สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

ประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์น้ำพริกปรุงรส

สุดารัตน์ สวนจิตร[1]
อภิรดี ปิลันธนภาคย์[1]
กุลยา ลิ้มรุ่งเรืองรัตน์[2]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา [2]ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

- 9 มี.ค. 2552
25 15 22
เริ่มบริการ
- 3 มิ.ย. 2552

โครงการวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจาก
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
ประจำปีงบประมาณ 2548

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์น้ำพริกปรุงรส" นี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี ซึ่งคณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์การวิจัยที่จำเป็น ทำให้การวิจัยสามารถดำเนินไปได้จนเสร็จสิ้นโครงการ

ขอขอบคุณ คุณสุวรรณี สาฟาฮี ผู้ช่วยโครงการวิจัย ที่ทุ่มเทกำลังกายและกำลังใจให้กับโครงการวิจัยนี้อย่างดียิ่ง ซึ่งถือเป็นส่วนหนึ่งที่มีความสำคัญยิ่งของความสำเร็จของงานวิจัยนี้ รวมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และนักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่มีส่วนในการช่วยเหลือและอำนวยความสะดวก ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ) เป็นอย่างสูง ที่ได้จัดสรรงบประมาณสำหรับโครงการวิจัยนี้ และขอขอบคุณงานส่งเสริมการวิจัย มหาวิทยาลัยบูรพา ที่อำนวยความสะดวกในการติดต่อประสานงานเป็นอย่างดี คณะผู้วิจัยหวังว่าผลงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่เกี่ยวข้องและผู้สนใจบ้างตามสมควร

สุดารัตน์ สวนจิตร
อภิรดี ปีลันธนภาคย์
กุลยา ลิ้มรุ่งเรืองรัตน์

สิงหาคม 2549

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งจุลินทรีย์ในระดับหลอดทดลองและในตัวอย่างน้ำพริกปรุงรส จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบในเบื้องต้นคือ *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Aspergillus flavus* 05-21 ซึ่งเป็นราสายพันธุ์ที่สามารถสร้างอะฟลาทอกซิน จากการศึกษาพบว่าไคโตซานสามารถยับยั้ง *B. cereus* ATCC 11778 เมื่อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อและในน้ำเกลือ (0.85%) โดยเมื่อผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ (0.05-0.5%) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของแบคทีเรียชนิดนี้ได้ อย่างไรก็ตามไคโตซานไม่สามารถทำลายสปอร์ของแบคทีเรียชนิดนี้ได้เมื่อทดสอบในน้ำเกลือ ในทางตรงกันข้ามไคโตซานมีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ *B. cereus* ATCC 11778 ในน้ำเกลือ โดยพบว่าไคโตซานสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ *B. cereus* ATCC11778 ได้ทันทีภายหลังที่มีการใส่เซลล์ลงไปทดสอบ ซึ่งพบเซลล์ถูกยับยั้งได้ประมาณ 80.60±4.50-99.89±0.00% ในขณะเดียวกันเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* 05-21 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ coconut agar และอาหารเลี้ยงเชื้อ AFPA ที่มีการเติมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าไคโตซานลดความสามารถในการมีชีวิตรอดของสปอร์รา รวมทั้งยับยั้งการเจริญของเส้นใย การงอกของสปอร์ราและความสามารถในการสร้างอะฟลาทอกซินของราสายพันธุ์ โดยพบว่ากิจกรรมการยับยั้งดังกล่าวนี้มีผลเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของไคโตซานที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบความสามารถของไคโตซานในการยับยั้ง *B. cereus* ATCC 11778 และ *A. flavus* 05-21 ที่เติมลงในน้ำพริกเผาและน้ำพริกตาแดง พบว่าการเติมไคโตซานไม่มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้ได้ นอกจากนี้ไคโตซานยังไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ประจำถิ่นได้แก่กลุ่มแบคทีเรีย ยีสต์และรา ที่พบปนเปื้อนอยู่ในน้ำพริกปรุงรสดังกล่าวได้ สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากความซับซ้อนของตัวอย่างน้ำพริก รวมถึงคุณสมบัติของไคโตซานเอง โดยเฉพาะความสามารถในการละลายและน้ำหนักโมเลกุล ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจในการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมเพื่อนำไคโตซานมาประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียในน้ำพริกปรุงรสต่อไป

ABSTRACT

The antimicrobial activity of chitosan was evaluated *in vitro* as well as in chilli paste products. *Bacillus cereus* ATCC 11778 and the aflatoxigenic *Aspergillus flavus* 05-21 were selected as models for the preliminary experiments. Addition of chitosan at various concentrations (0.05-0.5%) into Trypticase soy agar (TSA) was demonstrated to be inhibitory to bacterial spore germination. However, no lethal effect of chitosan on spore viability was observed. In contrast, chitosan was proved to be more effective against bacterial cells suspended in 0.85% normal saline, which were immediately inhibited by about 80.60±4.50-99.89±0.00%. On the other hand, the antifungal activity of chitosan against *A. flavus* 05-21 was observed. Chitosan was incorporated into either coconut agar medium or *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* agar (AFPA), and the growth as well as aflatoxin production by this fungal strain were assessed. It was found that chitosan significantly decreased fungal spore viability and also suppressed the radial growth, spore germination, and aflatoxin production of *A. flavus* 05-21. Such antifungal activities of chitosan were more pronounced at higher concentrations. However, the efficacies of chitosan supplemented into chili paste products against *B. cereus* ATCC 11778 and *A. flavus* 05-21, as well as indigenous microorganisms including bacteria, yeasts and filamentous fungi was obscured. This may be due to the complexity of food samples and the properties of chitosan itself, particularly its solubility and molecular weight. Therefore, optimization for the applicability of chitosan as a food preservative in chilli paste products was a real challenge.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

สารบัญภาพ..... จ

สารบัญตาราง..... ช

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา..... 3

รายละเอียดเกี่ยวกับ *Bacillus cereus*..... 3

รายละเอียดเกี่ยวกับ *Aspergillus flavus* 14

รายละเอียดเกี่ยวกับไคโตซาน..... 21

รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา..... 31

บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการทดลอง..... 35

บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 44

ประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้ง *B. cereus* ATCC 11778 44
ในหลอดทดลอง

ประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้ง *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้าง 50
อะฟลาทอกซิน

ประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้ง *B. cereus* ATCC 11778 56
และ *A. flavus* 05-21 ในน้ำพริกปรุงรส

ประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำพริกปรุงรส 61

บทที่ 5 สรุป และอภิปรายผลการทดลอง 66

สรุป..... 66

อภิปรายผลการทดลอง..... 67

ข้อเสนอแนะ..... 75

เอกสารอ้างอิง..... 76

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ 83
ภาคผนวก ข สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 89
ภาคผนวด ค การนับจำนวนสปอร์ 91
ภาคผนวก ง ตาราง MPN และการแปลผล MPN 94
ภาคผนวก จ การหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวัดค่าการดูดกลืนแสง ของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 96
ภาคผนวก ช การเตรียมน้ำพริกปรุงรส 99

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ลักษณะสัณฐานของ *Bacillus cereus*	3
2-2	ลักษณะเอนโดสปอร์ของ *Bacillus cereus*	6
2-3	ระยะการการเจริญและการสร้างเอนโดสปอร์ของ *Bacillus cereus*	8
2-4	ลักษณะของ *A. flavus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	16
2-5	ขบวนการสังเคราะห์สารอะฟลาทอกซิน	19
2-6	โครงสร้างของสารอะฟลาทอกซิน B1, B2, G1 และ G2	20
2-7	โครงสร้างของสารประกอบ (ก) เซลลูโลส (ข) ไคติน ..... (ค) ไคโตซาน และ (ง) ไคตินและไคโตซานโคโพลิเมอร์	21
2-8	โมเดลจำลองสายโซ่ไคโตซานแสดงพันธะไฮโดรเจน ..... แบบภายในโมเลกุลและแบบระหว่างโมเลกุล	22
4-1	การพัฒนาของสปอร์เป็นเซลล์ปกติของ *B. cereus* ATCC11778..... บนอาหาร TSA (พีเอช 6.0) โดยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ชุดควบคุมเป็นอาหาร TSA ที่ไม่เติมไคโตซาน บ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง	45
4-2	การรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 เมื่อทดสอบใน ..... 0.85% น้ำเกลือพีเอช 6.0 ที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ชุดควบคุมเป็น 0.85% น้ำเกลือที่ไม่เติมไคโตซาน อาหารสำหรับเพาะเลี้ยง (recovery medium) คือ TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส	47
4-3	ลักษณะด้านบน (ซ้าย) และด้านล่าง (ขวา) ของโคโลนี *A. flavus* 05-21 ..... ขณะเจริญบนอาหาร AFPA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน	50
4-4	ลักษณะการเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น ..... 365 นาโนเมตรของ *A. flavus* 05-21 (ขวา) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร coconut agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน โดยราที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงลบคือ *A. oryzae* (ซ้าย)	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4-5	ลักษณะการเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราโอเลตที่ความยาวคลื่น ..... 365 นาโนเมตรของ *A. flavus* 05-21 เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 5 วัน บนอาหาร coconut agar (ก) ชุดควบคุมไม่เติมไคโตซาน (ข) เติมไคโตซาน 0.25%, (ค) เติมไคโตซาน 0.5% และ (ง) เติมไคโตซาน 0.75%	52
4-6	ลักษณะการงอกของสปอร์บนอาหาร AFPA เมื่อเวลาผ่านไป ..... 5 ชั่วโมง กำลังขยาย 10X	54
4-7	ลักษณะการงอกของสปอร์บนอาหาร chitosan-AFPA ..... เมื่อเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมง กำลังขยาย 10X	56
4-8	การเปลี่ยนแปลงจำนวน *B. cereus* ATCC11778 (MPN/กรัม) ..... ใน (ก) น้ำพริกเผา และ (ข) น้ำพริกตาแดงที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ชุดควบคุมเป็นน้ำพริกเผาที่ไม่ผสมไคโตซาน บ่มที่อุณหภูมิห้อง	58
4-9	จำนวน *A. flavus* 05-21 (CFU/กรัม) ในตัวอย่าง (ก) น้ำพริกเผา ..... และ (ข) น้ำพริกตาแดง ผสมไคโตซานความ เข้มข้นต่าง ๆ ชุดควบคุมเป็นน้ำพริกเผาที่ไม่ผสมไคโตซาน บ่มที่อุณหภูมิห้อง	59
4-10	เส้นใยราและสปอร์บนน้ำพริกตาแดงที่ผสมไคโตซาน ..... ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.5%, 1.0%, 1.5% และ 2.0%)	60
ค-1	ตารางของ Counting chamber สำหรับนับเซลล์โดยแสดงตัวอย่าง ..... การนับสปอร์ที่ทับเส้นทางซ้ายรวมกับเส้นบนของช่อง และวิธีการนับเซลล์	92
จ-1	ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น (นาโนเมตร) ..... กับค่า OD ที่อ่านได้ของสปอร์แขวนลอย *B. cereus* ATCC11778	97
จ-2	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ..... 326 นาโนเมตร และปริมาณสปอร์ *B. cereus* ATCC11778	98

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	คุณสมบัติของ *B. cereus* และ *Bacillus* ชนิดอื่นที่คล้ายคลึงกัน	4
2-2	คุณสมบัติของเอนเทอโรทอกซินสองชนิดจากแบคทีเรีย *B. cereus*	12
2-3	จำนวนเซลล์ *B. cereus* ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษในอาหารชนิดต่าง ๆ	13
3-1	ระดับการเรืองแสงที่ปรากฏบนอาหาร coconut agar ..... เพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการระบุความสามารถในการสร้าง อะฟลาทอกซินของ *A. flavus* 05-21	41
4-1	การยับยั้งการงอกของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 ..... บนอาหาร TSA (พีเอช 6.0) ที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ	46
4-2	การยับยั้งการเจริญของเซลล์ *B. cereus* ATCC11778 เมื่อทดสอบ ..... ใน 0.85% น้ำเกลือ พีเอช 6.0 ที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ	49
4-3	ผลของไคโตซานต่อการเจริญของเส้นใยและการสร้าง ..... อะฟลาทอกซินของ *A. flavus* 05-21 เมื่อเพาะเลี้ยงบน coconut agar นาน 4 วัน ที่อุณหภูมิห้อง	53
4-4	ผลของไคโตซานต่อการรอดชีวิตของสปอร์ *A. flavus* 05-21	54
4-5	ผลของไคโตซานต่อการงอกของสปอร์ *A. flavus* 05-21	55
4-6	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (MPN/กรัม) ในตัวอย่างน้ำพริกเผา ..... ที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ	61
4-7	จำนวน *Bacillus* spp. ในตัวอย่างน้ำพริกเผาที่ผสม ..... ไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ	62
4-8	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (MPN/กรัม) ในตัวอย่างน้ำพริกตาแดง ..... ที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ	63
4-9	จำนวน *Bacillus* spp. (MPN/กรัม) ในตัวอย่างน้ำพริกตาแดง ..... ที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ	64
4-10	จำนวน ยีสต์และรา (CFU /กรัม) ในตัวอย่างน้ำพริกตาแดง ..... ที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ	65
ก-1	การเตรียม Chitosan-Trypticase soy agar	85
ก-2	การเตรียม Chitosan-coconut agar	87

บทที่ 1
บทนำ

น้ำพริกเป็นอาหารพื้นบ้านของประเทศไทยซึ่งมีผู้นิยมบริโภคเป็นอย่างมาก โดยในแต่ละท้องถิ่นหรือภูมิภาคก็จะมีน้ำพริกที่เป็นเอกลักษณ์ของตนเอง รวมทั้งยังมีการดัดแปลงผลิตน้ำพริกปรุงรสประเภทต่างๆ ออกสู่ท้องตลาดกันเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันมีกลุ่มผู้ผลิตเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากอันเนื่องมาจากการสนับสนุนจากโครงการหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ (OTOP) ของรัฐบาล เพื่อสร้างจุดเด่นและรายได้ให้กับชุมชน อย่างไรก็ตามปัญหาประการหนึ่งของการผลิตน้ำพริกปรุงรสก็คือระยะเวลาของการเก็บรักษา โดยปกติแล้วน้ำพริกที่ผลิตขึ้นโดยปราศจากสารกันเสีย จะมีอายุของการเก็บรักษาได้ประมาณ 5-7 วัน แต่หากใส่สารกันเสียซึ่งเป็นสารเคมี เช่น โซเดียมเบนโซเอท (sodium benzoate) ลงไปก็จะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาน้ำพริกให้ยาวนานขึ้น อย่างไรก็ตามในปัจจุบันผู้บริโภคมีความสนใจและใส่ใจในเรื่องสุขภาพมากขึ้น ในกรณีของอาหารก็นิยมบริโภคอาหารที่ไม่ใช้สารกันเสียที่เป็นสารเคมี ดังนั้นจึงมีผู้สนใจค้นคว้าหาสารธรรมชาติที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ได้ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทต่าง ๆ ซึ่งในที่นี้คณะผู้วิจัยก็มีความสนในการใช้สารธรรมชาติมาเป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์น้ำพริก

ไคโตซาน (chitosan) เป็นสารธรรมชาติซึ่งเป็นอนุพันธุ์ของไคติน ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาไคโตซานที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากมีรายงานถึงคุณสมบัติของไคโตซานในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้อย่างหลากหลาย ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา (Rabea *et al.*, 2003) อีกทั้งยังราคาไม่แพง ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติและไม่เป็นพิษต่อสัตว์ชั้นสูงรวมถึงมนุษย์ จากคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้ไคโตซานมีความเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (Koide, 1998; Shahidi, Arachchi & Jeon, 1999) รวมทั้งใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและเภสัชกรรม (Dodane & Vilivalam, 1998; Illum, 2003; Khor & Lim, 2003) ในหลายประเทศได้ขึ้นทะเบียนไคโตซานเป็นสารที่ใช้เติมในอาหารและยา โดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่นได้มีผลิตภัณฑ์อาหารที่ผสมไคโตซานเป็นจำนวนมากออกจำหน่ายเป็นเวลานานแล้ว จากคุณสมบัติที่สามารถต่อต้านจุลินทรีย์และราบางชนิดจึงใช้สารไคโตซานเป็นสารกันเสีย สารปรุงแต่งเพื่อความคงรูปและคงสีในอาหารต่าง ๆ รวมถึงนำมาใช้เป็นสารเคลือบอาหารและผลไม้ (สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2544; Shahidi, Arachchi, & Jeon, 1999; Cagri *et al.*, 2004)

ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาถึงประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์น้ำพริกปรุงรส โดยในการศึกษาเบื้องต้นมุ่งเน้นไปที่แบคทีเรีย *Bacillus cereus* และรา *Aspergillus flavus* ซึ่งมักพบปนเปื้อนได้บ่อยในอาหารประเภทต่าง ๆ รวมทั้งวัตถุดิบทางการเกษตรประเภทต่าง ๆ (Dufrenne *et al.*, 1995; Gourama & Bullerman, 1995; Gonzalez *et al.*, 1999; Valero *et al.*, 2003) ซึ่งในการนำวัตถุดิบต่าง ๆ มาใช้ในการผลิตน้ำพริก เช่น พริกแห้ง หอม กระเทียมและกุ้งแห้ง เป็นต้น จุลินทรีย์ดังกล่าวนี้มีโอกาสปนเปื้อนจากวัตถุดิบสู่ผลิตภัณฑ์ได้ *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์ มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและทนทานต่อการกำจัดด้วยวิธีต่างๆ *B. cereus* บางสายพันธุ์สร้างสารพิษซึ่งก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ มักพบปนเปื้อนในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารประเภทต่าง ๆ ส่วน *A. flavus* เป็นราที่สร้างสารอะฟลาทอกซินซึ่งมีความเป็นพิษโดยเฉพาะก่อให้เกิดมะเร็งตับได้ นอกจากนั้นในงานวิจัยนี้ยังมีการศึกษาถึงการนำไคโตซานมาใช้เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำพริกปรุงรส 2 ชนิด คือน้ำพริกเผาและน้ำพริกตาแดง ผลการศึกษาสามารถประเมินถึงศักยภาพและการนำไคโตซานซึ่งเป็นสารธรรมชาติมาประยุกต์ใช้ในการเป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์น้ำพริกปรุงรสได้ต่อไป อันจะก่อให้เกิดผลดีทั้งต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ การงอกและการมีชีวิตรอดของสปอร์ของ *Bacillus cereus* ในน้ำเกลือ 0.85%
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย การงอกและการมีชีวิตรอดของสปอร์ รวมทั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของรา *Aspergillus flavus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* และ *A. flavus* ที่เติมลงในน้ำพริกปรุงรส
4. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานในการเป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์น้ำพริกปรุงรส

สถานที่ทดลอง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ระยะเวลาของการทดลอง

1 ปี (เดือนกรกฎาคม 2548 ถึงเดือนมิถุนายน 2549)

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้อง

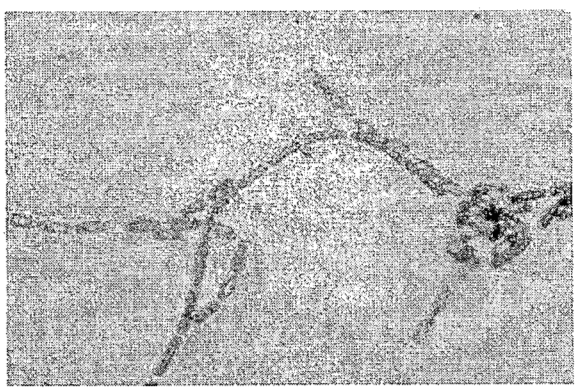
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา จำแนกได้ 4 ตอน คือ

1. รายละเอียดเกี่ยวกับ *Bacillus cereus*
2. รายละเอียดเกี่ยวกับ *Aspergillus flavus*
3. รายละเอียดเกี่ยวกับไคโตซาน
4. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. รายละเอียดเกี่ยวกับ *Bacillus cereus*

1.1 สัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

B. cereus จัดอยู่ในสกุล Bacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรียทั่วไป บางสายพันธุ์มีขนาดกว้างมากกว่า 0.9 ไมโครเมตร เซลล์มักเรียงเป็นลูกโซ่ สามารถเคลื่อนที่ได้ มีแฟลกเจลลาอยู่รอบเซลล์ (peritrichous) สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) รูปร่างไข่หรือทรงกระบอก ตำแหน่งของสปอร์จะอยู่บริเวณกลางเซลล์หรือเกือบถึงปลายเซลล์ และไม่ทำให้เซลล์บวม (ภาพที่ 2-1) เนื่องจาก *B. cereus* เป็นแบคทีเรียสร้างสปอร์จึงทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศหรือแบบฟาคัลเททีฟ (facultative anaerobe) (Harmon, Goepfert & Bennett, 1992)



ภาพที่ 2-1 ลักษณะสัณฐานของ *Bacillus cereus*

(ที่มา : www.bmb.leeds.ac.uk/.../ ug/SGM_04/SGM0080.html)

โคโลนีของ *B. cereus* มีลักษณะกลมแบนราบ แห้ง ผิวขรุขระ สีขาวครีม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 - 5 มิลลิเมตรบนอาหาร Nutrient agar (นันทนา อรุณฤกษ์, 2537) เซลล์ของ *B. cereus* มีการสะสม Polyhydroxybutyrate (PHB), volutin มีการสร้างสาร hemolysin, toxin และ lytic enzyme ปล่อยออกสู่นอกเซลล์ บางสายพันธุ์สร้างรงควัตถุเรืองแสงสีเหลืองเขียว ถ้าเจริญในสภาพ anaerobe ต้องการอาหารที่ซับซ้อน เช่น มีกลูโคสหรือไนเตรท (ดวงพร คันธโชติ, 2537) สามารถจำแนก *B. cereus* ออกจาก *Bacillus* สกุลอื่น ๆ ที่คล้ายกันดังแสดงในตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 คุณสมบัติของ *B. cereus* และ *Bacillus* ชนิดอื่นที่คล้ายคลึงกัน

การทดสอบ	*B. cereus*	*B. cereus var. mycoides*	*B. thuringiensis*	*B. anthracis*
การย้อมแกรม	+	+	+	+
การผลิตคะตาเลส	+	+	+	+
การผลิตเลซิทิเลส	±	±	±	(+)
การเคลื่อนที่	±	-	±	-
การผลิตกรดจากแมนนิทอล	-	-	-	-
การสลายเม็ดเลือดแดง	+	(+)	+	-
การเจริญแบบไรซอยด์	-	+	-	-
การผลิตผลึกสารพิษ	-	-	+	-
การหมักกลูโคส	+	+	+	+
การรีดิวซ์ไนเตรท	±	+	+	+
VP reaction	+	+	+	+
Tyrosine decomposition	+	(+)	+	(+)
ความไวต่อเอนไซม์ไลโซไซม์	+	+	+	+

หมายเหตุ + หมายถึงให้ผลบวกกับการทดสอบ, ± หมายถึงให้ผลบวกกับการทดสอบแต่บางครั้งให้ผลลบ, (+) หมายถึงส่วนใหญ่ให้ผลบวกแบบไม่ชัดเจน, - หมายถึงให้ผลลบกับการทดสอบ

(ที่มา: Harmon, *et al.*, 1992, p. 595)

1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการรอดชีวิตของ *B. cereus* ในอาหาร

1.2.1 อุณหภูมิ (temperature) ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. cereus* อยู่ที่อุณหภูมิ 30 - 35 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 40 - 50 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ของ *B. cereus* และอุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญได้อยู่ที่อุณหภูมิ 10 - 12 องศาเซลเซียส แต่มีบางรายงานที่พบว่า *B. cereus* สามารถเจริญได้ที่ 7 องศาเซลเซียส (Concon, 1988)

1.2.2 ค่าพีเอช (acidity) *B. cereus* สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชตั้งแต่ 4.9 - 9.3 ซึ่งเป็นค่าที่พบส่วนมากในผลิตภัณฑ์อาหาร จากรายงานของ Concon (1988) กล่าวว่าในอาหาร skim milk เมื่อสปอร์ของ *B. cereus* งอกและพัฒนาเป็นเซลล์ (vegetative cells) จะเปลี่ยนค่าพีเอชใน skim milk จาก 6.5 เหลือ 5.0 ซึ่งการลดลงของค่าพีเอชทำให้การงอกของสปอร์และการเจริญของเซลล์ *B. cereus* หยุดลง

จะเห็นได้ว่าความเป็นกรดสูง ๆ สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ และการงอกของสปอร์ *B. cereus* ได้ แต่สปอร์ยังคงมีจำนวนเท่าเดิม ไม่สูญหาย จากรายงานของ Concon (1988) กล่าวว่าจำนวนของสปอร์ *B. cereus* ใน cheddar cheese ยังคงเท่าเดิมจนถึงสัปดาห์ที่ 52

1.2.3 ชนิดของสับสเตรตและสารอาหาร (type of substrates and nutritional factors) จากรายงานของ Concon (1988) กล่าวว่าสารในนมดิบมีผลต่อการงอกของสปอร์ ซึ่งสารดังกล่าวจะถูกทำลายเมื่อผ่านขบวนการพาสเจอไรส์ และยังไม่สามารถระบุชนิดของสารได้ นอกจากนี้ยังพบว่ากรดอะมิโน 11 ชนิดที่มีผลต่อการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ arginine, cysteine, glutamic acid, histidine, isoleucine, methionine, phenylalanine, serine, threonine และ valine และกรดอะมิโนอีก 4 ชนิดได้แก่ glycine, lysine, aspartic acid และ tyrosine ที่ช่วยส่งเสริมการผลิตเอนเทอโรทอกซินให้มากกว่าปกติ 20 เท่า

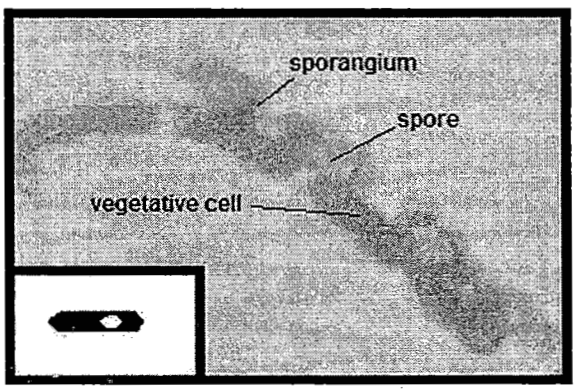
1.2.4 จุลินทรีย์อื่น ๆ (presence of microorganisms) จุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันกับ *B. cereus* อาจช่วยยับยั้งหรือกระตุ้นการเจริญของ *B. cereus* เช่น *Streptococcus lactis* สามารถผลิตยาปฏิชีวนะและสารนิซิน (nisin) ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ในนมที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (5 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า) แต่ยาปฏิชีวนะไม่มีประสิทธิภาพที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า และสปอร์ของ *B. cereus* สามารถทนต่อสารนิซินได้ (Concon, 1988)

1.2.5 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) *B. cereus* สามารถทนเกลือได้ถึง 5% ในขณะที่จุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ อาจถูกยับยั้งการเจริญ (Concon, 1988)

1.2.6 เวลา (time) *B. cereus* มีช่วงเวลาการเจริญ (generation time) 27 นาที ซึ่งช้ากว่า *Clostridium perfrigens* ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อม เช่นจำนวนเซลล์ *B. cereus* เริ่มต้น 10,000 เซลล์/มิลลิลิตร ในวานิลลา (vanilla sauce) ที่อุณหภูมิห้องจะเพิ่มขึ้นเป็น 92 ล้านเซลล์ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ซึ่งถือได้ว่ามีการแบ่งตัวที่ช้า และมีจำนวนไม่มากพอที่จะสร้างสารพิษในการก่อโรคได้ (Concon, 1988)

1.3 เอนโดสปอร์ (endospore)

B. cereus มีเอนโดสปอร์เป็นโครงสร้างที่ทำให้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เอนโดสปอร์เกิดขึ้นภายในเซลล์ และสร้างได้เพียง 1 สปอร์ ต่อ 1 เซลล์ ดังนั้นการสร้างสปอร์จึงไม่ใช่เพื่อการสืบพันธุ์ เอนโดสปอร์ของ *B. cereus* มีรูปร่างทรงกระบอกหรือรูปไข่ มีตำแหน่งอยู่บริเวณกลางเซลล์หรือเกือบถึงปลายเซลล์ (ภาพที่ 2-2) เอนโดสปอร์สามารถทนต่อความแห้ง สีย้อม สารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อ รังสี และความร้อนได้ เอนโดสปอร์ของ *B. cereus* ถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 90, 95 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3.6, 2.8 และ 2.2 นาทีตามลำดับ (Hui,1994)



ภาพที่ 2-2 ลักษณะเอนโดสปอร์ของ *Bacillus cereus*
(ที่มา : www.bmb.leeds.ac.uk/.../ ug/SGM_04/SGM0080.html)

1.3.1 โครงสร้างของเอนโดสปอร์ ประกอบด้วย

1.3.1.1. ชั้นในสุด เป็นชั้นสปอร์บอดี (spore body) หรือแกน (core) หรือสปอร์ไซโทพลาสซึม (spore cytoplasm) เป็นชั้นที่ไซโทพลาสซึมรวมทั้งโครโมโซม ไรโบโซม และเอนไซม์ต่าง ๆ ล้อมรอบด้วยยูนิตเมมเบรน เอนไซม์จะแตกต่างไปจากเซลล์ปกติ เนื่องจาก *B. cereus* เป็นพวกที่เจริญในที่มีออกซิเจน พบว่าไซโทพลาซึม และเอนไซม์ของระบบขนส่งอิเลคตรอนจะลดลงมากกว่า 95% และมีระบบขนส่งอิเลคตรอนชนิดใหม่เกิดขึ้นแทน คือ เฟลโวโปรตีนดีพีเอนเอชออกซิเดส (flavoprotein DPNH oxidase)

1.3.1.2. ผนังสปอร์ (spore wall) เป็นส่วนที่จะเจริญไปเป็นผนังเซลล์ใหม่ของแบคทีเรีย โครงสร้างของผนังสปอร์เป็นพวกมิวรีน (murine)

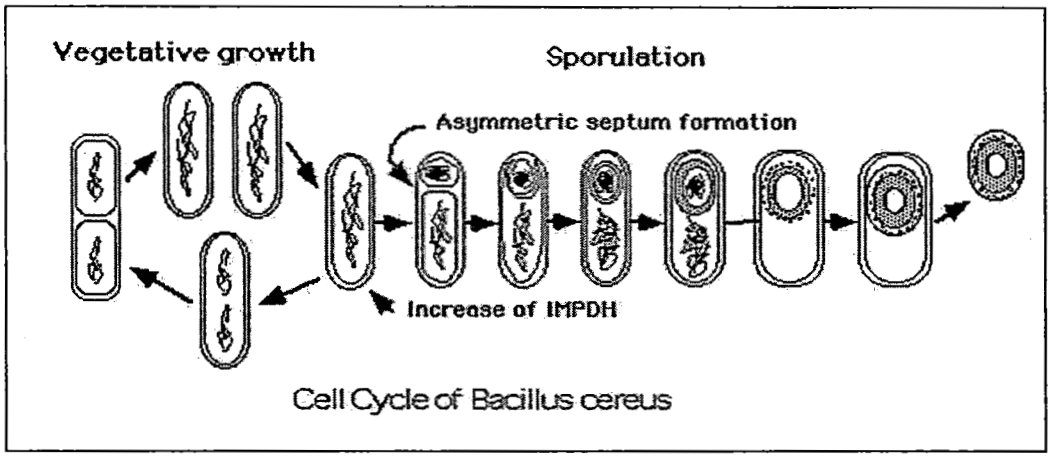
1.3.1.3. สปอร์คอร์เทกซ์ (spore cortex) เป็นชั้นที่มีปริมาตรมากที่สุด (มีปริมาตรประมาณครึ่งหนึ่งของสปอร์ทั้งหมด) และหนาที่สุด ชั้นนี้ทนทานต่อความร้อนได้ดีที่สุดเนื่องจากประกอบด้วยเกลือแคลเซียมของกรดไดพิโคลินิก (dipicolinic acid) ปริมาณกรดนี้พบตั้งแต่ 3 - 15% ของน้ำหนักแห้งของสปอร์ นอกจากนี้ยังประกอบด้วยมิวโคเพปไทด์ (มิวรีน) ชั้นนี้ถูกย่อยด้วยไลโซไซม์ได้ การย้อมพิเศษจะเห็นชั้นคอร์เทกซ์ ประกอบด้วยชั้นบาง ๆ ที่พันอยู่

1.3.1.4. สปอร์โคท (spore coat) เป็นชั้นที่ทนทานมาก มีความหนาและเหนียว อาจมีชั้นเดียวหรือหลายชั้นแต่เห็นชัดเจน 2 ชั้น คือ ชั้นใน (inner coat) บางกว่า อยู่ล้อมรอบคอร์เทกซ์กับชั้นนอก (outer coat) หนาแน่นมากที่สุด ชั้นนี้จะป้องกันการถูกย่อยด้วยไลติกเอนไซม์ เพราะประกอบด้วยสารคล้ายเคราติน (keratin-like protein) และมีซีสทีน (cystene) มากด้วยจึงเกิดพันธะไดซัลไฟด์เชื่อมระหว่างพอลิเพปไทด์ ทำให้สปอร์ทนต่อการซึมผ่านของสารได้ดี

1.3.1.5. เอกโซสปอเรียม (exosporium) เป็นชั้นบาง ๆ อยู่กันหลวม ๆ ประกอบด้วยลิพอโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ อาจมีน้ำตาลอะมิโน (amino sugar) ชั้นนี้จะไม่ยอมให้สารต่าง ๆ ผ่านเข้าออก ชั้นนี้เป็นชั้นนอกสุด (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544)

1.3.2 การสร้างสปอร์ (spore formation, sporulation)

เมื่อจะเริ่มสร้างสปอร์จะมีการสร้างผนังกั้นเซลล์ (cross wall หรือ septum) ใกล้ ๆ ปลายเซลล์ ส่วนของไซโทพลาซึมและดีเอ็นเอจะแยกจากส่วนของเซลล์ที่เหลือ ส่วนของเซลล์ที่เหลือที่มีขนาดใหญ่กว่าจะมาห้อมล้อมส่วนเล็กกว่ากลายเป็นฟอร์สปอร์ (fore spore) หลังจากนี้จะมีการสร้างส่วนประกอบของสปอร์ ได้แก่ ชั้นคอร์เทกซ์ ซึ่งถูกสร้างขึ้นระหว่างเยื่อหุ้มสปอร์ชั้นในและชั้นนอก และสร้างสปอร์โคท เกิดอยู่รอบนอกและเกิดเอกโซสปอเรียมห้อมล้อมสปอร์โคทอีกทีหนึ่ง หลังจากสร้างเป็นเอนโดสปอร์เรียบร้อยแล้ว เซลล์เดิมจะสลายไป สปอร์ที่เหลือจะกลายเป็นเอกโซสปอร์ (exosport) หรือสปอร์อิสระ (free spore) ดังแสดงในภาพที่ 2-3



