agar dilution (Collins *et al.*, 2004)

2.1 เจือจางกรดไขมันที่แยกได้จากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ด้วยวิธี Two-fold dilution ด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.2 และ 0.1 % v/v ตามลำดับ

2.2 ผสมสารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิตร กับ Mueller-Hinton agar หลอมเหลว (อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 19 มิลลิตร แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อ จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดไขมันตั้งแต่ 2.5-0.005 % v/v ส่วนชุดควบคุมทำเช่นเดียวกัน แต่เปลี่ยนจากการเติมกรดไขมันเป็นยาปฏิชีวนะและ DMSO

2.3 นำเชื้อจากข้อ 1.2 มาเจือจางด้วย NaCl 0.85% ให้ได้ปริมาณเชื้อ 1×10^6 CFU/ml จากนั้นดูดเชื้อแต่ละชนิดมา 10 ไมโครลิตร ซึ่งมีเชื้อเท่ากับ 10^4 CFU/หยด (เชื้อละ 2 หยด) หยดลงบนอาหารที่ผสมกรดไขมันความเข้มข้นต่าง ๆ และชุดควบคุม ขั้นตอนนี้ใช้ *S. aureus* ATCC 25923 ในการหาค่า MIC ของ tetracycline เพื่อควบคุมคุณภาพการทดลอง

2.4 ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.5 อ่านผลค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของแบคทีเรียที่ทำการทดสอบ

3. ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ในตัวอย่างอาหาร

3.1 เตรียมตัวอย่างอาหาร

3.1.1 นำเนื้อปลาทูมาแล่เป็นชิ้นและปรุงรสด้วยเกลือ 2% และพริกไทย 0.1% จากนั้นนำไปนึ่งสุก (ชิ้นละ 11 กรัม)

3.1.2 ใส่แบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิด ซึ่งได้แก่ *S. aureus*, *B. cereus*, และ *B. subtilis* ลงบนตัวอย่างอาหารที่เตรียมไว้ โดยให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 1.5×10^5 CFU/กรัม

3.1.3 เติมกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ลงไปในตัวอย่าง โดยให้มีความเข้มข้น 0.4%

3.1.4 นำตัวอย่างมาคลุกกับแป้งเทมปุระประมาณ 1.5 กรัม (น้ำหนักสุดท้ายของตัวอย่างประมาณ 12.5 กรัม ซึ่งมีปริมาณเชื้อประมาณ 1×10^7 CFU/กรัม)

3.1.5 นำตัวอย่างใส่ถุง ถุงละ 2 ชิ้น แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 10 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน

ขั้นตอนนี้มีชุดควบคุมคือ ตัวอย่างที่มีการเติมเชื้อแต่ไม่เติมกรดไขมัน และตัวอย่างที่ไม่มีการเติมเชื้อและไม่มีการเติมกรดไขมัน

3.2 การนับจำนวนแบคทีเรียที่เวลาต่างๆ

ทำการนับจำนวนแบคทีเรียที่เวลาต่างๆ ดังนี้ 0, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 และ 28 วัน ซึ่งมีวิธีการดังนี้

3.2.1 นำอาหารตัวอย่าง 25 กรัมใส่ลงในถุง stomacher bag แล้วเติมสารละลาย peptone water 0.1% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 2 นาที จะได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-1}

3.2.2 คูณสารละลายจากระดับความเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดบรรจุสาร peptone water 0.1% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม จะได้ตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 10^{-2} จากนั้นเจือจางตัวอย่างต่อไปเรื่อยๆ ด้วยสารละลาย peptone water 0.1% ให้ได้ระดับความเจือจาง 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}

3.2.3 คูณระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับความเจือจาง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิด (BPEY agar สำหรับ *S. aureus*, MYP agar สำหรับ *B. cereus* และ *B. subtilis*) จำนวน 3 จาน จานละ 0.3, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตร จากนั้นใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อเกลี่ยให้ทั่วผิวน้ำอาหาร

3.2.4 นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

3.2.5 นับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะจำเพาะ (typical colony) ของเชื้อแต่ละชนิดบนอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ โดยลักษณะเฉพาะของโคโลนี *S. aureus* บนอาหาร BPEY agar คือ โคโลนีลักษณะกลมมน ขอบเรียบ ผิวเรียบมัน มีสีเทาถึงดำ มีวงขาวขุ่นล้อมรอบ และมีวงแหวนใสล้อมรอบอีกชั้นหนึ่ง ส่วนลักษณะเฉพาะของโคโลนี *B. subtilis* บนอาหาร MYP agar คือ โคโลนีมีลักษณะกลม แบบ ผิวหน้าด้าน สีเหลืองนวล อาจมีการสร้างไบโอฟิล์มบริเวณด้านบนโคโลนี เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลือง และ ลักษณะเฉพาะของโคโลนี *B. cereus* บนอาหาร MYP agar

คือ โคโลนีมีลักษณะ ใหญ่ ขอบไม่เรียบ สีเหลืองนวลหรือสีชมพู เกิดวงรอบสีชมพู และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีชมพู

3.2.6 คำนวณจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่าง และคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของจำนวนเชื้อจากเชื้อเริ่มต้น พร้อมทั้งเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางสถิติด้วย t-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05

4. ศึกษาคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ของอาหารที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นส่วนประกอบ

4.1 การเจือจางตัวอย่าง

4.1.1 ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ แล้วเติมสารละลาย peptone water 0.1% (เติมสารละลาย peptone water 0.1% ผสม Tween 80 ในตัวอย่างสัลดและน้ำมันปรุงรส) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องตีผสมอาหารเป็นเวลา 1 นาที จะได้ตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 10^{-1}

4.1.2 คูณสารละลายจากระดับความเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดบรรจุสาร peptone water 0.1% (เติมสารละลาย peptone water 0.1% ผสม Tween 80 ในตัวอย่างสัลดและน้ำมันปรุงรส) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม จะได้ตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 10^{-2}

4.1.3 เจือจางตัวอย่างไปเรื่อยๆ ให้ได้ตัวอย่างที่มีระดับความเจือจางที่เหมาะสม

4.2 การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (aerobic plate count)

4.2.1 เลือกตัวอย่างความเจือจางที่เหมาะสม แล้วถ่ายตัวอย่างจากแต่ละระดับความเจือจางลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร PCA จานละ 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 3 จาน

4.2.3 ใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.2.4 นับจำนวนโคโลนีจากแต่ละจานเพาะเชื้อ หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีใน 1 จาน คำนวณค่า CFU/กรัม จากความสัมพันธ์ต่อไปนี้

$$\text{CFU/กรัม} = (a/d) \times 10$$

เมื่อ a คือ จำนวน โคโลนีเฉลี่ยต่อจาน

d คือ ความเจือจางของตัวอย่าง

4.3 การหาปริมาณโคลิฟอร์มและ *E. coli*

4.3.1 ถ่ายตัวอย่าง จากระดับความเจือจาง 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหาร LST broth จำนวน 3 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร เคาะหลอดเบา ๆ เพื่อผสมตัวอย่างกับอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.3.2 นำหลอดอาหาร LST broth ไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อ่านผลที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง โดยสังเกตการขุ่นและการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ หลอดผลบวกจะมีลักษณะขุ่นมีที่ว่างในหลอดดักก๊าซ และฟองก๊าซปริมาณมากเมื่อเขย่าหลอด

4.3.3 ถ่ายเชื้อจากหลอด LST broth ที่ให้ผลบวกทุกหลอดลงในหลอดอาหาร BGLB broth และ EC broth โดยใช้ลูปจุ่มเชื้อจากหลอด LST และถ่ายเชื้อแบบหลอดต่อหลอด นำหลอด BGLB broth ไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อ่านผลที่ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง และนำหลอด EC broth ไปบ่มที่อุณหภูมิ 44.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.4 บันทึกผลจำนวนหลอด BGLB broth ที่ให้ผลบวก (ภาคผนวก จ) และจำนวนหลอด EC broth ที่ให้ผลบวก แล้วอ่านค่า MPN/กรัม ของตัวอย่างจากตาราง MPN (ภาคผนวก จ)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของกรดไขมันที่แยกได้จากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ โดยวิธี disc diffusion

เมื่อนำกรดไขมันที่แยกได้จากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจำนวน 6 ชนิด ด้วยวิธี Disc diffusion ให้ผลดังตารางที่ 1 ซึ่งพบว่ากรดไขมัน (ความเข้มข้น 50% v/v ปริมาตร 20 ไมโครลิตร) สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ 3 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* และ *B. cereus* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone เท่ากับ 10.67 ± 0.50 , 9.00 ± 0.00 และ 8.33 ± 0.50 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 2-7)

2. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของกรดไขมันที่แยกได้จากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ โดยวิธี agar dilution

เมื่อนำกรดไขมันที่แยกได้จากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มาหาความเข้มข้นต่ำสุดต่อเชื้อแบคทีเรียจำนวน 6 ชนิด ให้ผลดังตารางที่ 2 ซึ่งพบว่าค่า MIC ของกรดไขมันต่อ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* และ *B. cereus* เท่ากับ 0.04% v/v ส่วนค่า MIC ของกรดไขมันต่อ *E. coli*, *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. เท่ากับ >2.5% v/v (ภาพที่ 8-10) และค่า MIC ของ tetracycline ต่อ *S. aureus* ATCC 25923 เท่ากับ <0.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อทดสอบทุกชนิดสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม DMSO (ชุดควบคุม) (ภาพที่ 11)

3. ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ในตัวอย่างอาหาร

เมื่อเติมกรดไขมันที่แยกได้จากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ลงในเนื้อปลาทุปรุ้งหนึ่งสุก ความเข้มข้นสุดท้าย 0.4% จากนั้นเติมแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดลงไป แล้วนำตัวอย่างไปนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน และทำการนับจำนวนเชื้อที่เวลาต่างๆ (ภาคผนวก ง) ให้ผลดังภาพที่ 12-14 ซึ่งจากภาพที่ 12 พบว่าปริมาณ *S. aureus* ในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมกรดไขมันมีจำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ $5.5 \log \text{CFU/กรัม}$ ซึ่งปริมาณเชื้อลดลงเพียงเล็กน้อยจนถึงวันสุดท้ายของการทดลองคือวันที่ 28 ส่วนปริมาณ *S. aureus* ในตัวอย่างที่เติมกรดไขมัน พบว่าปริมาณ *S. aureus* เริ่มต้นในตัวอย่างมีประมาณ $5.4 \log \text{CFU/กรัม}$ และจำนวนเชื้อลดลงมากในวันที่ 1 อย่างไรก็ตามปริมาณเชื้อที่ลดลงไม่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม เมื่อเวลาผ่านไปจำนวนเชื้อค่อนข้างคงที่ โดยในวันที่ 28 มีจำนวนเชื้อประมาณ $4.6 \log$

CFU/กรัม ส่วนตัวอย่างเนื้อปลาทุปรงรสนึงสุกที่ไม่ได้เติม *S. aureus* และกรดไขมัน ตรวจไม่พบ *S. aureus*

จากภาพที่ 13 พบว่าจำนวน *B. cereus* ในตัวอย่างอาหารที่ไม่ได้เติมกรดไขมันมีจำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 5.3 log CFU/กรัม ซึ่งเชื้อเริ่มลดลงในวันที่ 1-3 จากนั้นจำนวนเชื้อจะค่อนข้างคงที่ และลดลงเพียงเล็กน้อย โดยในวันที่ 28 มีเชื้อจำนวน 3.7 log CFU/กรัม ส่วนจำนวน *B. cereus* ในตัวอย่างที่เติมกรดไขมัน พบว่ามีจำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 5 log CFU/กรัม และในวันที่ 1 เชื้อลดลงอย่างมาก คือมีจำนวน 3 log CFU/กรัม จากนั้นจำนวนเชื้อค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 28 (3 log CFU/กรัม) นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวน *B. cereus* ในอาหารที่เติมกรดไขมันลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (อาหารที่ไม่ได้เติมกรดไขมัน) ยกเว้นวันที่ 2 ส่วนตัวอย่างเนื้อปลาทุปรงรสนึงสุกที่ไม่ได้เติม *B. cereus* และกรดไขมัน ตรวจไม่พบ *B. cereus*

จากภาพที่ 14 พบว่าจำนวน *B. subtilis* ในตัวอย่างอาหารที่ไม่ได้เติมกรดไขมันมีจำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 6.6 log CFU/กรัม เมื่อเวลาผ่านไปจำนวนเชื้อค่อยๆ ลดลงเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 14 จากนั้นเชื้อเพิ่มจำนวนขึ้นเพียงเล็กน้อย และในวันที่ 28 มีจำนวนเชื้อประมาณ 3.8 log CFU/กรัม ส่วนจำนวนเชื้อในตัวอย่างที่เติมกรดไขมัน พบว่ามีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 5.5 log CFU/กรัม จากนั้นจำนวนเชื้อลดลงอย่างมากในวันที่ 1 จากนั้นปริมาณเชื้อจะขึ้นๆ ลงๆ ในวันที่ 28 มีจำนวนเชื้อประมาณ 2.6 log CFU/กรัม นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวน *B. subtilis* ในอาหารที่เติมกรดไขมันลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (อาหารที่ไม่ได้เติมกรดไขมัน) ยกเว้นวันที่ 3 และ 4 ส่วนตัวอย่างเนื้อปลาทุปรงรสนึงสุกที่ไม่ได้เติม *B. subtilis* และกรดไขมัน ตรวจไม่พบ *B. subtilis*

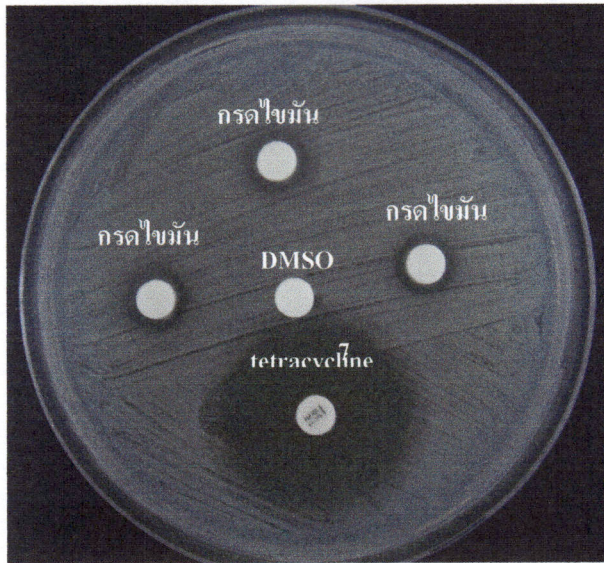
ตารางที่ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone ของกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ และคัสต์ยาปฏิชีวนะต่อการเจริญของเชื้อทดสอบจำนวน 6 ชนิด

แบคทีเรีย	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร) ±SD*		
	ยาปฏิชีวนะ	กรดไขมัน (ความเข้มข้น 50% v/v 20 ไมโครลิตร)	DMSO (20 ไมโครลิตร)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	25.16±0.28	10.67 ± 0.50	NZ
<i>B. subtilis</i>	26.33±0.06	9.00±0.00	NZ
<i>B. cereus</i>	20.33±0.06	8.33±0.50	NZ
<i>E. coli</i>	22.00±0.00	NZ	NZ
<i>Salmonella</i> spp.	23.5±0.50	NZ	NZ
<i>Shigella</i> spp.	24.16±0.28	NZ	NZ

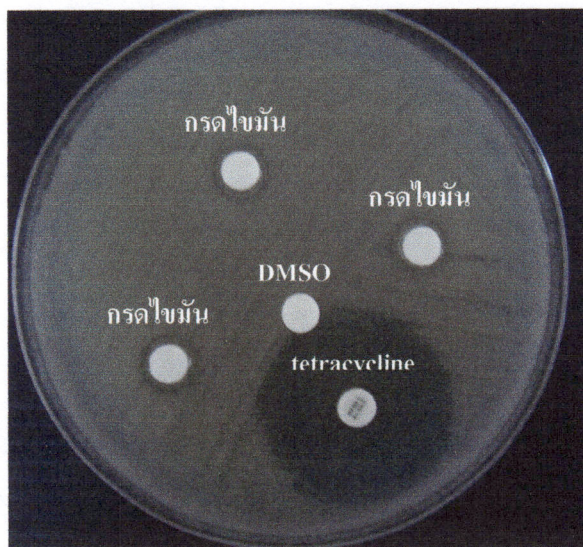
หมายเหตุ : NZ หมายถึง ไม่มี Inhibition zone