ภาพที่ 2-3 ระยะการการเจริญและการสร้างเอนโดสปอร์ของ *Bacillus cereus*
(ที่มา : www.agr.kyushu-u.ac.jp/. ../eisei/espo.html)

1.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสปอร์

การสร้างสปอร์เป็นกลไกเพื่อการอยู่รอดที่ขึ้นกับพันธุกรรมและสภาพแวดล้อมทางสรีรวิทยาที่เหมาะสม สิ่งแวดล้อมมีทั้งภายนอกและภายในที่จำเป็นในการสร้างสปอร์ สภาพทางกายภาพได้แก่

ก. ช่วงอุณหภูมิที่พอเหมาะกับการเจริญของเซลล์ปกติ

ข. ช่วงของพีเอชใกล้เคียงกับพีเอชที่เหมาะสมของการเจริญของเซลล์ปกติ

ค. ออกซิเจนเพิ่มขึ้น

สารเคมีที่ต้องการใช้ในการสร้างสปอร์ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส กรดอะมิโนบางชนิด ปัจจัยในการเจริญเติบโต เช่น วิตามิน เกลือแร่ เช่น กรดโฟลิก ฟอสเฟต แคลเซียม แมงกานีส ไบคาร์บอเนต (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544)

1.3.4 การทนความร้อนของสปอร์

องค์ประกอบทางเคมีของสปอร์ มีน้ำอิสระน้อยมาก มีแคลเซียมไดพิโคลิเนต (calcium dipicolinate) ประมาณ 10% ของน้ำหนักแห้งของสปอร์ ซึ่งไม่พบในเซลล์อื่น ๆ เลย ในบริเวณแกนกลางประกอบด้วยดีเอ็นเอมาก มีเอนไซม์และอาร์เอ็นเอน้อย ไม่มีเอ็มอาร์เอ็นเอชั้นผนังสปอร์และคอร์เทกซ์มีไกลโคเพปไทด์ ชั้นสปอร์โคทมีโปรตีนมาก ซึ่งมีกรดอะมิโนซีสทีนมาก ทำให้เกิดพันธะเชื่อม ส่งผลให้สปอร์ทนความร้อนได้ดี การทนทานต่อความร้อนของสปอร์เนื่องจากสาเหตุดังนี้

ก. มีองค์ประกอบพิเศษที่ทนความร้อนได้ดี เช่น เอนไซม์ที่ทนความร้อน

ข. ไม่มีน้ำอิสระ

ค. มีแร่ธาตุมาก โดยเฉพาะแคลเซียม

ง. มีกรดไดพิโคลินิก

พบว่าการทนความร้อนของสปอร์ เนื่องจากความสัมพันธ์ระหว่าง Ca^{2+} กับการสร้างกรดไดพิโคลินิก เช่น ถ้าเลี้ยงแบคทีเรียที่กำลังสร้างสปอร์ในอาหารที่ขาด Ca^{2+} ระดับการทนความร้อนจะลดลง หรือถ้าเลี้ยงในอาหารที่ขาดกรดไดพิโคลินิก ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน จึงแสดงว่าธาตุแคลเซียมและกรดไดพิโคลินิกมีความสัมพันธ์กับการทนความร้อนของสปอร์แบคทีเรีย (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544)

1.3.5 การงอกของสปอร์ (germination of spore)

การงอกของสปอร์เป็นการเปลี่ยนสภาพของสปอร์จากระยะพัก (dormancy) ให้เป็นระยะที่แบ่งตัวกลายเป็นเซลล์ปกติ ประกอบด้วยกระบวนการต่าง ๆ คือ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544)

ระยะที่ 1 การกระตุ้น (activation)

อาจเป็นการกระตุ้นทางกายภาพหรือสารเคมี การกระตุ้นทางกายภาพ อาจเป็นความร้อนขนาด 60 – 70 องศาเซลเซียส เรียกว่าการกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock)

สารเคมีที่กระตุ้น อาจเป็นสารที่ทำให้ผิวสปอร์เปียก (surface wetting agent) สารอนินทรีย์ เช่น คลอไรด์ โคบอลต์ ฟอสเฟต สังกะสี หรืออาจเป็นสารที่ใช้ในกระบวนการเมแทบอ ลิซึม เช่น อะดีนีน อะลานีน แคลเซียมไดพิโคลิเนต คาร์บอนไดออกไซด์ กลูโคส กรดแลกติก และไทโรซีน ระยะกระตุ้นประกอบด้วย

ก. การย่อยสลายด้วยไลติกเอนไซม์ ทำให้ผนังเซลล์ยอมให้สารซึมผ่านได้

ข. การย่อยชั้นสปอร์โคทหรือคอร์เทกซ์

ค. การกระตุ้นเมแทบอลิซึมของคาร์ไบไฮเดรต

ง. ระยะกระตุ้นนี้เทียบได้กับระยะ lag phase ซึ่งสปอร์พ้นจากระยะพักออกมา

ระยะที่ 2 การงอก (germination)

เป็นการเปลี่ยนจากสภาพที่เซลล์ทนความร้อนได้ดี และสะท้อนแสงได้ดี เป็นสภาพที่สูญเสียลักษณะเหล่านี้ ระยะนี้เริ่มด้วยการสร้างร่อง (germination groove) ในสปอร์โคท ร่องนี้จะเป็นทางให้น้ำและสารอาหารผ่านเข้าสปอร์ ในขณะที่น้ำเข้าสู่สปอร์จะเกิดเหตุการณ์ดังนี้

ก. มีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น และเกิดออกซิเดชันของกลูโคส

ข. สปอร์พองออก

ค. มีการขับสารทิ้งออกจากเซลล์ประมาณ 30% สารที่ขับออกมาเป็นพวก แคลเซียมไดพิโคลิเนต โปรตีนต่าง ๆ กรดอะมิโน ไกลโคเพปไทด์

ถึงตอนนี้สปอร์งอกออกมาแล้ว ซึ่งเซลล์ที่งอกออกมามีสมบัติดังนี้คือ

- ไม่ทนความร้อน
- ย้อมติดสีธรรมดาได้
- ไม่สะท้อนแสง
- ลดความขุ่นของสปอร์ซัสเพนชัน

ระยะที่ 3 การเจริญ (outgrowth)

เมื่อสปอร์งอกออกมาแล้ว จะมีการเจริญต่อไปและต้องการอาหารที่สมบูรณ์สำหรับการเจริญ ระยะแรกของการเจริญสปอร์จะบวมจนเห็นได้ชัด สร้างผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ปกติอันใหม่ เซลล์ใหม่ที่สร้างขึ้นจะหลุดออกจากสปอร์โคทและยืดยาวออก

1.4 เอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) และการก่อโรค

ในปี ค.ศ. 1906 มีรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับ *Bacillus* spp. ที่สงสัยว่าจะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เมื่อลูบิเนา (Lubenau) บรรยายว่าได้เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษขึ้นในสถาบันพักฟื้นแห่งหนึ่ง ทำให้ผู้อยู่อาศัยและเจ้าหน้าที่ 300 คนป่วย จากอาการปวดท้องและอาเจียน สามารถแยกได้สปอร์ของแบคทีเรียชนิดหนึ่งในลูกชิ้นเนื้อซึ่งผู้ป่วยบริโภค ลูบิเนาตั้งชื่อแบคทีเรียนี้ว่า *Bacillus peptonificans* ซึ่งเขาบรรยายว่ามีลักษณะคล้ายกับ *B. cereus* มาก ในระหว่างปี ค.ศ. 1936 - 1943 ได้เกิดโรคระบาดจากแบคทีเรียสร้างสปอร์ซึ่งเจริญในสภาวะที่มีอากาศขึ้นในยุโรป และสงสัยว่าจะทำให้ผู้บริโภค 117 คนจาก 367 คนป่วย (Adams & Moss, 1995 อ้างอิงใน สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

ก่อนปี ค.ศ. 1950 *B. cereus* ไม่ถูกจัดไว้ในจำพวกแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ หลังจากได้มีการจัดจำแนกชั้นของแบคทีเรียใหม่ จึงมีความชัดเจนมากขึ้น การระบาดของ *B. cereus* ในปี ค.ศ. 1969 และในปี ค.ศ. 1971 นับว่าเป็นครั้งแรกที่มีบันทึกเป็นเอกสารในสหรัฐอเมริกา และในประเทศอังกฤษ ตามลำดับ

B. cereus สร้างเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ในระยะการเจริญช่วง logarithmic และหยุดสร้างในช่วงเริ่มต้นของการสร้างสปอร์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนเทอโรทอกซิน คือ 18 และ 24 องศาเซลเซียส (Concon,1988) นอกจากนี้พบว่า *B. cereus* ยังสามารถสร้างเอนไซม์

หลายชนิด ได้แก่ เอนไซม์เลคซิติเนส (lecithtinase) โปรติเอส (proteases) เบตา-แลคตาเมส (β-lactamase) สปิงโกมัยยิลิเนส (spingomyelinase) ซิริโอไลซิน (cereolysin) และฮีโมไลซิน บี แอล (hemolysin B L) การตรวจหา *B. cereus* บ่อยครั้งที่อาศัยสมบัติของเอนไซม์เลซิติเนสที่แบคทีเรียนี้สร้างขึ้น โดยการเติมไข่แดงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เอนไซม์เลซิติเนสจะย่อยเลคซิตินในไข่แดง ทำให้เห็นเป็นโซนขุ่นขาวบริเวณที่ *B. cereus* เจริญ เชื้อนี้ไวต่อยาปฏิชีวนะพอลิมัยซิน (polymyxin) (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันแล้วว่าอาหารเป็นพิษหรือกระเพาะและลำไส้อักเสบจาก *B. cereus* เกิดจากเอนเทอโรทอกซินซึ่งมี 2 ชนิดคือ

(1) เอนเทอโรทอกซินที่ไม่ทนความร้อน เกิดอาการช้า ก่อให้เกิดอาการท้องร่วง เรียกว่า diarrheal syndrome มีอาการคล้ายกับโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *C. perfrigens* อาการเกิดขึ้นประมาณ 8 - 16 ชั่วโมงหลังบริโภคอาหารที่มีสารพิษ และจะหายไปภายใน 12 - 24 ชั่วโมง อาการที่เกิดขึ้น คือ ปวดท้อง ถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำ และปวดแสบอันเนื่องมาจากการถ่ายเบ่ง ส่วนอาการคลื่นไส้และอาเจียนนั้นมักไม่ใคร่เกิดขึ้น

(2) เอนเทอโรทอกซินที่ทนความร้อนก่อให้เกิดอาการอาเจียนเรียกว่า emetic syndrome มีอาการคล้ายกับโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus* ระยะเวลาเกิดอาการสั้นกว่า คือเกิดภายใน 1 - 5 ชั่วโมง ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน อาการดังกล่าวเป็นอยู่ราว 6 - 24 ชั่วโมง

อาการทั้งสองเกิดจากเอนเทอโรทอกซินที่ *B. cereus* สร้างขึ้น (ตารางที่ 2-2) นอกจากนี้ยังพบว่า *Bacillus* สปีชีส์อื่นก็ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษขึ้นได้เช่นกัน แต่เกิดขึ้นไม่บ่อยนัก สปีชีส์ดังกล่าวได้แก่ *B. subtitis, B. licheniformis* และ *B. pumilus* (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

นอกจากนี้ยังพบว่า *B. cereus* สามารถก่อให้เกิดโรคตาอักเสบ (panophthalmitis) แต่ยังไม่ทราบกลไกการเกิดโรคอย่างสมบูรณ์ ทราบเพียงแต่ว่ามีทอกซินที่เกี่ยวข้องอย่างน้อย 3 ชนิดคือ necrotic toxin ซึ่งเป็นเอนเทอโรทอกซินที่ไม่ทนความร้อน cereolysin เป็นฮีโมไลซินที่มีฤทธิ์ร้ายแรง และ phospholipase C ซึ่งก็คือเลซิทิเนส (lecithinase) การทำลายตาอย่างรวดเร็วเนื่องจากติดเชื้อ *B. cereus* เป็นผลมาจากการทำงานร่วมกันของทอกซินเหล่านี้ และปัจจัยอื่น ๆ อีก ตาอักเสบจากเชื้อนี้จะลุกลามอย่างรวดเร็ว จนทำให้สูญเสียการมองเห็นภายใน 48 ชั่วโมง โดยเชื้ออาจทำลายเนื้อเยื่อที่เรตินาได้ และ *B. cereus* ยังเป็นเชื้อฉวยโอกาสได้อีกด้วย สาเหตุเนื่องมาจากเครื่องมือสวนหลอดเลือด การติดเชื้อในทางเชื่อมของระบบส่วนกลาง เยื่อบุหัวใจอักเสบ รวมทั้งปอดอักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ การติดเชื้อในกระแสเลือดในคนไข้ที่ภูมิคุ้มกันถูกกดอย่างรุนแรง *Bacillus* ที่แยกได้ส่วนใหญ่พบว่าปนเปื้อนจากผิวหนังของคนไข้นั้นเอง (โสภณ คงสำราญ, 2524)

ตารางที่ 2-2 คุณสมบัติของเอนเทอโรทอกซินสองชนิดจากแบคทีเรีย *B. cereus*

คุณสมบัติ	สารพิษ	
	ชนิดที่ทำให้ท้องเดิน	ชนิดที่ทำให้อาเจียน
น้ำหนักโมเลกุล	ประมาณ 50 kDa	น้อยกว่า 50 kDa
จุดที่มีประจุเท่ากัน (isoelectric point)	4.9 - 5.6	-
ความคงตัว ความร้อน พีเอช เอนไซม์โปรติเอส	 ถูกทำลายที่ 56 องศาเซลเซียส 5 นาที ไม่คงตัวที่พีเอช < 4 และ > 11 Pronase, trypsin และ pepsin	 ยังคงตัวที่ 126 องศาเซลเซียส 90 นาที คงตัวที่พีเอช 2 - 11 Trypsin และ pepsin
การเจริญ -ในอาหาร -อาหารที่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการ -อุณหภูมิที่เหมาะสม -ระยะของการเจริญ	 Pre-formed Brain Heart Infusion, Glucose Casamino acids medium 32 - 37 องศาเซลเซียส late exponential	 Pre-formed Rice slurry 25 - 30 องศาเซลเซียส late exponential –stationary (sporulation related)
การทดสอบกับสิ่งมีชีวิต	ท้องเดิน 0.5 - 3.5 ชั่วโมง	อาเจียน 1.0 - 5.0 ชั่วโมง

kDa คือ kilo Dalton เป็นหน่วยของน้ำหนักโมเลกุล

(ที่มา: สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545, หน้า 155)

อาหารที่เกี่ยวข้อง

เนื่องจาก *B. cereus* เป็นแบคทีเรียสร้างสปอร์ จึงทนต่อสภาวะต่าง ๆ ได้ดี สปอร์กระจายไปในอากาศ ฝุ่นละออง และสิ่งแวดล้อม จึงพบแบคทีเรียนี้บ่อยในอาหารต่าง ๆ แม้แต่อาหารแห้งที่มี a_w ต่ำ เช่นแป้ง และธัญพืช ซึ่งแบคทีเรียส่วนมากไม่เจริญ ก็อาจพบ *B. cereus* ได้ แต่ปริมาณของ *B. cereus* ที่จะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้นั้นต้องอยู่ในระดับที่สูงพอสมควร ประมาณ 10^5 - 10^8 เซลล์/กรัมของอาหาร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารดังตารางที่ 2-3

ตารางที่ 2-3 จำนวนเซลล์ *B. cereus* ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษในอาหารชนิดต่าง ๆ

ชนิดของอาหาร	จำนวนเซลล์ *B. cereus* ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ
พุดดิ้ง	1.3×10^7
ซุปไก่	6.0×10^7
มันบด ผัก เนื้อสับ ตับหวาน ซุป ข้าว	0.5×10^6 - 200×10^6
ฟักทองเขียว พายครีม เนื้อแกะ อาหารที่ผสมไข่	1.6×10^7 - 16×10^7
น้ำตาล	6.0×10^7
ซุปผัก ซุปเนื้อ	3.6×10^4 - 9.5×10^8
เนื้อหมู	6.0×10^7

(ที่มา: Concon, 1988, p.814)

ได้มีการสำรวจอาหารที่ผ่านความร้อนว่ามี *B. cereus* หลงเหลืออยู่หรือไม่ ปรากฏว่าในนมที่ผ่านความร้อนแบบพาสเจอไรซ์ตรวจพบ *B. cereus* ประมาณ 35 - 48% แต่ในนมดิบกลับตรวจพบเชื้อต่ำกว่า (ประมาณ 9%) อย่างไรก็ตาม *B. cereus* ที่รอดชีวิตมาได้ในอาหารที่ผ่านความร้อนนั้นอาจบาดเจ็บหรือไม่เจริญ และจะทำให้โอกาสในการตรวจพบ *B. cereus* ในอาหารอยู่ในปริมาณค่อนข้างต่ำ ($<10^3$ cfu/มิลลิลิตร) (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

ในนมหรือครีมเก็บรักษาไว้ด้วยความเย็นที่ไม่ต่ำพอ *B. cereus* สามารถเจริญจนเป็นสาเหตุทำให้นมหรือครีมตกตะกอนเสียได้ เรียกว่า sweet curdling หรือ bitty cream แต่ตามปกติ *B. cereus* มิใช่เป็นตัวการที่สำคัญที่ทำให้นมและผลิตภัณฑ์นมเกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษขึ้น ส่วนมากการระบาดมีสาเหตุมาจากอาหารประเภทอื่น (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