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของกรดไขมันต่อการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

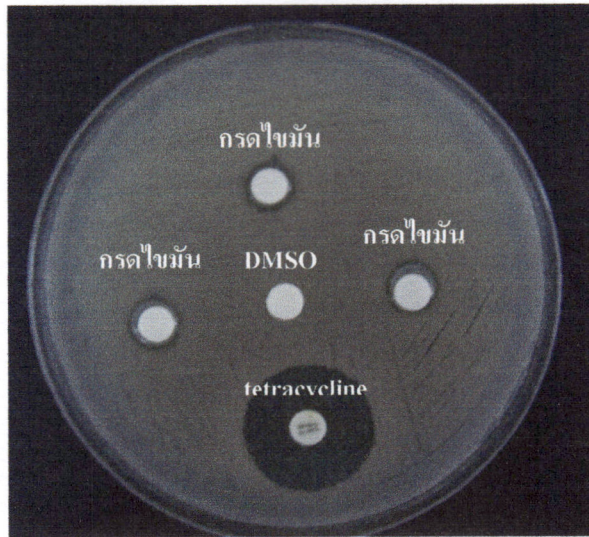
แบคทีเรีย	MIC ของกรดไขมัน (% v/v)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.04
<i>B. subtilis</i>	0.04
<i>B. cereus</i>	0.04
<i>E. coli</i>	>2.5
<i>Salmonella</i> spp.	>2.5
<i>Shigella</i> spp.	>2.5



ภาพที่ 2 ลักษณะ Inhibition zone ของกรดไขมัน (ความเข้มข้น 50% v/v ปริมาตร 20 ไมโครลิตร)
ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923



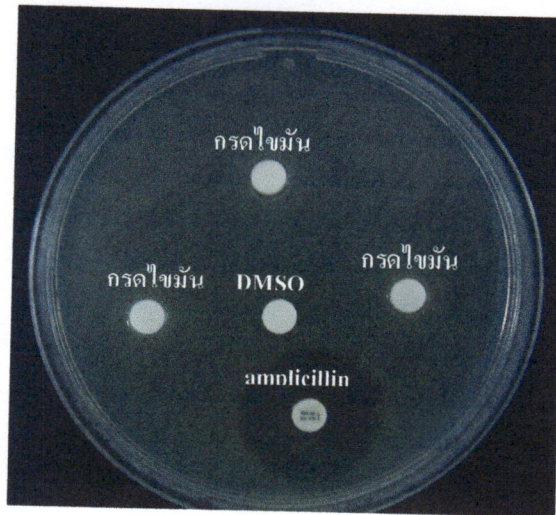
ภาพที่ 3 ลักษณะ Inhibition zone ของกรดไขมัน (ความเข้มข้น 50% v/v ปริมาตร 20 ไมโครลิตร)
ในการยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis*



ภาพที่ 4 ลักษณะ Inhibition zone ของกรดไฉมัน (ความเข้มข้น 50% v/v ปริมาตร 20 ไมโครลิตร) ในการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus*



ภาพที่ 5 ประสิทธิภาพของกรดไฉมัน (ความเข้มข้น 50% v/v ปริมาตร 20 ไมโครลิตร) ในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli*



ภาพที่ 6 ประสิทธิภาพของกรดไฉมัน (ความเข้มข้น 50% v/v ปริมาตร 20 ไมโครลิตร) ในการยับยั้งการเจริญของ *Shigella* spp.



ภาพที่ 7 ประสิทธิภาพของกรดไฉมัน (ความเข้มข้น 50% v/v ปริมาตร 20 ไมโครลิตร) ในการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* spp.



ภาพที่ 8 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของกรดไขมัน ความเข้มข้น 0.02% v/v ต่อเชื้อทดสอบด้วยวิธี agar dilution

1-2 : *S. aureus* ATCC 25923

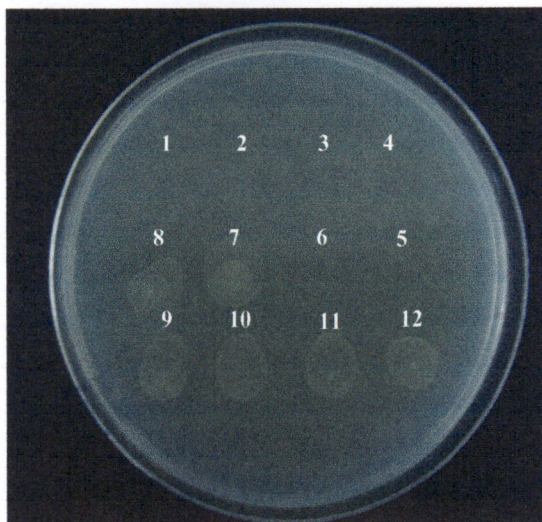
7-8 : *E. coli*

3-4 : *B. subtilis*

9-10 : *Salmonella* spp.

5-6 : *B. cereus*

11-12 : *Shigella* spp.



ภาพที่ 9 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของกรดไขมัน ความเข้มข้น 0.04% v/v ต่อเชื้อทดสอบด้วยวิธี agar dilution

1-2 : *S. aureus* ATCC 25923

7-8 : *E. coli*

3-4 : *B. subtilis*

9-10 : *Salmonella* spp.

5-6 : *B. cereus*

11-12 : *Shigella* spp.



ภาพที่ 10 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของกรดไขมัน ความเข้มข้น 0.08% v/v ต่อเชื้อทดสอบด้วย
วิธี Agar dilution

1-2 : *S. aureus* ATCC 25923

3-4 : *B. subtilis*

5-6 : *B. cereus*

7-8 : *E. coli*

9-10 : *Salmonella* spp.

11-12 : *Shigella* spp.