B. cereus ชนิดที่ทำให้อาเจียนตามปกติเกิดจากอาหารจำพวกแป้ง เช่น ข้าว และพาสต้า บ่อยครั้งที่มีรายงานการระบาดว่าเกิดจากข้าวผัดที่เหลือบริโภคจากภัตตาคารจีน แล้วนำกลับบ้าน การอุ่นอาหารที่อุณหภูมิไม่สูงและไม่นานพอ จึงเป็นการกระตุ้นให้สปอร์แบคทีเรียงอกและเจริญเพิ่มจำนวนขึ้น ผลิตสารพิษออกมา จนเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เรียกว่าอาการจากภัตตาคารจีน (Chinese Restaurant Syndrome) พฤติกรรมการเตรียมอาหารประเภทข้าวครั้งละมาก ๆ แล้วทิ้งไว้หรือรอไว้จนกว่าจะจำหน่ายหมด มีผลให้ *B. cereus* เจริญ พร้อมกับสร้างเอนเทอโรทอกซินออกมา การป้องกันสามารถกระทำได้ โดยจะต้องทำให้ข้าวที่หุงสุกแล้วบริโภค

ไม่หมดเย็นลงทันทีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 8 องศาเซลเซียส และไม่ควรหุงข้าวครั้งละมาก ๆ หรือเก็บไว้บริโภคหลาย ๆ มื้อ หากจำเป็นต้องอุ่นอาหารจะต้องควบคุมให้มีอุณหภูมิ ณ จุดที่ความร้อนเข้าถึงช้าที่สุดสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นระยะเวลาหนึ่ง (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

สำหรับ *B. cereus* ที่ทำให้เกิดอาการท้องเดินนั้น ส่วนมากเกิดกับอาหารที่มีเนื้อ ซุป ผัก พุดดิ้ง และซอสต่าง ๆ แม้แต่เครื่องเทศแห้งยังเคยปรากฏว่าเป็นแหล่งแพร่กระจายของ *B. cereus* (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

2. รายละเอียดเกี่ยวกับ *Aspergillus flavus*

A. flavus เป็นราชั้นสูง จัดอยู่ในดิวิชัน Eumycota ซับดิวิชัน Deuteromycotina ฟอร์ม-คลาส Deuteromycetes ฟอร์ม-ซับคลาส Hyphomycetidae ฟอร์ม-ออเดอร์ Moniliales ฟอร์ม-แฟมิลี Moniliaceae และ ฟอร์ม-จีนัส *Aspergillus* เนื่องจากซับดิวิชัน Deuteromycotina เป็นราที่พบเฉพาะระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเท่านั้น ซึ่งอาจเนื่องจากยังศึกษาไม่พบหรืออาจสูญเสียความสามารถนี้ไป จึงจัดหมวดหมู่แบบชั่วคราว โดยใช้คำว่า "ฟอร์ม (form)" นำหน้าหมวดหมู่ อย่างไรก็ตามหากพบระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ก็จะถูกจัดเข้าอยู่ในคลาส Ascomycotina (Alexopoulos, Mims, & Blackwell, 1996)

2.1 สันฐานวิทยา

2.1.1 ลักษณะโคโลนี

มีสีค่อนข้างเหลืองอมเขียว และจะเป็นสีเขียวเมื่ออายุมากขึ้น เมื่อแก่จัดจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวแกมน้ำตาล ลักษณะของวุ้นด้านก้นจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จะไม่มีสี แต่เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ AFPA ลักษณะวุ้นด้านก้นจานอาหารเลี้ยงเชื้อ AFPA จะมีสีเหลืองส้ม (Gilman, 1975)

2.1.2 โคนิเดียล เฮด (conidial head)

อาจมีรูปร่างเป็นรูปแท่ง (columnar) ถึงรูปกลมแบบรัศมี (radiate) หรือรูปกลม (globose) ซึ่งการจัดเรียงตัวของเฟียร์ไลด์ (phialides) บนเวสสิเคิล (vesicle) จะเป็นตัวกำหนดรูปร่างลักษณะของ โคนิเดียล เฮด ส่วนขนาดของโคนิเดียล เฮด ถูกกำหนดโดยขนาดของเวสสิเคิล และความยาวของโคนิเดียล เฮด นอกจากนี้สีของโคนิเดียล เฮด จะมีสีเหมือนกับสีของโคนิเดีย (Gourama & Bullerman, 1995)

2.1.3 โคนิเดีย (conidia)

เป็นโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ อยู่บริเวณปลายของเฟียร์ไลด์ มีรูปร่างกลม ผนังเรียบถึงขรุขระขนาด 3-6 ไมโครเมตร (Gourama& Bullerman, 1995) โคนิเดียอ่อนจะอยู่ที่ปลายเวสสิเคิล เมื่อเกิดโคนิเดียอ่อนอันใหม่จะมีการดันโคนิเดียแก่ออกไปเรื่อย ๆ จึงปรากฏเป็นสายโคนิเดีย (Gilman, 1975)

2.1.4 เวสสิเคิล (vesicle)

เป็นบริเวณที่โป่งออกมาจากบริเวณปลายของก้านชูสปอร์หรือโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore, stalk) อาจมีรูปร่างเป็นรูปกลม รูปไข่ (elliptical) หรือรูปกระบอง (clavate) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10-65 ไมโครเมตร (ส่วนใหญ่ประมาณ 25-45 ไมโครเมตร) (Gourama & Bullerman, 1995)

2.1.5 สเตอริกมา (sterigma)

เป็นส่วนของเซลล์ที่สร้างโคนิเดียพิเศษ (conidiogenous cell) ซึ่งเกิดบนส่วนของเวสสิเคิล อาจเป็นแบบเฟียร์ไลด์ชั้นเดียว (uniseriate phialide) หรือแบบเฟียร์ไลด์สองชั้น (biseriate phialide) โดยที่ชั้นล่าง (primary sterigma) เรียกว่าเมทูเล (metulae) ในขณะที่ชั้นบน (secondary sterigma) จะเรียกว่าเฟียร์ไลด์ ราชนิดที่เป็นแบบเฟียร์ไลด์ชั้นเดียวจะถูกสร้างขึ้นบนเวสสิเคิลโดยตรง ในขณะที่ราชนิดที่เป็นแบบเฟียร์ไลด์สองชั้นจะถูกสร้างขึ้นบนเมทูเล (Gourama & Bullerman, 1995)

2.1.6 โคนิดิโอฟอร์ (conidiophore, stalk)

ไม่มีการแตกกิ่งก้านสาขา ไม่มีผนังกั้น (septum) มีขนาดยาว 400-80 ไมโครเมตร ผนังของโคนิดิโอฟอร์หนาและมีลักษณะขรุขระคล้ายหนาม ไม่มีสี (Gourama & Bullerman, 1995)

2.1.7 เซลล์ฐาน (foot cell)

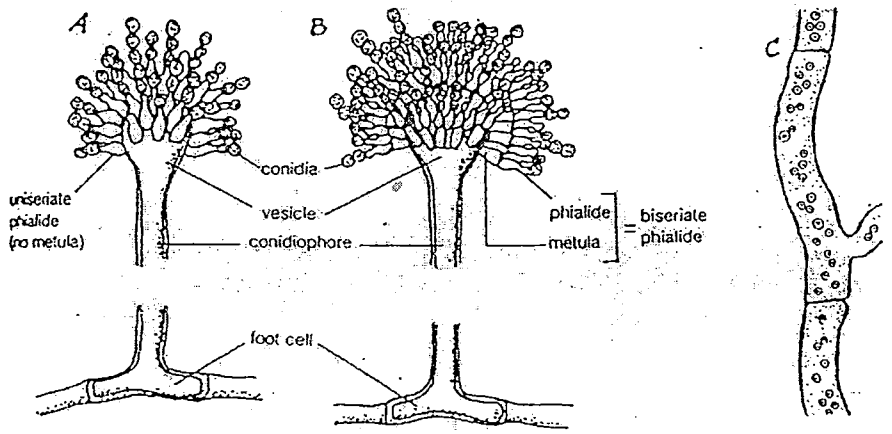
เป็นส่วนของเส้นใย ซึ่งเป็นตำแหน่งที่โคนิดิโอฟอร์ชูงอกออกจากมัยซีเลีย (mycelium) เซลล์ฐานจะมีขนาดใหญ่และมีขอบเขตที่ชัดเจนกว่ามัยซีเลียม (Gilman, 1975)

2.1.8 สเครอโรเทียม (sclerotium)

เป็นโครงสร้างพิเศษที่ราสร้างขึ้นเพื่อช่วยในการดำรงชีวิตของรา เมื่อมีสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม สเครอโรเทียมเริ่มแรกจะมีสีขาว ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จนมีสีน้ำตาลดำเมื่อแก่จัด (Gourama & Bullerman, 1995)

2.1.9 เส้นใย (hypha)

เส้นใยของ *A. flavus* เป็นแบบเส้นใยที่มีนิวเคลียสหลายอัน (multinucleate hypha) และมีผนังกั้น (septate hypha) แสดงลักษณะโครงสร้างต่าง ๆ ของ *A. flavus* ได้ดังภาพที่ 2-4



ภาพที่ 2-4 ลักษณะของ *A. flavus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

A : *A. flavus* ที่มี สเตอริกมาชั้นเดียว

B : *A. flavus* ที่มี สเตอริกมาสองชั้น

C : เส้นใยของ *A. flavus* ที่เป็นแบบ multinucleate

(ที่มา : Larone, 1993)

2.2 สรีรวิทยา

A. flavus สามารถเจริญได้ทั่วไปที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 33 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญได้คือ 12 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 43 องศาเซลเซียส ส่วนความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสมจะต้องมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ และความชื้นสัมพัทธ์ต่ำสุดที่สามารถเจริญได้คือ 78 เปอร์เซ็นต์ (Jarvis, 1971) แสงเป็นปัจจัยที่สามารถกระตุ้นการเจริญ และการสร้างสารอะฟลาทอกซิน โดยพบว่า *A. flavus* เจริญในที่มืด ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส และ pH เริ่มต้น 4.0 มีการสร้างอะฟลาทอกซินสูงที่สุด (Joffe & Lisker, 1969) สภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารอะฟลาทอกซินได้แก่

สภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 98 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิระหว่าง 25-37 องศาเซลเซียส (Griffin, 1994) ซึ่งอุณหภูมิที่ทำให้มีการสร้าง aflatoxin B1 สูงสุดคือ 24 องศาเซลเซียส ส่วน aflatoxin G1 สร้างได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส โดยการสร้างสารอะฟลาทอกซินไม่พบเกิดขึ้นที่อุณหภูมิต่ำกว่า 13 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิมากกว่า 42 องศาเซลเซียส (Jarvis, 1971) โดยระยะเวลาในการสร้างสารอะฟลาทอกซินสูงสุดนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของราและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

การจำแนก *A. flavus* โดยทั่วไปทำได้โดยการส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์หรือจำแนกโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อพิเศษ เช่น *Aspergillus flavus* Differential Medium (ADM) ซึ่งสังเกตได้จากมีการสร้างเม็ดสีสีเหลืองส้ม (orange-yellow หรือ cadmium yellow) บริเวณใต้โคโลนี (Bothast & Fennell, 1974) หรือเลี้ยงบน *Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar (AFPA) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่พัฒนามาจาก ADM จะให้ลักษณะสีเหลืองส้มใต้โคโลนี เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 ชั่วโมง (Pitt, Ailsa, Hocking, & Diane 1983) การตรวจหาสารพิษอะฟลาทอกซินสามารถตรวจหาได้โดยเลี้ยงเชื้อ *A. flavus* บนอาหารชนิดพิเศษ เช่น Aflatoxin Producing Agar (APA), Modified Czapek agar, coconut agar, coconut extract agar และ coconut cream agar แล้วสังเกตการเรืองแสงรอบโคโลนีภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร พบว่าเกิดการเรืองแสงสีน้ำเงินรอบ ๆ โคโลนีของรา (Fente *et al.*, 2001)

2.2 ถิ่นอาศัย

สามารถพบ *A. flavus* ได้ทั่วไปตามธรรมชาติ ทั้งในดิน และอากาศ นอกจากนั้นยังพบว่ามีการปนเปื้อนอยู่ในผลิตผลทางการเกษตรต่าง ๆ เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ถั่วลิสง พริกแห้ง หอม กระเทียม เครื่องแกงต่าง ๆ และในผลิตภัณฑ์ประมง ซึ่งผลิตภัณฑ์ประมงที่มีรายงานว่าพบสารพิษชนิดนี้ปนเปื้อนคือกุ้งแห้งและปลาแห้ง (Gourama & Bullerman, 1995)

2.3 การก่อโรค

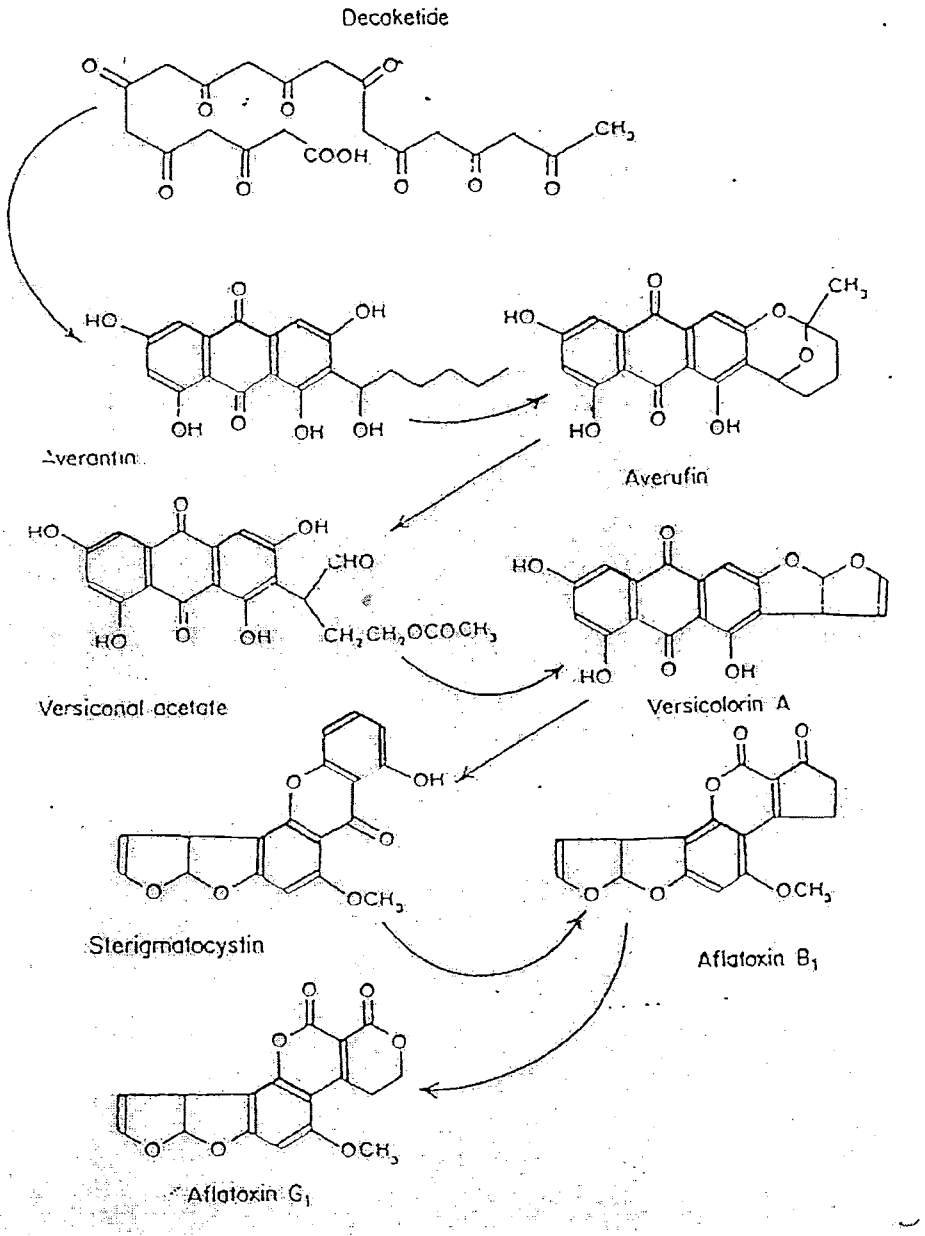
A. flavus เป็นเชื้อฉวยโอกาสชนิดหนึ่งที่พบได้บ่อยและเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค โดยการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน สารอะฟลาทอกซินมีหลายชนิด ที่สำคัญคือ aflatoxin B1, B2, G1 และ G2 โดยที่ aflatoxin B1 มีความเป็นพิษมากที่สุด (Gourama & Bullerman, 1995) อะฟลาทอกซินสามารถก่อให้เกิดพิษได้ทั้งแบบเฉียบพลัน กล่าวคือเมื่อได้รับสารพิษนี้ในปริมาณที่สูงและแบบเรื้อรังซึ่งเกิดจากการได้รับสารพิษในปริมาณไม่สูงนัก แต่ได้รับเป็นเวลานานติดต่อกัน

ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคมะเร็งในตับได้ การเกิดพิษอย่างเฉียบพลันจะมีอาการของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจช่วงบน 2-3 วัน ถึง 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นจะอาเจียนและหมดสติภายใน 24 ชั่วโมง มีอาการชักร่วมด้วยและผู้ป่วยจะตายภายใน 24-48 ชั่วโมง (มาลินี ลิ้มโภคา, 2527)