ภาพที่ 11 ผลของ DMSO ต่อการเจริญของเชื้อทดสอบด้วยวิธี Agar dilution

1-2 : *S. aureus* ATCC 25923

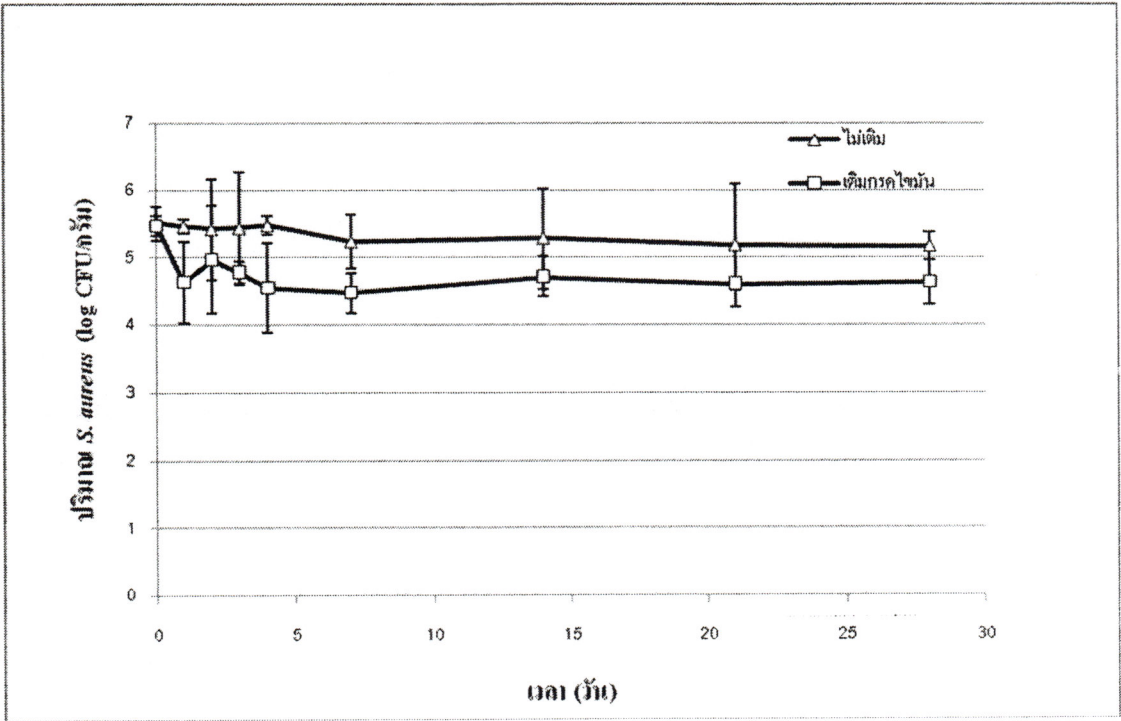
3-4 : *B. subtilis*

5-6 : *B. cereus*

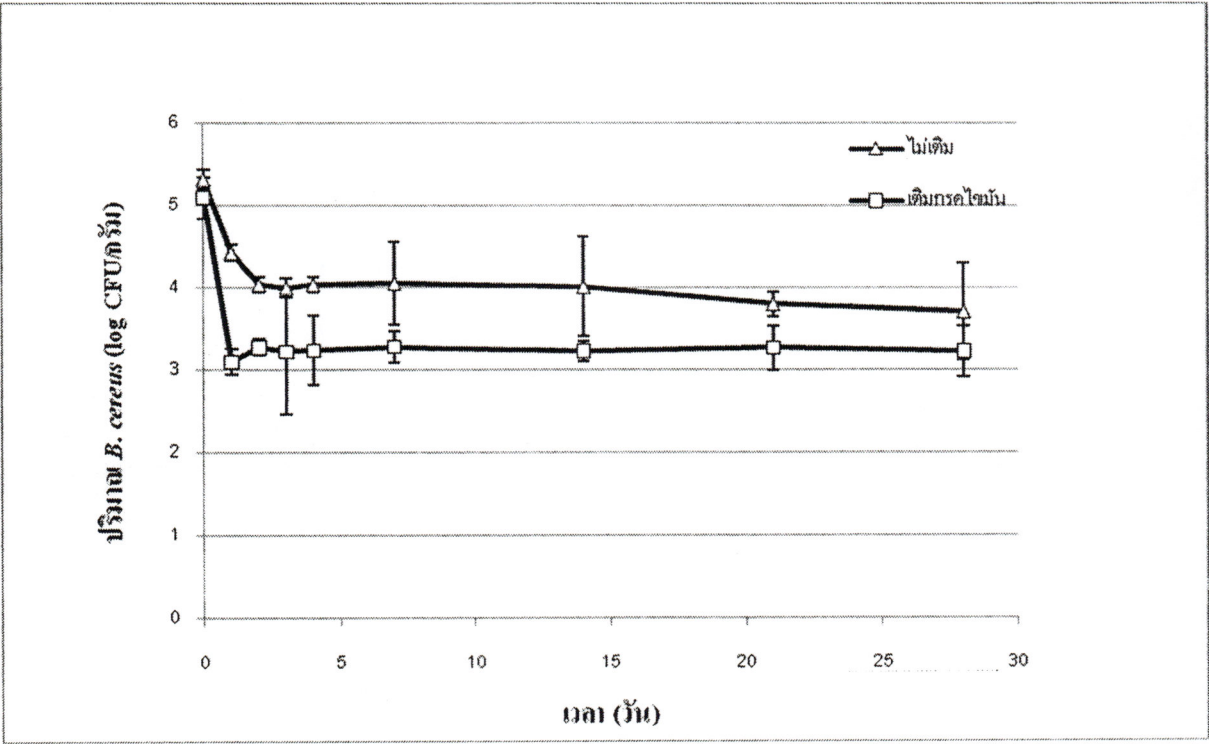
7-8 : *E. coli*

9-10 : *Salmonella* spp.

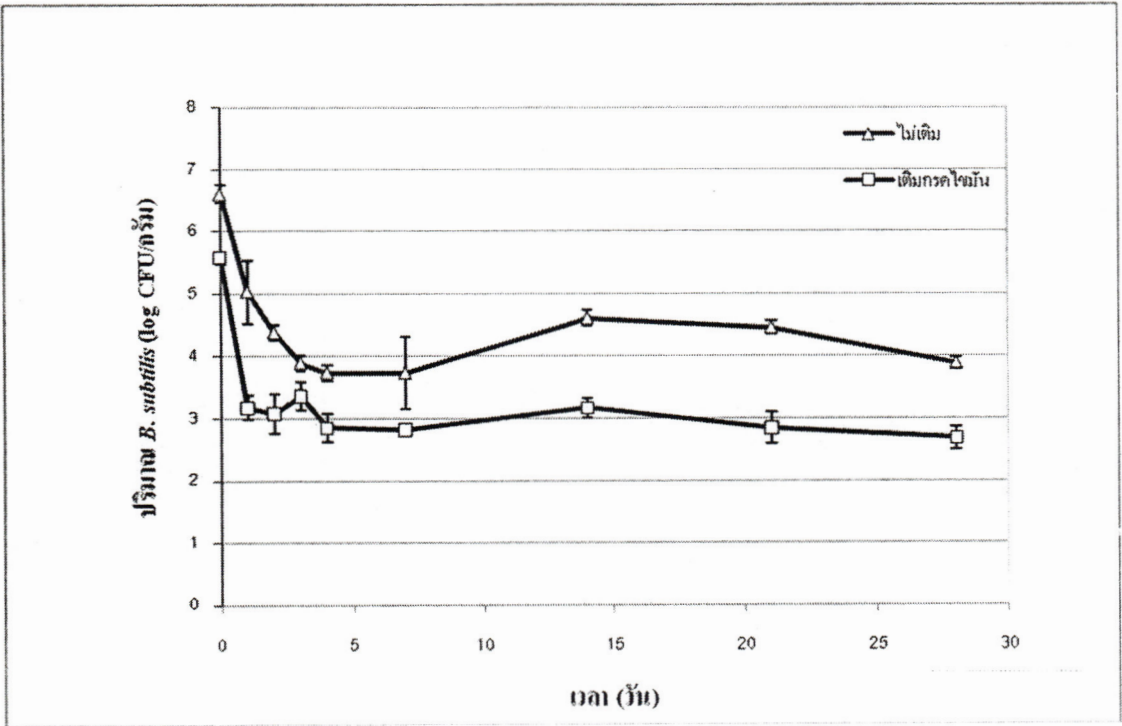
11-12 : *Shigella* spp.



ภาพที่ 12 จำนวน *S. aureus* ในอาหารที่ไม่เติมและเติมกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวหลังจากนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ



ภาพที่ 13 จำนวน *B. cereus* ในอาหารที่ไม่เค็มและเค็มกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวหลังจากนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ



ภาพที่ 14 จำนวน *B. subtilis* ในอาหารที่ไม่เติมและเติมกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวหลังจากนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ

4. ศึกษาคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ของอาหารที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นส่วนประกอบ

จากการตรวจหาจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างอาหาร 4 ชนิดที่เติมและไม่เติมน้ำมันมะพร้าว จำนวน 8 ตัวอย่าง ให้ผลการดังตารางที่ 3 ซึ่งพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (aerobic plate count) ในตัวอย่างอาหารที่เติมและไม่เติมน้ำมันมะพร้าวไม่แตกต่างกัน และปริมาณเชื้อที่พบขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารที่นำมาตรวจวิเคราะห์

ตารางที่ 3 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (aerobic plate count) ในตัวอย่าง 4 ชนิด จำนวน 8 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหาร PCA (CFU/กรัม)
1	โยเกิร์ตธรรมชาติที่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ 20%	4.7×10^8
2	โยเกิร์ตธรรมชาติที่ไม่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์	3.3×10^8
3	น้ำสลัดชนิดข้นที่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ 26%	2.4×10^4
4	น้ำสลัดชนิดข้นที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง 26%	$<10^3$
5	ไส้กรอกเปรี้ยวที่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ 20%	6.0×10^7
6	ไส้กรอกเปรี้ยวที่ไม่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์	7.9×10^7
7	น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ผสมกระเทียม 16%	$<10^3$
8	น้ำมันถั่วเหลืองผสมกระเทียม 16%	$<10^3$

เมื่อทำการตรวจหาโคลิฟอร์มและ *E. coli* ในตัวอย่างด้วยวิธี MPN ให้ผลดังตารางที่ 4 ซึ่งพบว่าตรวจพบโคลิฟอร์มในตัวอย่างไส้กรอกเปรี้ยวที่เติมและไม่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ >1100 MPN/กรัม อย่างไรก็ตามไม่มีตัวอย่างใดตรวจพบ *E. coli*

ตารางที่ 4 ปริมาณโคลิฟอร์มในตัวอย่างอาหาร (MPN/กรัม)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	ปริมาณโคลิฟอร์ม (MPN/กรัม)
1	โยเกิร์ตธรรมชาติที่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ 20%	0
2	โยเกิร์ตธรรมชาติที่ไม่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์	0
3	น้ำสลัดชนิดข้นที่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ 26%	0
4	น้ำสลัดชนิดข้นที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง 26%	0
5	ไส้กรอกเปรี้ยวที่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ 20%	>1100
6	ไส้กรอกเปรี้ยวที่ไม่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์	>1100
7	น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ผสมกระเทียม 16%	0
8	น้ำมันถั่วเหลืองผสมกระเทียม 16%	0

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของกรดไขมันที่แยกได้จากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจำนวน 6 ชนิด ด้วยวิธี disc diffusion พบว่ากรดไขมัน (50% v/v ปริมาตร 20 ไมโครลิตร) สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* และ *B. cereus* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone เท่ากับ 10.67 ± 0.50 , 9.00 ± 0.00 และ 8.33 ± 0.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อนำกรดไขมันมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ต่อเชื้อทดสอบทั้งหมด ด้วยวิธี Agar dilution พบว่าค่า MIC ของกรดไขมันต่อ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* และ *B. cereus* เท่ากับ 0.04% v/v ส่วนค่า MIC ของกรดไขมันต่อ *E. coli*, *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. เท่ากับ >2.5% v/v และจากการทดสอบฤทธิ์ต้าน *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* และ *B. cereus* ของกรดไขมัน (0.4%) ในตัวอย่างอาหาร พบว่าจำนวน *S. aureus* ATCC 25923 ลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ส่วนจำนวน *B. subtilis* และ *B. cereus* ในอาหารที่เติมกรดไขมันลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม จากการศึกษาคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ของอาหารที่มีน้ำมันมะพร้าวเป็นส่วนประกอบ ซึ่งได้แก่ โยเกิร์ตธรรมชาติ น้ำสลัดชนิดข้น ไข่กรอกเปรี้ยว และกระเทียม โดยทำการตรวจวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ทั้งหมด (aerobic plate count) โคลิฟอร์มและ *E. coli* พบว่า จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างอาหารที่เติมและไม่เติมน้ำมันมะพร้าวไม่แตกต่างกัน และตรวจพบการปนเปื้อนโคลิฟอร์มในตัวอย่างไข่กรอกเปรี้ยวที่เติมและไม่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ (>1100 MPN/กรัม) และ ไม่มีตัวอย่างอาหารตรวจพบ *E. coli*

อภิปรายผลการทดลอง

มะพร้าวเป็นพืชพื้นเมืองของไทย และคนไทยได้นำมะพร้าวมาใช้ประโยชน์จากทุกส่วนของต้น น้ำมันมะพร้าวเป็นน้ำมันพืชถูกทำมาใช้ตั้งแต่สมัยโบราณ โดยนำมาใช้รักษาโรคต่างๆ ซึ่งน้ำมันมะพร้าวประกอบด้วยกรดไขมันหลายชนิด รวมทั้งสารอื่นๆ ที่มีประโยชน์ เช่น วิตามินอี เป็นต้น มีรายงานว่ากรดไขมันสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ การทดลองในครั้งนี้ได้นำกรดไขมันที่แยกได้จากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจำนวน 6 ชนิด พบว่ากรดไขมันสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* และ *B. cereus* ได้ สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบกรดไขมันสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และยีสต์ได้ โดยพบว่าสามารถยับยั้ง *H. pylori* (Bergsson et al., 2002), Streptococci group A, และ

Streptococci group B, *S. aureus* (Bergsson *et al.*, 2001b), *Neisseria gonorrhoeae* (Bergsson *et al.*, 1999), *Candida albicans* (Bergsson *et al.*, 2001a) และ *Listeria monocytogen* (Wang & Johnson, 1992) นอกจากนี้ยังพบว่ากรดไขมันสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้อีกด้วย (Bergsson *et al.*, 1999) มีการศึกษาพบว่าน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์สามารถยับยั้ง *Candida* ที่แยกได้จากผู้ป่วยได้ (Ogbolu *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามการทดลองในครั้งนี้พบว่าน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่สกัดด้วยวิธีบีบเย็นไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ อาจเนื่องมาจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มีกรดไขมันหรือสารอื่นที่มีฤทธิ์ด้านจุลชีพในระดับความเข้มข้นต่ำทำให้ไม่สามารถยับยั้งจุลชีพได้จากการหาค่า MIC ของกรดไขมันต่อเชื้อทดสอบ พบว่า กรดไขมันมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* และ *B. cereus* เท่ากัน (MIC เท่ากับ 0.04% v/v) สำหรับกลไกการยับยั้งจุลชีพของกรดไขมัน (monocarpic acid) พบว่าเกิดจากกรดไขมันไปทำลายเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียถูกทำลาย

การควบคุมการปนเปื้อนและการแพร่ระบาดของโรคที่เกิดจากการบริโภคอาหารสามารถได้โดยใช้ความร้อน รวมทั้งการให้สารกันเสียในผลิตภัณฑ์ต่างๆ อย่างไรก็ตามอาหารที่ผ่านความร้อนแล้วก็มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อได้อีกหากเก็บรักษาไม่ดี ส่วนสารกันเสียแม้จะลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารได้ แต่สารกันเสียต่างๆ ที่นำมาใช้อาจมีผลข้างเคียงกับผู้บริโภคได้ ซึ่งในปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญกับความปลอดภัยของอาหารที่นำมาบริโภคมากขึ้น ดังนั้นสารจากธรรมชาติจึงถูกนำมาใช้ถนอมอาหารมากยิ่งขึ้น นอกจากจะช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารแล้ว สารจากธรรมชาติยังมีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภคด้วย เฉพาะนั้นอุตสาหกรรมอาหาร จึงนิยมนำสารสกัดจากธรรมชาติมาให้เป็นส่วนประกอบของอาหาร เพื่อเป็นการลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารอีกทางหนึ่งด้วย

การศึกษาประสิทธิภาพของสารจากธรรมชาติต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในหลอดทดลองเท่านั้น อย่างไรก็ตามมีบางการศึกษาได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารจากธรรมชาติต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร โดยพบว่าสารสกัดจากเปลือกผลทับทิมที่เติมลงไปนใน meat pate ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ได้ 4.1 log CFU/กรัม เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในวันที่ 18 (Hayrapetyan *et al.*, 2012) พบว่าน้ำมันหอมระเหยชนิด lemon flavor ที่เติมลงไปนในซ็อกโกเลตที่เก็บที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ได้ (Kotzekidou *et al.*, 2008) น้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร สามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* ที่ใส่ลงไปนเนื้อไก่บด (Hoque *et al.*, 2008) เป็นต้น ส่วนผลการทดลองในครั้งนี้พบว่ากรดไขมันที่เติมลงไปนในอาหารสามารถลดจำนวน *S. aureus* ATCC 25923 ได้เพียงเล็กน้อย แต่สามารถลดจำนวน *B. cereus* และ *B. subtilis*

ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวบีบเย็นอาจจะสามารถใช้เป็นสารกันเสียในอุตสาหกรรมอาหารได้