2.4 การสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

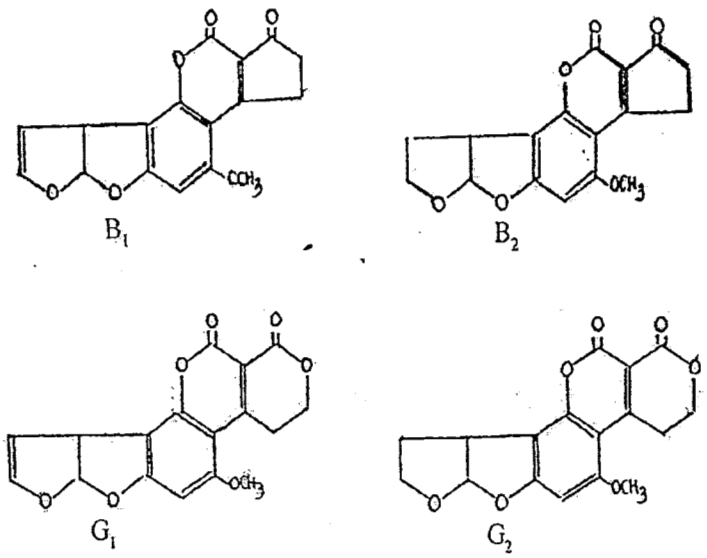
อะฟลาทอกซินจัดเป็นสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่สร้างขึ้นในระยะ stationary phase ของการเจริญ ดังนั้นจึงต้องอาศัยสารตั้งต้นชนิดอื่น เช่น sterigmatocystin หรือสารอะฟลาทอกซินบางชนิดทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในการสร้างสารอะฟลาทอกซินชนิดอื่น (Griffin, 1994) ดังแสดงในภาพที่ 2-5 อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษซึ่งสร้างมาจากรา *A. flavus, A. parasiticus, Penicillium puberulum* และ *P. citrinum* นอกจากนี้ยังอาจพบสร้างในราจีนัส *Mucor* และ *Rhizopus* อีกด้วย แต่ส่วนใหญ่เกิดจาก *A. flavus* และ *A. parasiticus* (Bennett & Klich, (2003) ราพวกนี้ชอบเจริญอยู่บนเมล็ดถั่วลิสง ข้าวโพด ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี มันสำปะหลัง หอม กระเทียมและพริกแห้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้ามีความชื้นอยู่ด้วย 14-30% ก็ยิ่งทำให้ราเจริญได้ดีขึ้น (ยุวดี สมิทธิวาส, 2546) นอกจากนี้ยังเจริญได้ดีในอาหารที่มีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศตั้งแต่ 75% ขึ้นไป สามารถสังเกตการเจริญของราชนิดนี้ได้ด้วยตาเปล่าเนื่องจากมีการสร้างสปอร์สีเขียวอมเหลืองหรือสีเขียวเข้ม สารพิษอะฟลาทอกซินมีสูตรเคมีคือ $C_{17}H_{12}O_6$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 312 คุณสมบัติที่น่าสนใจ เช่น สามารถเรืองแสงได้ในช่วงแสงอัลตราไวโอเลต และละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล คลอโรฟอร์ม หรือเบนซิน ทนความร้อนได้ดีและทนได้ถึงอุณหภูมิ 260 องศาเซลเซียส (กนกรัตน์ ป้องประทุม, 2546)

อะฟลาทอกซินเป็นกลุ่มของสารพิษที่แบ่งออกได้หลายชนิด แต่ที่สำคัญคือ aflatoxin B1, B2, G1 และ G2 (ภาพที่ 2-6) aflatoxin B1 และ B2 มีคุณสมบัติเรืองแสงในช่วงสีน้ำเงิน ส่วน aflatoxin G1 และ G2 มีคุณสมบัติเรืองแสงในช่วงสีเขียว ซึ่ง aflatoxin B1 เป็นชนิดที่มีความรุนแรงที่สุด รองลงมาคือ G1, B2 และ G2 ตามลำดับ (กนกรัตน์ ป้องประทุม, 2546)



ภาพที่ 2-5 ขบวนการสังเคราะห์สารอะฟลาทอกซิน

(ที่มา : Griffin, 1994)



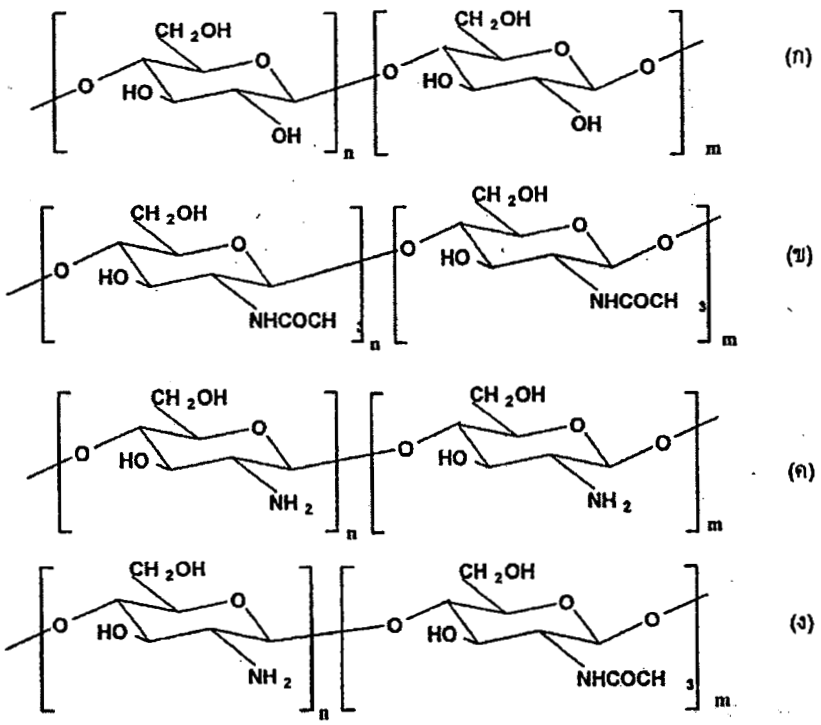
ภาพที่ 2-6 โครงสร้างของสารอะฟลาทอกซิน B1, B2, G1 และ G2
(ที่มา : Wyllie & Morehouse, 1977)

เนื่องจากสารพิษนี้ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน ดังนั้นจึงมักเป็นปัญหาต่อผลผลิตทางการเกษตร เป็นอันตรายต่อทั้งมนุษย์และสัตว์ หากรับประทานเข้าสู่ร่างกายแล้วพิษอาจทำให้เสียชีวิตทันที หรือหากมีการสะสมทีละน้อยอาจทำให้ร่างกายเจ็บป่วยและอาจเป็นมะเร็งตับ เนื่องจากสารพิษอะฟลาทอกซินไปทำอันตรายต่อเซลล์ตับ โดยทำให้มีไขมันสะสมมากที่ตับ ตับแข็ง ตับอักเสบ เลือดออกในตับ เซลล์ตับถูกทำลาย หากได้รับสารพิษนี้ในปริมาณมากถึงระดับหนึ่ง และได้รับเป็นเวลานานก็จะเกิด Hepatocellular carcinoma หรือ Cholangio carcinoma ทำให้เกิดโรคมะเร็งและตายในที่สุด สำหรับในเด็กเมื่อได้รับสารพิษ จะมีอาการชัก หมดสติ เกิดความผิดปกติของเซลล์ตับและเซลล์สมอง จะเสียชีวิตภายในเวลา 2-3 วัน จึงนับว่าเป็นอันตรายร้ายแรงต่อชีวิตเด็กเป็นอย่างมาก นอกจากอะฟลาทอกซินจะก่อให้เกิดมะเร็งแล้วยังเป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagens) อีกด้วย (กนกรัตน์ ป้องประทุม, 2546) อย่างไรก็ตามความเป็นพิษจะมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ปริมาณที่ได้รับ ความถี่ของการบริโภค อายุ เพศ การทำงานของเอนไซม์ในตับ และปัจจัยทางโภชนาการอื่น ๆ

3. รายละเอียดเกี่ยวกับไคโตซาน

3.1 ลักษณะทั่วไปของไคโตซาน

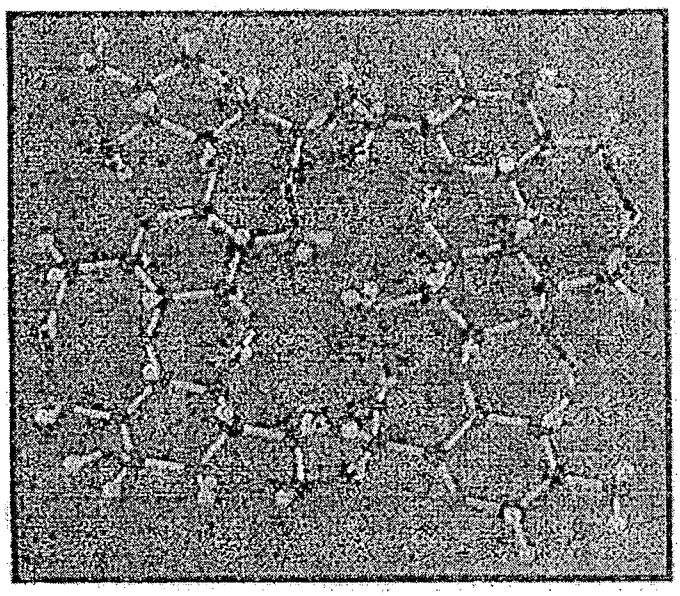
ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ (derivative) ชนิดหนึ่งของไคตินที่ได้จากการทำปฏิกิริยาดีอะซิทิเลชัน (deacetylation) ของไคตินในสารละลายด่างเข้มข้น ไคโตซานประกอบด้วยโครงสร้างทางเคมีส่วนใหญ่ คือ poly (β-(1-4)-2-amino-D-glucose) ไคตินและไคโตซานเป็นโคพอลิเมอร์ (copolymer) ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ (monomer) 2 ชนิดคือ *N*-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ไคตินและไคโตซานมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับเซลลูโลส โดยแตกต่างกันที่หมู่แทนที่ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่สองในวงแหวนไพราโนส (pyranose ring) ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของเซลลูโลส โดยหมู่แทนที่ที่ตำแหน่งนี้ของเซลลูโลสจะเป็นหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) แต่ของไคตินเป็นหมู่อะซิทาไมด์ (acetamide group) ส่วนของไคโตซานเป็นหมู่อะมิโน (amino group) (รัตนา รุจิรวนิช, 2544) มีโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในภาพที่ 2-7



ภาพที่ 2-7 โครงสร้างของสารประกอบ (ก) เซลลูโลส (ข) ไคติน (ค) ไคโตซาน และ (ง) ไคตินและไคโตซานโคโพลิเมอร์

(ที่มา: สุวบุญ จิรชาญชัย, รังรอง ยกส้าน และโกสุม สมัครรัตน์, 2544)

โครงสร้างทางเคมีของโคพอลิเมอร์มีหมู่อะมิโน (NH_2) และหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ที่ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างภายในสายโซ่ (intramolecular hydrogen bonding) และระหว่างสายโซ่ (intermolecular hydrogen bonding) ดังแสดงในภาพที่ 2- 8 โครงสร้างจำลองของสายโซ่ไคตินและไคโตซานที่มีพันธะไฮโดรเจนทั้ง 2 ประเภท คือพันธะไฮโดรเจนแบบภายในสายโซ่เดียวกัน โดยเกิดขึ้นที่ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-3 กับออกซิเจนอะตอม และระหว่างหมู่อะมิโนกับหมู่ไฮดรอกซิลที่ C-6 ในขณะเดียวกันพันธะไฮโดรเจนแบบระหว่างสายโซ่เกิดขึ้นที่หมู่ไฮดรอกซิล C-6 ซึ่งกันและกัน เมื่อพันธะไฮโดรเจนสามารถก่อตัวขึ้นได้ สิ่งที่ตามมาคือโครงสร้างที่แข็งแรงและเชื่อมไป สู่สมบัติทางกายภาพโดยรวม เช่น เมื่อให้ความร้อนไคตินและไคโตซานจะไม่แสดงอุณหภูมิสถานภาพใยแก้ว (Glass transition temperature) ที่จะเป็นอุณหภูมิให้แปรสภาพเป็นสารที่หนืดเหนียว และเมื่อให้ความร้อนต่อเนื่องมีผลทำให้ไคตินและไคโตซานเสื่อมสลาย (degradation) ที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงคือประมาณ 320 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าไคตินและไคโตซานไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายทั่วไปเนื่องจากสายโซ่ที่ตรึงกันแน่นด้วยพันธะไฮโดรเจน (สุวบุญสุวบุญ จิรชาญชัย และคณะ, 2544)



<u>ภาพที่ 2-8</u> โมเดลจำลองสายโซ่ไคโตซานแสดงพันธะไฮโดรเจนแบบภายในโมเลกุลและแบบระหว่างโมเลกุล

(ที่มา: สุวบุญ จิรชาญชัย และคณะ, 2544)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

3.2 การเตรียมไคโตซาน

สารตั้งต้นที่ใช้ในการเตรียมไคโตซานคือ ไคติน และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการเตรียมไคโตซานจากไคตินในสภาวะที่เป็นด่างเข้มข้น คือ ปฏิกิริยาดีอะซิทิเลชัน ผลจากการเกิดปฏิกิริยาดีอะซิทิเลชันจะทำให้หมู่อะซิทาไมด์ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่สองในวงแหวนไพราโนสของไคตินถูกเปลี่ยนเป็นหมู่อะมิโน

หลักการของการเตรียมไคโตซานจากไคติน คือ การเกิดปฏิกิริยาดีอะซิทิเลชันของไคตินในสภาวะที่เป็นด่างเข้มข้น และถ้าต้องการไคโตซานที่มีค่าระดับของการเกิดดีอะซิทิเลชันสูง ๆ ก็ให้ทำปฏิกิริยาในสภาวะที่รุนแรงคือเพิ่มความเข้มข้นหรือความรุนแรงของด่างที่ใช้และใช้อุณหภูมิสูงในการทำปฏิกิริยาหรือการทำปฏิกิริยากับด่างซ้ำหลาย ๆ ครั้ง

3.3 คุณสมบัติที่สำคัญของไคโตซาน

3.3.1 มีค่า pKa ประมาณ 6.3

3.3.2 ละลายได้ในกรดอินทรีย์หลายชนิด แล้วสามารถเปลี่ยนกลับคืนสภาพเดิมได้

3.3.3 เป็นโพลิเมอร์ที่มีประจุบวก

3.3.4 สารละลายมีลักษณะข้นหนืด และมีความใส

3.3.5 สามารถขึ้นรูปได้หลายแบบ เช่น เป็นเส้นใย เป็นเม็ด เป็นแผ่นบาง เป็นต้น

3.4 การประยุกต์ใช้ไคโตซาน

เนื่องจากไคโตซานมีคุณสมบัติทางด้านเคมีหลากหลายและโดดเด่นโดยเฉพาะอย่างยิ่งประสิทธิภาพของการเกิดปฏิกิริยาเคมีกับสารที่มีประจุลบ สามารถเกิดการดูดซับอิออนของโลหะหนักด้วยกรรมวิธีเคมีเชิงซ้อน จึงทำให้มีการนำเอาไคโตซานมาใช้ในด้านการจับและ ดูดซับเพื่อแยกสิ่งปฏิกูลต่าง ๆ ที่ละลายในน้ำเสีย โดยสามารถแยกตะกอนแล้วนำกลับมาใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ อีก เช่น นำมาทำเป็นอาหารสัตว์ และปุ๋ยชีวภาพ เป็นต้น การประยุกต์ใช้ไคโตซานในผลิตภัณฑ์และอุตสาหกรรมต่าง ๆ แบ่งได้ดังนี้

3.4.1 ด้านการเกษตร

ปัจจุบันนี้ไคโตซานมีบทบาทอย่างมากในด้านการนำไปใช้ทางการเกษตรเนื่องจากสมบัติในการเป็นตัวกระตุ้นให้พืชสร้างสารป้องกันตัวเอง (elicitor) ขึ้น และยังมีผลในการต้านทานราบางชนิดที่ทำให้เกิดโรคโคนเน่าในพืชได้ จึงมีการนำมาฉีดพ่นบนพืชผัก พืชดอก

ว๖๖.๗๗๔
ส๖๑๗ ป
ฉ. ๖
251522

พืชผล และนาข้าว นอกจากใช้กับพืชแล้วเกษตรกรยังนำไปใช้ผสมในอาหารสัตว์ ช่วยให้สัตว์เจริญเติบโตแข็งแรง มีสุขภาพดี มีภูมิต้านทานโรคที่มีสาเหตุจากจุลินทรีย์หลายชนิดได้ และยังนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่นในการเลี้ยงกุ้งช่วยให้กุ้งลอกคราบได้ดี และมีสุขภาพแข็งแรง นอกจากนี้ยังใช้ในการปรับสภาพน้ำและสภาพดินในการเลี้ยงกุ้ง ปู ปลา เป็นต้น ทำให้เริ่มมีการใช้ไคโตซานในการเกษตรมากขึ้น หากเกษตรกรมีความเข้าใจและศึกษาข้อมูลในการใช้ไคโตซานอย่างถูกต้องเหมาะสมจะเป็นการสร้างทางเลือกใหม่ให้เกษตรกรในการลดการใช้สารเคมีทางการเกษตรลงไปได้ ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์ในด้านการลดมลภาวะและรักษาสิ่งแวดล้อมและลดการนำเข้าของสารเคมีทางการเกษตรจากต่างประเทศนำไปสู่การลดต้นทุนการผลิตทางการเกษตรได้ (สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2544)

3.4.2 ด้านอาหาร

ในหลายประเทศได้ขึ้นทะเบียนไคโตซานเป็นสารที่ใช้เติมในอาหารและยา โดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่นได้มีผลิตภัณฑ์อาหารที่ผสมไคโตซานเป็นจำนวนมากออกจำหน่ายเป็นเวลานานแล้ว จากคุณสมบัติที่สามารถต่อต้านจุลินทรีย์และราบางชนิดจึงใช้สารไคโตซานเป็นสารกันบูด สารปรุงแต่งเพื่อความคงรูปและคงสีในอาหารต่าง ๆ รวมถึงนำมาใช้เป็นสารเคลือบอาหารและผลไม้ (สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2544)

3.4.3 ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม

ไคโตซานมีคุณสมบัติในการลดสารไขมันบางชนิด เช่น คอเลสเตอรอล จึงทำให้ไคโตซานมีบทบาทในอาหารเสริมที่ใช้ลดไขมันและลดน้ำหนัก นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการใช้เป็นผิวหนังเทียม การรักษาแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก การใช้รักษาเหงือกและฟัน การใช้รักษาและเสริมสร้างสุขภาพของกระดูกอ่อน การใช้เป็นสารหล่อลื่นในเยื่อเมือกตลอดจนเลนส์ตา และการนำมาใช้ช่วยให้เลือดแข็งตัวเร็วขึ้น เป็นต้น (สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2544)

3.4.4 ด้านเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์บำรุงผิว

ไคโตซานมีคุณสมบัติเด่นในการอุ้มน้ำและเป็นตาข่ายคลุมผิวหนัง ตลอดจนต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้ จึงใช้เป็นทั้งสารเติมแต่งและสารพื้นฐานของเครื่องสำอางหลายประเภท เช่น ผสมเป็นแป้งทาหน้า ทั้งแบบแป้งแข็งและแป้งฝุ่น เพื่อความชุ่มชื้นและป้องกันเชื้อโรค เป็นส่วนประกอบของแชมพู ครีมและสบู่ทุกรูปแบบ ใช้ไคโตซานผสมในโลชั่นสำหรับเคลือบเพื่อป้องกัน ตลอดจนบำรุงผิวและเส้นผม (สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2544)

3.4.5 ด้านอุตสาหกรรมสิ่งทอและกระดาษ

อุตสาหกรรมเส้นใย กระดาษ สิ่งทอ มีการใช้ไคโตซาน เช่น ใช้ทำภาชนะบรรจุที่ย่อยสลายได้ในธรรมชาติ ใช้ในการผลิตผ้าที่ย้อมสีติดทนนาน ใช้ในกระบวนการผลิตกระดาษที่มีคุณสมบัติทางกายภาพสูง ทนทานต่อการฉีกขาด หรือผลิตกระดาษที่ซับหมึกได้ดีเพื่อการพิมพ์ที่ต้องการคุณภาพสูง (ปิ่วย อุ่นใจ, 2544)

3.4.6 ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ

จากคุณสมบัติการเป็นเส้นใยและพลาสติกที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติของไคโตซาน ทำให้ไคโตซานถูกนำมาใช้เพื่อทำเป็นสารห่อหุ้มเอนไซม์และเซลล์ต่าง ๆ ด้วยเทคนิคอิมโมบิลไลเซชัน (immobilization) การใช้เป็นตัวแยกสารโดยวิธีโครมาโตรกราฟี การใช้ทำขั้วไฟฟ้าทางชีวภาพ เพื่อการวิเคราะห์และตรวจสอบสารต่าง ๆ การที่ไคโตซานสามารถขึ้นรูปได้หลากหลายรูปแบบ ทำให้ไคโตซานถูกนำมาขึ้นรูปเป็นแผ่นเยื่อบาง เพื่อใช้ในการกรองแยกด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น ไดอะไลซิส เป็นต้น การใช้ไคโตซานย่อมปราศจากสารตกค้าง และสามารถย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ อีกทั้งยังปลอดมลพิษอีกด้วย (สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2544)

3.4.7 ด้านการบำบัดน้ำเสียและทำน้ำบริสุทธิ์

ปัจจุบันมีการนำไคโตซานมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียโดยใช้ไคโตซานในการรวมตะกอนและตกตะกอน แล้วนำตะกอนที่ได้ไปพัฒนาเป็นอาหารสัตว์และปุ๋ยชีวภาพ โดยพิจารณาแหล่งของน้ำเสีย เช่น น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมสัตว์น้ำซึ่งมีโปรตีนสูง สามารถใช้ไคโตซานตกตะกอนได้เป็นอย่างดี จากนั้นตะกอนที่ได้นำไปใช้ประโยชน์ต่อไป นอกจากนี้ในการทำน้ำสะอาดและบริสุทธิ์ เช่นการทำน้ำดื่ม น้ำที่ใช้ในการล้างผิวโลหะที่ต้องการความบริสุทธิ์สูง สามารถใช้ไคโตซานจับพวกธาตุรองหรือจุลธาตุ (trace elements) ที่ละลายปนเปื้อนในปริมาณที่น้อยมากออก มาได้ (สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2544)

3.4.8 เป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial agents)

ในการถนอมอาหารเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา มีผู้วิจัยหลายท่านได้ทดลองนำไคโตซานไปใช้ในการถนอมอาหารเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา และพบว่าไคโตซานมีฤทธิ์ในการยับยั้งหรือชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในกุ้งสด (Simpson, Gagne, Ashie & Noroozi, 1997) หอยนางรม (Chen, *et al.,* 1998) นม (Tsai *et al.,*2000) มายองเนส และสลัดมีใส่มายองเนส (Roller & Covill, 2000) ไส้กรอกหมู (Jo, Lee & Byun, 2001) และเนื้อหมูสด (Sagoo, Board & Roller, 2002) เป็นต้น นอกจากนี้ไคโตซานยังมีผลต่อการปรับปรุงคุณภาพด้านอื่น ๆ ของอาหารอีกด้วย Roller *et al.* (2002) พบว่าการใช้ไคโตซานกลูตาเมตที่ความเข้มข้น 0.6% ร่วมกับการใช้

ซัลไฟต์เข้มข้น 170 ppm ให้ผลเทียบเท่ากับการใช้ซัลไฟต์ 340 ppm ในไส้กรอกหมูแช่เย็น การเติมไคโตซานโอลิโกเมอร์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ยังสามารถลดการเกิดการหืน (lipid oxidation) และลดการเน่าเสีย ทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นและรสชาติที่ดีกว่า นอกจากนี้ยังช่วยรักษาสีแดงของเนื้อในระหว่างการเก็บรักษาได้อีกด้วย (Darmadji & Izumimoto, 1994) ซึ่งรายละเอียดของกลไกในการทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์นั้น รวมทั้งปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งจุลินทรีย์จะได้กล่าวถึงในหัวข้อต่อไป

3.5 กลไกการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของไคโตซาน

ความเข้าใจถึงกลไกของไคโตซานและอนุพันธ์ในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารถือเป็นสิ่งสำคัญ เพราะสามารถบอกถึงสภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งจุลินทรีย์ มีผู้เสนอกลไกการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของไคโตซานและอนุพันธ์ไว้หลายแบบ โดยสามารถสรุปได้ดังนี้

3.5.1 เป็นสารประกอบเชิงซ้อน (chelating agent)

ไคโตซานสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับอิออนของโลหะทรานสิชันได้ เช่น Cu^{+2} Cr^{+3} Ni^{+2} Zn^{+2} Fe^{+3} และ Mn^{+2} กลไกการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตซานคือ หมู่อะมิโนของอะตอมไนโตรเจน ซึ่งมีคู่ของอิเลคตรอนเดี่ยวประกอบอยู่ ทำให้ไคโตซานสามารถสร้างพันธะกับอิออนของโลหะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน โดยปริมาณหมู่อะมิโนของไคโตซานมากขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการดูดซับอิออนของไคโตซานสูงขึ้น (สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2544) คุณสมบัติการเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตซานมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยหมู่อะมิโนของไคโตซานสามารถดูดซับสารอาหารและอิออนของโลหะที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จึงสามารถลดอัตราการเจริญหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ Roller & Covill (1999) อธิบายถึงกลไกของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของรา *Mucor racemosus* เกิดขึ้นเนื่องจากไคโตซานสามารถจับกับอิออนของโลหะและธาตุรอง (trace elements) หรือสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของรา เช่น Ca^{+2} ทำให้ *M. racemosus* ไม่สามารถนำสารอาหารเหล่านี้มาใช้ได้ตามปกติจึงทำให้อัตราการเจริญของ *M. racemosus* ลดลง

3.5.2 ทำให้ผนังเซลล์เสียหาย และเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพเลือกผ่านของเซลล์

โดยทั่วไปความแข็งแรงของเยื่อหุ้มเซลล์ขึ้นกับการเรียงตัวเป็นลำดับของโปรตีนและลิพิด ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ของทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา เช่น ผนังเซลล์ของยีสต์ประกอบด้วยพอลิเมอร์จำนวนมากได้แก่ กลูแคน (28.8%) แมนแนน (31%)

โปรตีน (13%) ลิพิด (8.5%) ไคตินและไคโตซาน (2%) (Roller & Covill, 1999) ไคโตซานมีประสิทธิภาพในการทำลายการจัดระเบียบโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลให้หน้าที่ปกติของเยื่อหุ้มเซลล์เสียไป จุลินทรีย์จึงถูกทำลายในที่สุด

เมื่อพิจารณาตามโครงสร้างทางเคมีของไคตินและไคโตซาน พบว่าโครงสร้างทางเคมีของไคโตซานมีหมู่อะมิโนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ซึ่งทำให้ไคโตซานมีความสามารถในการละลายดีกว่าไคตินและมีคุณสมบัติในการยับยั้งและทำลายแบคทีเรียสูงกว่าไคติน หมู่อะมิโนสามารถทำให้ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ประจุบวก (cationic polymer) เมื่อไคโตซานถูกละลายในสารละลายกรด และเนื่องจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อบาง ในสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่จะเป็นพอลิเมอร์ที่มีประจุลบอยู่ เช่นโปรตีน กรดนิวคลีอิก ดังนั้นไคโตซานในรูปของพอลิเมอร์ประจุบวกนี้ จึงสามารถสร้างพันธะอิออนิกและก่อตัวเป็นชั้นบาง ๆ ของไคโคซานได้ดีบนเซลล์ต่าง ๆ (สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2544) โดย Choi *et al.* (2001) รายงานว่าไคโตซานสามารถเกิดเป็นสารประกอบพอลิอิเลคโตรไลต์ที่ซับซ้อนบริเวณผิวหน้าของผนังเซลล์จุลินทรีย์โดยก่อตัวเป็นชั้นบาง ๆ รอบเซลล์ ซึ่งเป็นการขัดขวางการส่งผ่านสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์เข้าสู่ภายในเซลล์ ทำให้คุณสมบัติการเลือกผ่านของเซลล์สูญเสียไป นอกจากนี้พอลิเมอร์ประจุบวกของไคโตซานสามารถเกิดแรงกระทำกับประจุลบของผนังเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์จุลินทรีย์ ส่งผลให้ผนังเซลล์เกิดความเสียหาย (Roller & Covill, 1999) ทำให้เกิดการรั่วของสารต่าง ๆ ที่มีความสำคัญในขบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์

2.4.4 ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

เอนไซม์ประกอบด้วยหมู่ที่ทำหน้าที่จำเพาะ ซึ่งจะจับกับสับสเตรต และทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาถ้าหมู่ที่ทำหน้าที่นี้ถูกทำลายหรือเปลี่ยนแปลงไป จะทำให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ถูกยับยั้ง ซึ่ง Darmadji & Izumimoto (1994) กล่าวว่าไคโตซานสามารถเข้าไปรบกวนระบบและกลไกการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์จุลินทรีย์ให้ผิดปกติไป

2.4.3 ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีน

ความอยู่รอดของเซลล์ขึ้นกับการรักษาสภาพของโมเลกุลโปรตีนและกรดนิวคลีอิกให้อยู่ในสภาพปกติ การเสียสภาพของโปรตีน หรือกรดนิวคลีอิกอาจทำให้เซลล์เสียหาย กรดนิวคลีอิกและโปรตีน มีบทบาทที่สำคัญในการดำรงชีวิตของเซลล์ การยับยั้งการสังเคราะห์จึงเป็นอันตรายต่อเซลล์มาก แม้ว่าโมเลกุลของไคโตซานมีขนาดใหญ่เกินกว่าที่จะแพร่ผ่านผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ แต่เมื่อไคโตซานถูกไฮโดรไลส์โดยเอนไซม์ที่มีในจุลินทรีย์ เช่น ไคโตซาเนส ไคโตซานจะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลงหรือเป็นโอลิโกเมอร์ (สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2544) ทำให้สามารถแพร่ผ่านเข้าไปภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ จึงสามารถขัดขวางการทำงานของ mRNA

3.6 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซาน

ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ดังนี้

3.6.1 น้ำหนักโมเลกุล

ไคโตซานและอนุพันธ์มีอยู่หลายชนิดทั้งนี้ขึ้นกับสารตั้งต้นที่นำมาใช้ในการผลิต และความแตกต่างของกระบวนการผลิต ทำให้ไคโตซานและอนุพันธ์ที่มีคุณสมบัติต่างกัน ซึ่งได้แก่ น้ำหนักโมเลกุล (Degree of Polymerization, DP) และ DD

ไคโตซานมีความสามารถในการละลายต่ำ (poor solubility) สารละลายซึ่งเตรียมจากไคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีความหนืดมาก ไม่สะดวกในการนำมาประยุกต์ใช้กับกระบวนการผลิตอาหาร ดังนั้นจึงมีการพัฒนาและปรับปรุงคุณสมบัติด้านนี้ของไคโตซานและอนุพันธ์ให้มีความเหมาะสมยิ่งขึ้น โดยผ่านกรรมวิธีทางเคมีหรือใช้เอนไซม์ตัดสายโซ่พอลิเมอร์ของไคโตซานให้สั้นลงเพื่อลดน้ำหนักโมเลกุล และเป็นการเพิ่มความสามารถในการละลายให้ดีขึ้น และสามารถเพิ่มคุณสมบัติด้านการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (นภาพร เชี่ยวชาญ และธนารัตน์ ศรีธุระวานิช, 2547) โดย Jeon, Parke & Kim (2001) ศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซาน (DD 89% น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 685,000 ดาลตัน) และไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (น้ำหนักเฉลี่ย 10, 5 และ 1 กิโลดาลตัน ตามลำดับ) ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียที่สร้างกรด แลกติกหลายชนิด ในอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานสูงกว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ทุกชนิด สำหรับในกลุ่มไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ พบว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 10 กิโลดาลตัน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสูงสุด

Jo *et al.* (2001) กล่าวว่าการเติมไคโตซาน (ความเข้มข้น 0.2% น้ำหนักโมเลกุล 30,000 - 120,000 ดาลตัน) ในไส้กรอกแทนการใช้โซเดียมไนไตรท์ จะช่วยยืดอายุการเก็บรักษานานขึ้น และสามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ลงได้อย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงทำให้ความหนืดสูง เป็นข้อจำกัดในการนำไคโตซานไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิต ดังนั้นจึงแนะนำให้ใช้ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 30,000 ดาลตัน หรือต่ำกว่า แต่จากการทดลองหากใช้ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเกินไป (ความเข้มข้น 0.2% น้ำหนักโมเลกุล 5,000 ดาลตัน) พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในไส้กรอกได้เลย

3.6.2 ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้เตรียมสารละลายไคโตซาน

ไคโตซานสามารถละลายได้ดีในกรดทั้งกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ การนำไคโตซานมาประยุกต์เป็นสารถนอมอาหารจึงเป็นข้อจำกัดให้สามารถใช้ได้เพียงกรดอินทรีย์

เท่านั้น โดยทั่วไปกรดอินทรีย์มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยตัวของกรดเอง และการลดค่าพีเอชของระบบ ดังนั้นกรดอินทรีย์จึงช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดโดยกรดอะซิติค กรดแลคติค และกรดฟอร์มิคมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียมากกว่ากรดโพรพิออนิคและกรดแอสคอร์บิค (นภาพร เชี่ยวชาญ และ ธนารัตน์ ศรีธุระวานิช, 2547)

3.6.3 ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

ความเข้มข้นของไคโตซานและอนุพันธ์ที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์อาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์จุลินทรีย์ มีการรายงานว่าโดยทั่วไปพบว่ายีสต์มีความไวต่อไคโตซานและอนุพันธ์มากกว่าแบคทีเรีย (Roller *et al.*, 2002) นอกจากนี้มีรายงานว่าไคโตซานและอนุพันธ์สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ แต่ทั้งนี้ความเข้มข้นไคโตซานและอนุพันธ์ที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์อาจมีความแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (Jeon *et al.*, 2001)