ผลจากการวิเคราะห์คุณภาพด้านจุลชีววิทยาของอาหารที่เติมและไม่เติมน้ำมันมะพร้าว พบว่ามีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่แตกต่างกัน (aerobic plate count) อาจเนื่องมาจากน้ำมันมะพร้าวมีปริมาณกรดไขมันต่ำจึงไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในอาหารได้ ส่วนปริมาณจุลินทรีย์ที่ตรวจพบจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร เนื่องจากอาหารแต่ละชนิดมีส่วนประกอบแตกต่างกันจึงมีผลต่อปริมาณจุลินทรีย์ในอาหาร และพบว่าตัวอย่างไส้กรอกเปรี้ยวที่เติมและไม่เติมน้ำมันมะพร้าวมีการปนเปื้อนโคลิฟอร์ม ซึ่งการปนเปื้อนอาจมาจากวัตถุดิบที่เป็นส่วนประกอบของไส้กรอกมีโคลิฟอร์มปนเปื้อนอยู่ โดยโคลิฟอร์มพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น พืชผัก น้ำ อาหารดิบ เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบโคลิฟอร์มบางชนิดโดยเฉพาะ *E. coli* ได้ในทางเดินอาหารและลำไส้ของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่ง *E. coli* เป็นดัชนีของการปนเปื้อนจากอุจจาระ ผลการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบการปนเปื้อนของ *E. coli* ในตัวอย่างอาหารที่นำมาตรวจ แสดงว่าอาหารที่นำมาทดลองไม่มีการปนเปื้อนเชื้อจากอุจจาระ ซึ่งการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อน *E. coli* อาจทำให้ผู้บริโภคเป็นอันตรายเนื่องจาก *E. coli* บางสายพันธุ์สามารถก่อโรคได้ เช่น โรคอุจจาระร่วง โรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ โรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ กรวยไตอักเสบ นิ้วในโต เป็นต้น

จะเห็นได้ว่ากรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียบางชนิดทั้งในหลอดทดลองและในอาหาร ดังนั้นในการศึกษาในอนาคต จึงควรนำกรดไขมันจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์มาศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย รวมทั้งนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคนิคมอื่น ๆ และนำไปประยุกต์ใช้กับอาหารชนิดอื่น ๆ เช่น นม เป็นต้น เพื่อใช้เป็นสารกันเสียทำให้อาหารมีอายุการเก็บสูงขึ้น อีกทั้งยังมีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภคด้วย

เอกสารอ้างอิง

- ณรงค์ โฉมเฉลา. (2548). บทบาทของน้ำมันมะพร้าวต่อสุขภาพ และความงาม. ในการประชุม
วิชาการ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทย และการแพทย์ทางเลือก. กรุงเทพฯ: สถาบัน
การแพทย์แผนไทย
- ณรงค์ โฉมเฉลา. (2551). น้ำมันมะพร้าวป้องกันโรคหัวใจได้อย่างไร. กรุงเทพฯ: ชมรมอนุรักษ์และ
พัฒนาน้ำมันมะพร้าวแห่งประเทศไทย.
- ณรงค์ โฉมเฉลา. (2552). มาใช้กะทิแทนนมกันเถอะ. กรุงเทพฯ: ชมรมอนุรักษ์และพัฒนาน้ำมัน
มะพร้าวแห่งประเทศไทย.
- ภักตร์ชัย กิรติสิน. (2549). ตำราวิทยาทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. (2547). แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ NOBLE PRINT.
- นันทนา อรุณฤกษ์. (2537). การจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรบัส. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- บุญกร อุดรภิชาดิ. (2545). จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพฯ: การผลิตเอกสารและตำรา
มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- มาลิน จุลศิริ. (2540). ยาด้านจุลชีพ: ความรู้พื้นฐานและการประยุกต์. กรุงเทพฯ: ภาควิชา
จุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล.
- ลลิตา อัคนโธ. (2548). น้ำมันมะพร้าวบิบบิ้นคุณภาพสูง. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 20(2),
67-72.
- สุมาลี เหลืองสุนทร. (2539). จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย
ศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร.
- ศิริโฉม หุ่นแก้ว. (2550). ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร. ชลบุรี: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- อิสยา จันทรวินยานุชิต และวัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์. (2551). แบคทีเรียทางการแพทย์. กรุงเทพฯ:
สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Bartolatta, S., Garcia, C.C., Candurra, N.A., and Damonte, E.B. (2001). Effect of fatty acids on
arenavirus replication: inhibition of virus production by lauric acid. *Archives of Virology*,
146, 777-790.
- Bergsson, G., Arnfinnsson, J., Karlsson, S.M., Steingrimsen, O., and Thormar, H. (2001a). *In*
vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. *Antibacterial agents*

- and chemotherapy, 45, 3209-3212.
- Bergsson, G., Arnfinnsson, J., Steingrimsen, O., and Thormar, H. (2001b). Killing of gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *APMIS*, 109, 670-678.
- Bergsson, G., Steingrimsen, O., and Thormar, H. (1999). *In vitro* susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* to fatty acids and monoglycerides. *Antibicrobial agents and chemotherapy*, 43, 2790-2792.
- Bergsson, G., Steingrimsen, O. and Thormar, H. (2002). Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylori*. *International Journal of Antimicrobial agents*, 20, 258-262.
- Collins, C. H., Lyne, P. M., Grange, J. M., and Falkinham, J. O. (2004). *Collins and Lyne's microbiological methods*. London: Arnold.
- Ekwenye, U.N., and Ijeomah, C.A. (2005). Antimicrobial effects of palm kernel oil and palm oil. *KMITL Science Journal*, 5(2), 502-505.
- Hayrapetyan, H., Hazeleger, W.C., and Beumer, R.R. (2012). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat pate at different temperature. *Food control*, 23, 66-72.
- Hinton, A. Jr., and Ingram, K.D. (2005). Microbicidal activity of triotassium phosphate and fatty acid toward spoilage and pathogenic bacteria associated with poultry, *Journal of food protection*, 68, 1462-1466.
- Hoque, Md. M., Bari, M. L., Juneja, V.K., and Kawamoto, S. (2008). Antimicrobial activity of Cloves and Cinnamon extracts against food borne pathogens and spoilage bacteria, and inactivation of *Listeria monocytogenes* in ground chicken meat with their Essential oils. *Rep. National Food Research Institute*, 72, 9-21.
- Kabara, J.J., Swieczkowske, D.M., Conley, A.J., and Truant, J.P. (1972). Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents Chemotherrpy*, 2, 23-28.
- Kotzekidou, P., Giannakidis, P., and Boulamatssis, A. (2008). Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 119-129.
- Marina, A. M., Che-Man, Y. B., and Amin, I. (in press). Virgin coconut oil: Emerging functional food oil. *Journal of Food Science & Technology*.

- Ogbolu, D.O., Oni, A.A., Daini, O.A., and Oloko, A.P. (2007). *In vitro* antimicrobial properties of coconut oil on *Candida* species in Ibadan, Nigeria. *Journal of Medicinal Food*, 10(2), 328-387.
- Petschow, B. W., Batema, R.P., Talbott, R.D., and Ford, L.L. (1998). Impact of medium-chain monoglycerides on intestinal colonisation by *Vibrio cholerae* or enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Medicinal Microbiology*, 47, 383-389.
- Wang, L.L., and Johnson, E.A. (1992). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Fatty Acids and Monoglycerides. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(2), 624-629.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ปริมาณของกรดไขมันที่สกัดได้ (AOAC Da 14-48)

ปริมาณของกรดไขมัน (AOAC Da 14-48)

สารเคมี

- โซดาไฟ 0.5 โมล
- แอทิลแอลกอฮอล์ 95% โดยปริมาตร เตรียมโดยเติมฟีนอล์ฟทาลีน 3-5 หยดทำให้เดือดและทำให้เป็นกลาง โดยใช้สารละลายโซดาไฟ 0.1-0.2 โมลต่อลิตร
- ฟีนอล์ฟทาลีน อินดิเคเตอร์ 1% ใน แอลกอฮอล์ 95%

ชั่งน้ำมันตัวอย่าง 2 กรัม เติมแอทิลแอลกอฮอล์ขณะร้อนและมีสภาพเป็นกลาง 20-30 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ขณะร้อนมาไตรเตรทกับสารละลายโซดาไฟ 0.5 โมลต่อลิตรโดยใช้ ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ หยดเพียง 0.5 มิลลิลิตร ขณะที่เขย่ากับโซดาไฟ 0.5 โมลต่อลิตร คูให้สีคงอยู่ประมาณ 30 วินาที อ่านค่าที่ได้

ตัวอย่างการคำนวณ

สารละลายกรดไขมัน 30 ml. ทำปฏิกิริยาสมมูลกับสารละลายโซดาไฟ 0.5 โมลต่อลิตร 18.5 ml. ดังนั้นสามารถคำนวณความเข้มข้นของกรดไขมันจาก

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$0.5 \times 18.5 = \text{ความเข้มข้นของสารละลายกรดไขมัน} \times 30$$

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายกรดไขมัน} = 0.308 \text{ โมลต่อลิตร}$$

สารละลายเข้มข้น 0.308 โมลต่อลิตร ปริมาณ 30 มิลลิลิตรใช้ กรดไขมัน 2 กรัม ถ้าต้องการเตรียมสารละลายจำนวน 1 ลิตรจึงต้องใช้กรดไขมันปริมาณ 66.67 กรัม และคำนวณหามวลโมเลกุลเฉลี่ยของกรดไขมันได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายกรดไขมัน (โมล)} = \frac{\text{น้ำหนัก (กรัม)}}{\text{มวลโมเลกุลเฉลี่ยของกรดไขมัน}}$$

ดังนั้นมวลโมเลกุลเฉลี่ยของกรดไขมัน = $66.667/0.308$

$$= 216.45$$

ภาคผนวก ข
ชนิดของกรดไขมันที่สกัดได้จากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์แบบบีบเย็น

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบกรดไขมันที่สกัดจากน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์แบบบีบเย็น

ชนิดของกรดไขมัน	ปริมาณที่พบในตัวอย่างกรดไขมันสกัด (g/100g) จากน้ำมันมะพร้าวบีบเย็น	วิธีทดสอบอ้างอิง
Fatty acid Composition		Inhouse method base on AOAC
Saturated fat	92.64	(2005) 996.06
Trans fat	Not Deteced	
Unsaturated fat	7.36	
Polyunsaturated fat	6.21	
Monounsaturated fat	1.15	
Butyric acid (C4:0)	Not Deteced	
Caproic acid (C6:0)	0.48	
Caprylic acid (C8:0)	7.02	
Capric acid (C10:0)	5.50	
undecanoic acid (C11:0)	0	
Lauric acid (C12:0)	47.47	
Tridecanoic acid (C13:0)	0	
Myristic acid (C14:0)	19.45	
Palmitic acid (C16:0)	9.53	
Steric acid(C16:0)	3.19	
Oleic acid(C16:0)	6.21	
Linoleic acid(C18:2n6c)	0	
Arachidic acid(C20:0)	0	
cis-11-Eicosenoic acid(C20:1)	0	
Linoceric acid(C24:0)	0	

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Mueller-Hinton Agar (MHA)

ชั่งอาหารสำเร็จรูป MHA 38 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ต้มจนวุ้นละลาย แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. Tryptic soy broth (TSB)

Tryptic Soy broth	17	กรัม
Soytone	3.0	กรัม
Dextrose	2.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Dipotassium Phosphate	2.5	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ต้มจนสารละลายใส แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. Nutrient agar (NA)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ต้มจนวุ้นละลาย นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. Plate Count Agar (PCA)

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PCA 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121-124 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

5. Baird Parker Egg - Yolk Tellutite (BPEY) agar

ส่วนประกอบ

Baird Parker agar หลอมเหลว	1000	มิลลิลิตร
(ปราศจากเชื้อและอุณหภูมิตั้งที่ 45- 50 องศาเซลเซียส)		
Potassium Tellurite เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์	12.22	มิลลิลิตร
Egg- yolk emulsion	60	มิลลิลิตร

ผสมส่วนประกอบให้เข้ากันแล้วเทใส่จานเพาะเชื้อ

2.1 Baird Parker agar หลอมเหลว

ละลายส่วนผสมของอาหารสำเร็จรูป Baird Parker agar 63 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปให้ความร้อนจนหลอมละลาย แล้วฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิ 45- 50 องศาเซลเซียส

2.2 Potassium Tellurite เข้มข้น 1% (ศิริ โฉม พุ่งแก้ว, 2554)

ส่วนประกอบ

Potassium Tellurite	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ชั่ง Potassium Tellurite 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร
กำจัดเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน

2.3 Egg- yolk emulsion (ศิริ โฉม พุ่งแก้ว, 2554)

ส่วนประกอบ

ไข่แดง	1	ส่วน
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	4	ส่วน

แช่ไข่ในเอทานอลเข้มข้น 70% นาน 1 ชั่วโมง เพื่อกำจัดเชื้อที่เปลือก แยกไข่แดงออกจากไข่ขาวโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 4 ส่วนลงในไข่แดง 1 ส่วน ผสมให้เข้ากัน หากยังไม่ใช้ให้เก็บในตู้เย็น

6. Lauryl sulphate tryptose (LST) broth

ชั่งอาหารสำเร็จรูป LST broth 35.6 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ และละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร คนให้ละลายเข้ากัน จากนั้นดูดใส่หลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร และใส่หลอดคั่นก๊าสหลอดละ 1 อัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. Brilliant green lactose bile (2 %) (BGLB) broth

ซั่งอาหารสำเร็จรูป BGLB broth 2% 40 กรัมใส่ในบีกเกอร์ และละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร คนให้ละลายเข้ากัน จากนั้นดูดใส่หลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร และใส่หลอดคักก๊าซหลอดละ 1 อัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. Mannitol Egg Yolk Phenol Red Polymyxin (MYP) Agar

ส่วนผสมพื้นฐาน

Meat extract	1.0	กรัม
Peptone from casein	10.0	กรัม
D (-) Mannitol	10.0	กรัม
Phenol red (1% in 95% ethanol)	2.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	900	มิลลิลิตร

พีเอช 7.2 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ต้มจนวุ้นละลาย ฆ่าเชื้อและทำให้มีอุณหภูมิ 45- 50 องศา

เซลเซียส

ส่วนผสมเพิ่มเติม

1. สารละลาย polymyxin B

เตรียม polymyxin sulfate 500,000 IU ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร กรองสารละลายยาผ่านแผ่น

กรองขนาดช่อง 0.45 ไมครอน เพื่อกำจัดเชื้อ จะได้สารละลายยาเข้มข้น 50,000 IU/ml

2. Egg yolk emulsion

แช่ไข่ไก่ใน ethanol 70% นาน 1 ชั่วโมง ทำให้แตกโดยเทคนิคปลอดเชื้อ แยก

เฉพาะไข่แดงในภาชนะปลอดเชื้อ ผสมไข่แดงในสารละลาย Nacl เข้มข้น 0.85% ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ทำให้เข้ากัน

วิธีผสมเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อครบสูตร

เติมสารละลาย polymyxin B 2 มิลลิลิตร (มีเนื้อ polymyxin 100,000 IU) และ Egg-yolk emulsion 100 มิลลิลิตร ในส่วนผสมพื้นฐาน (ฆ่าเชื้อและทำให้มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส) 900

มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี polymyxin 100,000 IU ต่อลิตร (หรือ 100 IU ต่อ มิลลิลิตร) เทใส่จานเพาะเชื้อ

10. EC Broth

ชั่งอาหารสำเร็จรูป EC broth 37 กรัมใส่ในบีกเกอร์ และละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำ กลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร คนให้ละลายเข้ากัน จากนั้นควักใส่หลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร และใส่หลอดคั่นก๊าซหลอดละ 1 อัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วย เครื่อง autoclave ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

11. McFarland Standard No. 0.5

Sulfuric acid 1%	0.05	มิลลิลิตร
------------------	------	-----------

Barium chloride 1.175%	9.95	มิลลิลิตร
------------------------	------	-----------

ผสมสารละลาย Sulfuric acid 1% ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร และสารละลาย Barium chloride 1.175% ปริมาตร 9.95 มิลลิลิตร ผสมสารทั้งสองชนิดเข้าด้วยกันในหลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 16x150 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มีกระวังอย่าให้ถูกแสง

12. NaCl 0.85%

ชั่ง NaCl 0.85 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

13. ยาปฏิชีวนะ Tetracycline

ชั่งยาปฏิชีวนะ Tetracycline 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น สุดท้าย 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรองด้วยหัวกรอง 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำยาที่ผ่านการกรองมา 3,200 ไมโครลิตร (32 มิลลิลิตร) เจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 6,800 ไมโครลิตร (6.8 มิลลิลิตร) จะได้สารละลายยาปฏิชีวนะเข้มข้น 320 ไมโครกรัม ทำการเจือจางสารละลายยาปฏิชีวนะ โดยเจือจางกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อแบบ two-fold dilution เรื่อยๆ เป็นจำนวน 6 หลอดทดลอง จะได้ความเข้มข้นของสารละลายเป็น 160, 80, 40, 20, 10 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการปิเปตสารละลายยาปฏิชีวนะปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจากนั้นเติมอาหารเลี้ยง

เชื้อ Mueller-Hinton agar หลอมเหลว จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

ภาคผนวก ง
จำนวนเชื้อในตัวอย่างอาหารที่เดิมและไม่เดิมกรดไขมัน

เมื่อเดิมเชื้อแต่ละชนิด ซึ่งได้แก่ *S. aureus*, *B. subtilis* และ *B. cereus* ลงในอาหาร จากนั้นเดิมกรดไขมันลงไป 0.4% นำอาหารไปเก็บที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส และทำการนับจำนวนเชื้อที่เวลาต่างๆ ให้ผลดังตารางที่ 6-8

ตารางที่ 6 จำนวน *B. subtilis* ในอาหารที่เดิมและไม่เดิมกรดไขมันที่เวลาต่างๆ

วันที่	ไม่เดิม			ค่าเฉลี่ย	เดิมกรดไขมัน 0.4 %			ค่าเฉลี่ย
0	4.20×10^6	4.30×10^6	4.00×10^6	4.17×10^6	3.80×10^5	3.90×10^5	3.70×10^5	3.80×10^5
1	1.10×10^5	1.20×10^5	1.00×10^5	1.10×10^5	1.30×10^3	1.70×10^3	1.60×10^3	1.53×10^3
2	2.40×10^4	2.40×10^4	2.60×10^4	2.47×10^4	1.10×10^3	9.80×10^2	1.60×10^3	1.23×10^3
3	8.00×10^3	7.80×10^3	7.80×10^3	7.87×10^3	5.00×10^3	9.00×10^2	1.20×10^3	2.37×10^3
4	5.50×10^3	5.50×10^3	5.70×10^3	5.57×10^3	8.50×10^2	8.50×10^2	4.50×10^2	7.17×10^2
7	5.40×10^3	5.50×10^3	5.50×10^3	5.47×10^3	7.60×10^2	6.80×10^2	5.50×10^2	6.63×10^2
14	4.00×10^4	4.20×10^4	4.20×10^4	4.13×10^4	1.65×10^3	1.32×10^3	1.50×10^3	1.49×10^3
21	3.00×10^4	2.80×10^4	2.93×10^4	2.91×10^4	9.90×10^2	5.10×10^2	6.00×10^2	7.00×10^2
28	7.70×10^3	7.60×10^3	7.80×10^3	7.70×10^3	6.30×10^2	2.90×10^2	5.30×10^2	4.83×10^2

ตารางที่ 7 จำนวน *S. aureus* ในอาหารที่เติมและไม่เติมกรดไขมันที่เวลาต่างๆ

วันที่	ไม่เติม			ค่าเฉลี่ย	เติมกรดไขมัน 0.4 %			ค่าเฉลี่ย
0	3.50×10^5	3.20×10^5	3.00×10^5	3.20×10^5	3.00×10^5	2.80×10^5	3.10×10^5	2.97×10^5
1	4.20×10^5	2.30×10^5	2.30×10^5	2.93×10^5	1.13×10^5	1.00×10^4	8.00×10^3	4.37×10^4
2	3.50×10^5	2.20×10^5	2.20×10^5	2.63×10^5	1.83×10^5	8.20×10^4	2.10×10^4	9.53×10^4
3	3.70×10^5	2.30×10^5	2.20×10^5	2.73×10^5	7.60×10^4	4.30×10^4	6.50×10^4	6.13×10^4
4	4.70×10^5	2.20×10^5	2.20×10^5	3.03×10^5	2.80×10^4	3.90×10^4	3.99×10^4	3.56×10^4
7	2.20×10^5	1.50×10^5	1.50×10^5	1.73×10^5	6.50×10^4	1.75×10^4	8.50×10^3	3.03×10^4
14	2.80×10^5	1.50×10^5	1.50×10^5	1.93×10^5	5.20×10^4	8.55×10^4	1.90×10^4	5.22×10^4
21	2.60×10^5	1.00×10^5	1.00×10^5	1.53×10^5	5.10×10^4	2.95×10^4	4.30×10^4	4.12×10^4
28	4.00×10^5	2.30×10^4	2.30×10^5	1.49×10^5	82000.00	1.70×10^4	3.00×10^4	4.30×10^4

ตารางที่ 8 จำนวน *B. cereus* ในอาหารที่เติมและไม่เติมกรดไขมันที่เวลาต่างๆ

วันที่	ไม่เติม			ค่าเฉลี่ย	เติมกรดไขมัน 0.4 %			ค่าเฉลี่ย
0	2.00×10^5	2.20×10^5	2.00×10^5	2.07×10^5	1.00×10^5	1.50×10^5	1.20×10^5	1.23×10^5
1	2.80×10^4	2.60×10^4	2.70×10^4	2.70×10^4	1.10×10^3	1.40×10^3	1.30×10^3	1.27×10^3
2	1.00×10^4	1.10×10^4	1.20×10^4	1.10×10^4	3.00×10^3	1.70×10^3	1.00×10^3	1.90×10^3
3	1.00×10^4	1.00×10^4	1.02×10^4	1.01×10^4	2.51×10^3	1.41×10^3	1.06×10^3	1.66×10^3
4	1.20×10^4	1.10×10^4	1.00×10^4	1.10×10^4	1.99×10^3	1.26×10^3	2.00×10^3	1.75×10^3
7	1.12×10^4	1.20×10^4	1.11×10^4	1.14×10^4	2.00×10^3	2.05×10^3	1.70×10^3	1.92×10^3
14	1.00×10^4	1.00×10^4	1.11×10^4	1.04×10^4	1.60×10^3	1.64×10^3	1.84×10^3	1.69×10^3
21	6.40×10^3	6.50×10^3	6.20×10^3	6.37×10^3	1.97×10^3	1.54×10^3	2.04×10^3	1.85×10^3
28	5.20×10^3	5.10×10^3	5.0×10^3	5.17×10^3	1610.00	1450.00	2.04×10^3	1.70×10^3

ภาคผนวก จ

ตาราง MPN

ตารางที่ 9 ค่า MPN/กรัม เมื่อเพาะตัวอย่างจากระดับความเจือจาง 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} ในอาหารเลี้ยงเชื้อระดับความเจือจางละ 3 หลอด

จำนวนหลอดผลบวกที่ระดับความเจือจาง			MPN/กรัม
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
0	0	0	<3
0	1	0	3+
1	0	0	4
1	0	1	7+
1	1	0	7
1	2	0	11+
2	0	0	9
2	0	1	14+
2	1	0	15
2	1	1	20+
2	2	0	21
3	0	0	23
3	0	1	39
3	1	0	43
3	1	1	75
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210+
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	>1100

(ที่มา : ศิริ โฉม พุ่งเป้า, 2550)

ภาคผนวก ง

ปริมาณโคลิฟอร์ม (MPN/กรัม) ในอาหาร

เมื่อทำการเพาะเชื้อจากหลอดเพาะเชื้อ LST broth ที่ให้ผลบวก ในอาหาร BGLB broth จำนวน 3 หลอด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นบันทึกผลหลอดที่เกิดก๊าซ ให้ผลดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 จำนวนผลบวกของหลอดอาหาร BGLB broth และปริมาณโคลิฟอร์ม (MPN/กรัม) ในอาหาร

ตัวอย่าง	จำนวนผลบวกหลอด BGLB			ปริมาณโคลิฟอร์ม (MPN/กรัม)
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
โยเกิร์ตธรรมชาติที่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ 20%	NT	NT	NT	0
โยเกิร์ตธรรมชาติที่ไม่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์	NT	NT	NT	0
น้ำสลัดชนิดข้นที่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ 26%	NT	NT	NT	0
น้ำสลัดชนิดข้นที่เติมน้ำมันถั่วเหลือง 26%	NT	NT	NT	0
ไส้กรอกเปรี้ยวที่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ 20%	3	3	3	>1100
ไส้กรอกเปรี้ยวที่ไม่เติมน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์	3	3	3	>1100
น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ผสมกระเทียม 16%	NT	NT	NT	0
น้ำมันถั่วเหลืองผสมกระเทียม 16%	NT	NT	NT	0

หมายเหตุ : NT หมายถึงไม่ได้ทดสอบ