Xie, Xu, Wang, and Lui (2002) พบว่าการเติมอนุพันธ์ของไคโตซานความเข้มข้น 100 นาโนกรัม / มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* (แกรมบวก) และ *E. coli* (แกรมลบ) ภายในเวลา 30 นาที โดยประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้ง *S. aureus* สูงกว่า *E. coli* และได้อธิบายถึงสาเหตุที่ไคโตซานและอนุพันธ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วยเปปไทด์พอลิไกลโคเจน โดยชั้นเปปไทด์ไกลแคน ถูกประกอบขึ้นเป็นเครือข่าย ซึ่งมีรูพรุนเป็นจำนวนมาก รูพรุนเหล่านี้สามารถทำให้โมเลกุลของสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ง่าย ส่วนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วยเยื่อแผ่นบางของเปปไทด์พอลิไกลโครเจน และผนังเซลล์ชั้นนอก ซึ่งประกอบด้วยไลโพพอลิแซคคาร์ไรด์ ลิปพอโปรตีน (lipoprotein) และ ฟอสฟอลิปิด ซึ่งโครงสร้างของผนังเซลล์ถึง 2 ชั้น โดยผนังเซลล์ชั้นนอกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการส่งผ่านของโมเลกุลสูงได้ดีกว่า ดังนั้นแบคทีเรียแกรมลบจึงมีความต้านทานต่อไคโตซานสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้ Sagoo *et al.* (2002) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ในไส้กรอกแช่เย็นพบว่า เมื่อนำจุลินทรีย์มาทดสอบโดยใช้ 0.9% น้ำเกลือ ผสม 0.05% ไคโตซานที่พีเอช 6.2 สามารถลดจำนวน *Saccharomycodes ludwigii* ได้มากกว่า 4 log cfu/มิลลิลิตร ถ้าเพิ่มความเข้มข้นไคโตซาน (0.25 และ 0.5%) สามารถลดการเจริญของ *Lactobacillus viridescens, Lactobacillus sake* และ *Literia innocua* แต่ไม่สามารถลดการเจริญของ *Torulaspora delbrueckii* และ *Salmonella enteritidis*

3.6.4 ลักษณะของอาหาร

ชนิดของอาหารแตกต่างกันต้องการความเข้มข้นของไคโตซานแตกต่างกัน โดยถ้าลักษณะของอาหารมีองค์ประกอบของอนุภาคมากก็จะขัดขวางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลพอลิเมอร์ของไคโตซาน ซึ่งเป็นการลดโอกาสของไคโตซานในการสัมผัสกับเซลล์ของจุลินทรีย์ (นภาพร เชี่ยวชาญ และธนารัตน์ ศรีธุระวานิช, 2547)

พีเอชของอาหารก็มีผลต่อประสิทธิภาพของไคโตซานและอนุพันธ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์เช่นกัน Wang (1992) ศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ใน Nutrient Broth พบว่า พีเอชมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของไคโตซาน คือที่พีเอชต่ำ (5.5) ส่งผลให้ประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสูงกว่าที่พีเอช 6.5

3.6.5 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีอิทธิพลอย่างมากต่อประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ มีงานวิจัยที่สนับสนุนว่าประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จะเกิดได้ดีขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ เช่น Tsai & Su (1999) ศึกษาผลของอุณหภูมิในช่วง 4 - 37 องศาเซลเซียส ต่อประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่า ในช่วงอุณหภูมิ 4 - 15 องศาเซลเซียส จำนวน *E. coli* ลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 5 ชั่วโมงแรก และเริ่มคงที่ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงอัตราการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไคโตซานและเซลล์ โดยที่อุณหภูมิต่ำส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์ โดยลดจำนวน available binding sites ที่บริเวณผิวหน้าของผนังเซลล์

นอกจากนี้ยังมีรายงานที่สนับสนุนว่าประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เกิดได้ดีขึ้น เมื่อใช้ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ Chen *et al.* (1998) กล่าวว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการยืดอายุการเก็บรักษาหอยนางรม คือการใช้ไคโตซาน DD69 หรือซัลโฟเบนซอยล์ไคโตซานร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (5 องศาเซลเซียส) Roller & Covill (2000) พบว่าประสิทธิภาพของไคโตซานในการเป็นวัตถุกันเสียในมายองเนสควรใช้ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) และ Sagoo *et al.* (2002) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการยืดอายุการเก็บรักษาไส้กรอกหมูคือ การใช้ไคโตซานร่วมกับการรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (7 องศาเซลเซียส)

4. รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

การศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ มีผู้ศึกษากันอย่างแพร่หลาย ทั้งทางด้านการแพทย์ อาหาร และเกษตรกรรม โดยมีการศึกษาทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทต่าง ๆ เช่น ไส้กรอก น้ำผลไม้ ผัก และผลไม้ เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงการใช้ไคโตซานในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่พบปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์น้ำพริก รวมไปถึงการนำไคโตซานไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทนี้ ดังนั้นในการทบทวนเอกสารของงานวิจัยนี้จึงขอนำเสนอเกี่ยวกับการศึกษาถึงประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนและก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลิตภัณฑ์อาหารและผลผลิตทางการเกษตรประเภทต่าง ๆ

Ghaouth, Arul, Asselin, & Benhamou (1992) ศึกษาการเก็บรักษาผลสตรอเบอรี่ โดยจุ่มผลกับสารละลายไคโตซานที่มีความเข้มข้น 10-15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน พบว่าสามารถลดปริมาณของรา *Botrytis cinerea* และ *Rhizopus stolonifer* โดยไคโตซานยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของราทั้งสองชนิด ไคโตซานความเข้มข้นมากกว่า 1.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำให้สตรอเบอรี่เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์เพื่อต่อต้านการรุกรานของรา ซึ่งเอนไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้นได้แก่ เอนไซม์ chitinase, chitosanase และ β-1,3-glucanase

Darmadji & Izumimoto (1994) ศึกษาผลของไคโตซานในการยับยั้งจุลินทรีย์เพื่อการประยุกต์ใช้ในการยืดอายุของเนื้อสัตว์ โดยในเบื้องต้นได้ทดสอบในอาหารเหลว พบว่าไคโตซานความเข้มข้น 0.01% ยับยั้งแบคทีเรียบางชนิดที่เป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสียได้ เช่น *Bacillus subtilis* IFO 3025, *E. coli* RB, *Pseudomonas fragi* IFO 3458 และ *Staphylococcus aureus* IAM1011 และไคโตซานความเข้มข้นที่สูงขึ้น กล่าวคือ 0.1% และ 1.0% สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* IAM 1216, *Pediococcus pentosaceus* IAM 12296 และ *Micrococcus varians* IFO 3765 เมื่อศึกษาในเนื้อโดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน พบว่าไคโตซานความเข้มข้น 0.5-1.0% ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของเนื้อได้ รวมทั้งลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไลปิดและการเน่าเสียของเนื้อ คงสภาพรสชาติได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าไคโตซานมีส่วนช่วยให้เนื้อมีสีแดงในระหว่างการเก็บรักษาอีกด้วย

Chen, Liau, & Tsai (1998) ศึกษาผลของไคโตซาน (DD69), sulfonated chitosan (SC1) และ sulfobenzoyl chitosan (SCB) ในการยับยั้งแบคทีเรีย *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas*

hydrophila, *Salmonella typhimurium* และ *Bacillus cereus* พบว่าค่า MIC ของ SC1 ในการยับยั้งแบคทีเรียเหล่านี้ต่ำกว่าค่า MIC ของ DD69 SCB มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้เทียบเท่ากับ SC1 โดย SCB ความเข้มข้น 1,000 และ 2,000 ppm สามารถยืดอายุของหอยนางรม ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลา 4 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ การศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในหอยนางรม พบว่าไคโตซาน DD69 หรือ SCB สามารถลดอัตราการเจริญของ coliforms, *Pseudomonas*, *Aeromonas* และ *Vibrio* ได้

Roller & Covill (1999) รายงานว่าไคโตซานสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และราที่เกี่ยวข้องกับการเน่าเสียของอาหารได้ เมื่อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำแอปเปิ้ล โดยเมื่อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าไคโตซาน เข้มข้น 1 กรัม/ลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Mucor racemosus* ได้ ในขณะที่การยับยั้ง *Byssochlamys* spp.จำนวน 3 สายพันธุ์ ต้องเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานเป็น 5 กรัม/ลิตร เมื่อเติมไคโตซานลงในน้ำแอปเปิ้ล (pH 3.4) ที่ระดับความเข้มข้น 0.1-5 g/L พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ทั้งหมด 8 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ โดยในเบื้องต้นสามารถลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตได้ถึง 3 log หลังจากนั้นพบว่าบางสายพันธุ์สามารถกลับมาเจริญได้อีกครั้ง สายพันธ์ที่มีความไวต่อไคโตซานมากที่สุดคือ *Zygosaccharomyces bailii* โดยถูกยับยั้งด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 0.1-0.4 กรัม/ลิตร เมื่อเก็บน้ำแอปเปิ้ลไว้ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 32 วัน ยีสต์สายพันธุ์ที่มีความทนทานมากที่สุดคือ *Saccharopmyces ludwigii* ซึ่งต้องใช้ไคโตซานเข้มข้นถึง 5 กรัม/ลิตร จึงถูกยับยั้งได้

Ouattara *et al.* (2000) ศึกษาการใช้ไคโตซานในรูปที่เป็นแผ่นฟิล์มในการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์เนื้อแปรรูปชนิดต่าง ๆ เช่น bologna, ham และ pastrami แบคทีเรียเป้าหมายเป็นกลุ่มที่มีการเจริญบริเวณผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ จากผลการศึกษาพบว่าไคโตซานมีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteraceae และ *Serratia liquefaciens*

Rhoades & Roller (2000) ศึกษาถึงความสามารถของไคโตซาน (poly-β-1-4-glucosamine) และ ไคโตซานไฮโดรไลเสทซ์ (chitosan hydrolysate) ที่เตรียมได้โดยการย่อยสลายไคโตซานด้วยยางมะละกอดิบ หรือไลโซไซม์ พบว่าไคโตซานที่ถูกทำให้ย่อยสลายเพียงเล็กน้อยสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในน้ำเกลือได้ดีขึ้นและยับยั้งการเจริญของยีสต์ที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหารได้มากขึ้นเมื่อนำมาทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าไคโตซานถูกทำให้ย่อยสลายมากขึ้นจะส่งผลให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ และจากการศึกษาในน้ำผลไม้ คือน้ำแอปเปิ้ลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อมีการเติมไคโตซาน 0.3 กรัม/ลิตร และเก็บไว้ที่

อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 วัน พบว่าสามารถกำจัดยีสต์ได้ทั้งหมด ในขณะที่เมื่อนำตัวอย่างดังกล่าวมานับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียแลคติก พบว่ามีอัตราการเพิ่มขึ้นช้ากว่าชุดควบคุม อย่างไรก็ตามเมื่อมี การเติมไคโตซานความเข้มข้น 0.3 หรือ 1.0 กรัม/กิโลกรัมใน chickpea dip ไม่พบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว และเมื่อเติมไคโตซาน 5.0 กรัม/กิโลกรัมในผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน พบการเจริญของแบคทีเรียลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่ไม่พบผลการยับยั้งของไคโตซานต่อการเจริญของยีสต์ การใช้ไคโตซานไฮโดรไลเสทซ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำผลไม้และใน dip ไม่พบว่าให้ผลดีกว่าการใช้ไคโตซานปกติ ทำให้ได้ข้อสรุปว่าไคโตซานมีความเหมาะสมสำหรับการนำมาใช้ในการถนอมอาหารได้สำหรับอาหารบางประเภท

Roller & Covill (2000) ศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานกลูตาเมทในการยับยั้งจุลินทรีย์ในมายองเนส จุลินทรีย์ที่ศึกษาได้แก่ *Salmonella Enteritidis*, *Zygosaccharomyces bailii* และ *Lactobacillus fructivorans* โดยเติมแบคทีเรียแต่ละชนิดในปริมาณ 10^5-10^6 CFU/กรัม ลงในมายองเนส จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 5 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถ *L. fructivorans* ได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ไคโตซานมีผลยับยั้ง *Z. bailii* ได้ประมาณ 1-2 log CFU/ กรัม ในช่วงวันแรกของการทดสอบที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นพบว่ามีการเจริญของเชื้อนี้เกิดขึ้น ส่วนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ไม่พบผลการยับยั้งโดยไคโตซาน เช่นเดียวกับ *Salmonella Enteritidis* ในมายองเนสที่เก็บไว้ทั้ง 2 อุณหภูมิดังกล่าว ไม่พบว่าถูกยับยั้งได้ด้วยไคโตซานที่เติมลงไป

Oh, Kim, Chang, & Kim (2001) ศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย 4 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus plantarum*, *L. fructivorans*, *Serratia liquefaciens* และ *Zygosaccharomyces bailii* พบว่าไคโตซานมีผลทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ลดลง อย่างไรก็ตามเมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่ง บางสายพันธุ์สามารถกลับมาเจริญใหม่ได้ ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานพบว่ามีเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไคโตซาน การเติมไคโตซานลงในมายองเนสพบว่าสามารถลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *L. fructivorans* และ *Z. bailii* ได้ในระหว่างที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าไคโตซานสามารถนำมาใช้เพื่อการเก็บรักษาอาหารได้ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สาเหตุของการเน่าเสียในมายองเนสได้

Sagoo *et al.* (2002) ทดสอบประสิทธิภาพของในโตซานในการยับยั้งจุลินทรีย์ในไส้กรอก โดยในเบื้องต้นเป็นการทดสอบในน้ำเกลือ (0.9%) ที่ผสมไคโตซานในความเข้มข้นต่างๆ (pH 6.2) พบว่าไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 0.05% สามารถลดจำนวน *Saccharomycodes*

ludwigii ได้มากกว่า 4 log cfu/มิลลิลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานเป็น 0.25% และ 0.5% สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus viridescens*, *L. sake* และ *Listeria innocula* ได้ สำหรับ *Torulaspora delbrueckii* และ *Salmonella enteritidis* พบว่าสามารถทนต่อไคโตซานที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว เมื่อทดสอบกับผลิตภัณฑ์ไส้กรอก โดยนำไส้กรอกมาจุ่มในสารละลายไคโตซาน เข้มข้น 1.0% และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 วัน พบว่าสามารถลดการเจริญของจุลินทรีย์ประจำถิ่น (total viable count, ยีสต์ รา และแบคทีเรียแลคติก) ได้ประมาณ 1-3 log cfu/กรัม

Jeon, Kamil, & Shahidi (2002) ศึกษาการใช้ไคโตซานเพื่อนำมาทำฟิล์มสำหรับหุ้มเนื้อปลา 2 ชนิด คือ แอตแลนติกคอดและเฮอร์ริง ในระหว่างที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้ไคโตซานที่ผลิตมาจากเปลือกปู ซึ่งแปรผันให้มีค่าความหนืด 360, 57 และ 14 cP พบว่าไคโตซานที่มีความหนืด 360 cP สามารถช่วยลดการสูญเสียความชื้นจากเนื้อปลาได้ 29-40% เมื่อเก็บปลาไว้เป็นเวลา 4-12 วัน จากการศึกษาพบว่าไคโตซานสามารถลดการเกิดออกซิเดชันของลิปิดในเนื้อปลาได้ รวมทั้งลดการเน่าเสียของเนื้อปลาอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาเคมี นอกจากนี้ยังพบการลดลงของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในเนื้อปลาอีกด้วย ประสิทธิภาพในการรักษาคุณภาพของเนื้อปลาโดยไคโตซานที่มีความหนืด 57 และ 360 cP ดีกว่าไคโตซานที่มีความหนืด 14 cP จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าไคโตซานมีศักยภาพในการนำมาใช้ขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มเพื่อใช้ในการรักษาคุณภาพของอาหารทะเลในระหว่างการเก็บรักษาได้

Tikhonov *et al.* (2006) รายงานว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (3,000 ดาลตัน) สามารถยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรีย ยีสต์และราสายได้เป็นอย่างดี ซึ่งจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้แก่ *E. coli*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus subtilis*, *Candida kruisei* และ *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* ในกรณีของแบคทีเรียและยีสต์พบว่าไคโตซานมีผลทำให้เซลล์ที่ทดสอบตายได้ 66.4-99.9% ส่วนในกรณีของราสายพบว่าไคโตซานยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ได้

Chien, Sheu, & Lin (in press) ศึกษาการใช้ไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (ประมาณ 12,000 ดาลตัน) ความเข้มข้น 0.2-1.0% เคลือบผลไม้ที่ชื่อว่า red pitayas ซึ่งทดสอบในรูปของผลไม้ที่หั่นเป็นชิ้น และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส พบว่าไคโตซานสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ชิ้นผลไม้ดังกล่าวได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้การเคลือบชิ้นผลไม้ด้วยไคโตซานยังช่วยรักษาคุณภาพของผลไม้โดยลดการสูญเสียน้ำ คงคุณภาพของรสชาติ คงปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้และปริมาณของกรดแอสคอร์บิกของผลไม้ไว้อีกด้วย

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. จุลินทรีย์

1.1 แบคทีเรีย

Bacillus cereus ATCC11778 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี มีคุณสมบัติในการสร้างเอนเทอโรทอกซิน

1.2 รา

Aspergillus flavus 05-21 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สร้างอะฟลาทอกซิน คัดแยกได้จากเมล็ดถั่วลิสง (อุษณีย์ กลิ่นนาค, 2549)

2. ไคโตซาน

ไคโตซานบริสุทธิ์ (Fluka) ที่ได้มาจากเปลือกปู มีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล (%DD) 75-85%

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 Nutrient agar

3.2 Nutrient broth

3.3 Trypticase soy broth

3.4 Trypticase soy agar

3.5 Chitosan-Trypticase soy agar

3.6 Potato dextrose agar

3.7 Coconut agar

3.8 Chitosan-coconut agar

3.9 *Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar

3.10 Chitosan-*Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar

3.11 Mannitol egg yolk phenol red polymyxin agar

หมายเหตุ วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงในภาคผนวก ก

4. สารเคมี

4.1 0.1% acetic acid

4.2 10 N NaOH

4.3 Manganese (II) sulfate ($MnSO_4$)

4.4 Ferric ammonium citrate

4.5 0.1% Tween 80

4.6 0.85% น้ำเกลือ

4.7 0.85% น้ำเกลือ-ไคโตซาน

4.8 0.1% peptone water

หมายเหตุ วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงในภาคผนวก ข

5. ยาปฏิชีวนะ

5.1 Polymyxin B

5.2 Ampicillin

5.3 Streptomycin sulfate

6. วัสดุอุปกรณ์

6.1 Spectrophotometer

6.2 Shaker

6.3 pH meter

6.4 Centrifuge

6.5 Heamacytometer

6.6 UV transilluminator

6.6 Light microscope

วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้ง *B. cereus* ATCC11778 ในหลอดทดลอง (*In vitro* experiment)

1. การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

1.1 การเตรียมเซลล์ (Vegetative cells) ของ *B. cereus* ATCC11778

1.1.1 เพาะเลี้ยง *B. cereus* ATCC11778 บนอาหาร Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 ชั่วโมง

1.1.2 เก็บเซลล์โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ขูดเซลล์ของ *B. cereus* ATCC11778 ซึ่งเจริญบนอาหาร NA นำมาแขวนลอยเซลล์ใน 0.85% น้ำเกลือ โดยปรับปริมาณเซลล์ให้มีจำนวนประมาณ 10^5 เซลล์/มิลลิลิตร โดยเทียบความขุ่น (OD_{600}) มีค่าประมาณ 0.03 (ภาคผนวก จ) นำไปใช้ทันทีภายหลังการเตรียม

1.2 การเตรียมสปอร์ของ *B. cereus* ATCC11778

1.2.1 เพาะเลี้ยง *B. cereus* ATCC11778 ในอาหาร Nutrient broth (NB) ซึ่งผสมสารละลาย $MnSO_4$ เข้มข้น 1 ppm (Gonzalez, Lopez, Martinez, Bernarodo, & Gonzalez, 1999) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง (ตรวจพบการสร้างสปอร์ประมาณ 85 - 90%) (Coroller, Leguerinel, & Mafart, 2001)

1.2.2 นำ culture จากข้อ 1.2.1 ไปทำ heat shock โดยนำไปใส่ในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 80±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง

1.2.3 นำ culture ที่ผ่านการทำ heat shock ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้าง pellet ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง ในขั้นตอนนี้จะได้สปอร์อิสระ

1.2.4 แขวนลอยสปอร์ด้วย 0.85% น้ำเกลือ ปรับปริมาณสปอร์ให้มีจำนวนประมาณ 10^5 สปอร์/มิลลิลิตร โดยเทียบความขุ่น (OD_{326}) มีค่าประมาณ 0.3 (สุวรรณี สาฟีอี, 2548) (ภาคผนวก จ) นำไปใช้ทันทีภายหลังการเตรียม

2. การศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสปอร์ที่สามารถงอกและเจริญได้บนอาหารทดสอบ ดัดแปลงจากวิธีการนับปริมาณเซลล์ด้วยวิธี Most probable number (MPN) ระบบ 5 หลอด (Alexander, 1965) โดยปฏิบัติดังนี้

2.1 นำสปอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 1.2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุ 0.85% น้ำเกลือปราศจากเชื้อ (ปริมาตร 9.9 มิลลิลิตร) จากนั้นเจือจาง 10, 100, 1,000 และ 10,000 เท่าตามลำดับ ใน 0.85% น้ำเกลือปราศจากเชื้อ

2.2 นำสปอร์แต่ละค่าการเจือจางจากข้อ 2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหาร Trypticase soy agar (TSA) (ปรับพีเอชเป็น 6.0 ด้วย 1% กรดอะซิติก) ที่มีไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ (0.05%, 0.1%, 0.25% และ 0.5%) แต่ละความเข้มข้นมี 5 จาน (ทดลอง 3 ซ้ำ) ชุดควบคุมเป็นอาหาร TSA ที่ไม่มีไคโตซานผสมอยู่ (ปรับพีเอช เป็น 6.0 ด้วย 1% กรดอะซิติก) นำจานอาหารทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 120 ชั่วโมง

2.3 นับจำนวนจานเพาะเชื้อที่ให้ผลบวก (จานที่มีการเจริญของ *B. cereus* ATCC11778) ไปเทียบหาค่าจำนวน *B. cereus* (MPN/มิลลิลิตร) จากตาราง MPN (ภาคผนวก ง) และคำนวณค่าเฉลี่ยแต่ละชุดการทดลอง

2.4 คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์

= 100-((ค่า MPN ของชุดทดลอง×100)/ค่า MPN เซลล์เริ่มต้นของชุดควบคุม)

<u>หมายเหตุ</u> สปอร์ที่งอกได้หมายถึงสปอร์ที่สามารถพัฒนาเป็นเซลล์ปกติและเจริญเป็นโคโลนีปรากฏบนอาหารที่ทดสอบได้

3. การศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์และสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 ใน 0.85% น้ำเกลือ

3.1 นำเซลล์และสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 ที่ได้จากข้อ 1.1 และ 1.2 ตามลำดับ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุ 0.85% น้ำเกลือปราศจากเชื้อ (ปริมาตร 9.9 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 6.0 ด้วย 1% กรดอะซิติก) ที่มีไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ (สำหรับเซลล์ใช้ความเข้มข้นไคโตซาน 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.25%, 0.5%, 0.75% และ 1.0% ส่วนสปอร์ใช้ความเข้มข้น 0.25%, 0.5%, 0.75% และ 1.0%) ชุดควบคุมเป็น 0.85% น้ำเกลือ (ปรับพีเอช

เป็น 6.0 ด้วย 1% กรดอะซิติก) ที่ไม่มีไคโตซานผสมอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ทดลอง 3 ซ้ำ โดยจัดชุดการทดลองเป็นแบบ Batch

3.2 เก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง (เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง) สำหรับเซลล์ และทุก ๆ 24 ชั่วโมง (เป็นเวลานาน 96 ชั่วโมง) สำหรับสปอร์ โดยเจือจางตัวอย่าง 10, 100, 1,000 และ 10,000 เท่า ตามลำดับ ใน 0.85% น้ำเกลือปราศจากเชื้อ

3.3 ดูดตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากแต่ละค่าการเจือจางใส่ลงในอาหาร Trypticase soy broth (TSB) ปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร ระบบ 5 หลอด (ทดลอง 3 ซ้ำ) บ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง

3.4 นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก (หลอดที่ขุ่น) นำไปเทียบหาค่าจำนวน *B. cereus* ATCC11778 (MPN/มิลลิลิตร) จากตาราง MPN (ภาคผนวก ง) และหาค่าเฉลี่ยแต่ละชุดการทดลอง

3.5 คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของตัวเซลล์และสปอร์ *B. cereus* ATCC11778

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ

= 100-((ค่า MPN ของชุดทดลอง×100)/ค่า MPN เซลล์เริ่มต้นของชุดควบคุม)

ตอนที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้ง *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างอะฟลาทอกซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมหัวเชื้อ

1.1 การเตรียมหัวเชื้อในรูปเส้นใย และทดสอบเพื่อยืนยันคุณสมบัติเบื้องต้นของ *A. flavus*

1.1.1 เพาะเลี้ยง *A. flavus* 05-21 บนอาหาร *Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar (AFPA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 4-5 วัน

1.1.2 สังเกตลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณด้านล่างของโคโลนีจะมีสีเหลืองส้ม โคโลนีของ *A. flavus* มีสีเขียวอมเหลือง (Pitt *et al.*, 1983) นำไปใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการศึกษาต่อไป

1.2 การเตรียมหัวเชื้อราในรูปสปอร์

1.2.1 เพาะเลี้ยง *A. flavus* 05-21 บนอาหาร AFPA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 4-5 วัน

1.2.2 เก็บสปอร์ของรา โดยใช้สารละลาย 0.1% Tween 80 ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีราเจริญอยู่ เขย่าเบา ๆ เพื่อให้สปอร์หลุดออกจากเส้นใย ดูดสารละลายสปอร์ใส่ลงในขวดปราศจากเชื้อขนาด 100 มิลลิลิตร

1.2.3 นับจำนวนสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาคผนวก ค) และปรับปริมาณของสปอร์ด้วยสารละลาย 0.1% Tween 80 ที่ปราศจากเชื้อให้ได้เป็น 10^5 สปอร์/มิลลิลิตร ตรวจสอบปริมาณสปอร์ที่แน่นอนอีกครั้ง นำไปใช้ทันทีภายหลังการเตรียม

2. การตรวจสอบความสามารถในการสร้างอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* 05-21 (Fente *et al.*, 2001)

2.1 เพาะเลี้ยง *A. flavus* 05-21 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ coconut agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4-5 วัน

2.2 ตรวจสอบการเรืองแสง (สีน้ำเงิน หรือน้ำเงินอมเขียว) รอบ ๆ โคโลนี โดยนำไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

3. การศึกษาผลของไคโตซานต่อการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* 05-21

3.1 ใช้ cork borer ตัดเส้นใยของ *A. flavus* 05-21 บริเวณขอบโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ AFPA (ข้อ 1.1) นำไปวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ coconut agar ที่มีไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ (0.25%, 0.5%, 0.75% และ 1.0%) (ปรับพีเอชเป็น 6.0 ด้วย 1% กรดอะซิติก) ทดลอง 3 ซ้ำ ชุดควบคุมเป็นอาหาร coconut agar ที่ไม่เติมไคโตซาน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

3.2 เมื่อเพาะเลี้ยงราจนสังเกตเห็นลักษณะการเจริญที่ค่อนข้างสมบูรณ์ คือสังเกตเห็นเส้นใยและสปอร์ชัดเจน (เพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 4-5 วัน) วัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี และแสดงประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของราโดยคำนวณจากสูตรดังนี้

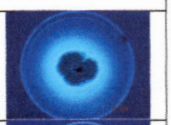
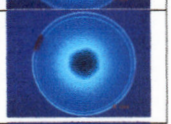
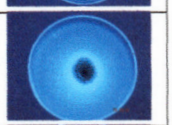
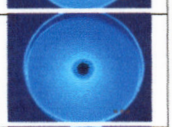
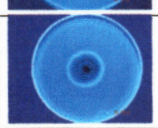
$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ} = 100-((100A)/B)$$

โดย A = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของราในชุดทดลอง

B = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของราในชุดควบคุม

3.3 นำจานเพาะเชื้อไปตรวจสอบการสร้างอะฟลาทอกซิน โดยตรวจการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร บันทึกระดับการเรืองแสงที่ตรวจสอบด้วยตาเปล่า ดังแสดงในตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 ระดับการเรืองแสงที่ปรากฏบนอาหาร coconut agar เพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการระบุความสามารถในการสร้างอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* 05-21

สัญลักษณ์	ระดับการเรืองแสง	ภาพประกอบ
++++	พบการเรืองแสงชัดเจนมาก	
+++	พบการเรืองแสงชัดเจน	
++	พบการเรืองแสงชัดเจนเล็กน้อย	
+	พบการเรืองแสงแต่ไม่ชัดเจน	
-	ไม่พบการเรืองแสง	

4. การศึกษาผลของไคโตซานต่อการมีชีวิตรอดของสปอร์ *A. flavus* 05-21

4.1 นำสปอร์แขวนลอย (ดังวิธีข้อ 1.2) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรมาใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลาย 0.1% Tween 80 ปราศจากเชื้อ (ปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 6.0 ด้วย 1% กรดอะซิติก) ที่มีไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ (0.25%, 0.5%, 0.75% และ 1.0%) ชุดควบคุมเป็นสารละลาย 0.1% Tween 80 (ปรับพีเอชเป็น 6.0 ด้วย 1% กรดอะซิติก) ที่ไม่มีไคโตซานผสมอยู่ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง

4.2 เก็บตัวอย่างโดยนำสปอร์ในข้อ 4.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานอาหาร AFPA เกลี่ยให้ทั่วจาน

4.3 ตรวจสอบการงอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยในอาหาร 1 จาน จะตรวจสอบสปอร์แบบสุ่ม จำนวนทั้งหมด 115±5 สปอร์ พร้อมทั้งรายงานเปอร์เซ็นต์สปอร์ที่มีชีวิตรอด (สามารถงอกได้)

<u>หมายเหตุ</u> สปอร์ที่ถือว่ามีการงอกนั้นจะต้องมีความยาวของ germ tube เท่ากับหรือมากกว่าความยาวของสปอร์

5. การศึกษาผลของไคโตซานต่อการงอกของสปอร์รา

5.1 เพาะเลี้ยง *A. flavus* 05-21 บนอาหาร AFPA บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 4-5 วัน

5.2 นำสปอร์แขวนลอยที่เตรียมได้ (ข้อ 1.2) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานอาหาร AFPA ที่มีไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ (0.1%, 0.25%, 0.5%, 0.75% และ 1.0%) (ปรับพีเอชเป็น 6.0 ด้วย 1% กรดอะซิติก) เกลี่ยให้ทั่วจาน ทดลอง 3 ซ้ำ ชุดควบคุมเป็นอาหาร AFPA ที่ไม่มีไคโตซาน

5.3 ตรวจสอบการงอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยในอาหาร 1 จาน จะตรวจสอบสปอร์แบบสุ่ม จำนวนทั้งหมด 115±5 สปอร์ พร้อมทั้งรายงานเปอร์เซ็นต์สปอร์ที่มีชีวิตรอด (สามารถงอกได้)

หมายเหตุ สปอร์ที่ถือว่ามีการงอกนั้นจะต้องมีความยาวของ germ tube เท่ากับหรือมากกว่าความยาวของสปอร์

ตอนที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้ง *B. cereus* และ *A. flavus* ในน้ำพริก

1. นำน้ำพริกปรุงรส (น้ำพริกตาแดง และน้ำพริกเผา) ที่ผลิตเสร็จใหม่ ๆ ใส่ภาชนะปิดที่สะอาด นำไปฆ่าเชื้อโดยการออโตเคลปที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที
2. แบ่งชุดการทดลองเป็นดังนี้

ชุดที่ 1 น้ำพริก 25 กรัม + *B. cereus* (10^2 เซลล์/น้ำพริก 1 กรัม) (ชุดควบคุม)

ชุดที่ 2 น้ำพริก 25 กรัม + *B. cereus* (10^2 เซลล์/น้ำพริก 1 กรัม) + ไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ (0.5% และ 1.0%)

ชุดที่ 3 น้ำพริก 25 กรัม + *A. flavus* (10^4 สปอร์/น้ำพริก 1 กรัม) (ชุดควบคุม)

ชุดที่ 4 น้ำพริก 25 กรัม + *A. flavus* (10^4 สปอร์/น้ำพริก 1 กรัม) + ไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ (0.5%, 1.0%, 1.5% และ 2.0%)

จัดชุดทดลองเป็นแบบ batch ทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง

3. เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน เป็นเวลานาน 15 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณนับจำนวน *B. cereus* โดยวิธี Most probable number (MPN) ระบบ 5 จานเพาะเชื้อ (Alexander, 1965) ด้วยอาหาร Mannitol egg yolk phenol red polymyxin agar (MYP) บ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนจานเพาะเชื้อที่ให้ผลบวก (จานที่มีการเจริญของ *B. cereus*) ไปเทียบหาค่าจำนวน *B. cereus* (MPN/กรัม) จากตาราง MPN และหาค่าเฉลี่ยแต่ละชุดการทดลอง และนับจำนวน *A. flavus* โดยวิธี dilution spread plate บนอาหาร Potato

dextrose agar บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 48-72 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อและคำนวณหาจำนวน *A. flavus* (CFU/กรัม)

ตอนที่ 4 การศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำพริกเผาและน้ำพริกตาแดง

1. การเก็บตัวอย่างและการผสมไคโตซานในน้ำพริกปรุงรส

นำน้ำพริกปรุงรส (น้ำพริกเผาและน้ำพริกตาแดง) ที่เตรียมเสร็จใหม่ ๆ ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ (0.25%, 0.5%, 1.0% และ 2.0%) ชุดควบคุมเป็นน้ำพริกที่ไม่เติมไคโตซาน แบ่งน้ำพริกแต่ละชุดการทดลองใส่ถุงปราศจากเชื้อ ถุงละ 25 กรัม โดยจัดชุดการทดลองแบบ Batch เก็บตัวอย่างเพื่อทดสอบทางจุลชีววิทยาทุก 3 วัน เป็นเวลานาน 15 วัน

2. การทดสอบทางจุลชีววิทยา

2.1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count)

นับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยวิธี Most probable number (MPN) ระบบ 5 จานเพาะเชื้อ (Alexander, 1965) ด้วยอาหาร plate count agar บ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37± 2 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนจานเพาะเชื้อที่ให้ผลบวก (จานที่มีการเจริญของจุลินทรีย์) ไปเทียบหาค่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (MPN/กรัม) จากตาราง MPN และหาค่าเฉลี่ยแต่ละชุดการทดลอง

2.2 *Bacillus* spp.

นับจำนวน *Bacillus* spp. โดยวิธี Most probable number (MPN) ระบบ 5 จานเพาะเชื้อ (Alexander, 1965) ด้วยอาหาร Mannitol egg yolk phenol red polymyxin agar บ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนจานเพาะเชื้อที่ให้ผลบวก (จานที่มีการเจริญของ *Bacillus* spp.) ไปเทียบหาค่าจำนวน *Bacillus* spp. (MPN/กรัม) จากตาราง MPN และหาค่าเฉลี่ยแต่ละชุดการทดลอง

2.3 ยีสต์ และรา

นับจำนวนยีสต์และราโดยวิธี dilution spread plate บนอาหาร Potato dextrose agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง นาน 48-72 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อและคำนวณปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/กรัม)

บทที่ 4

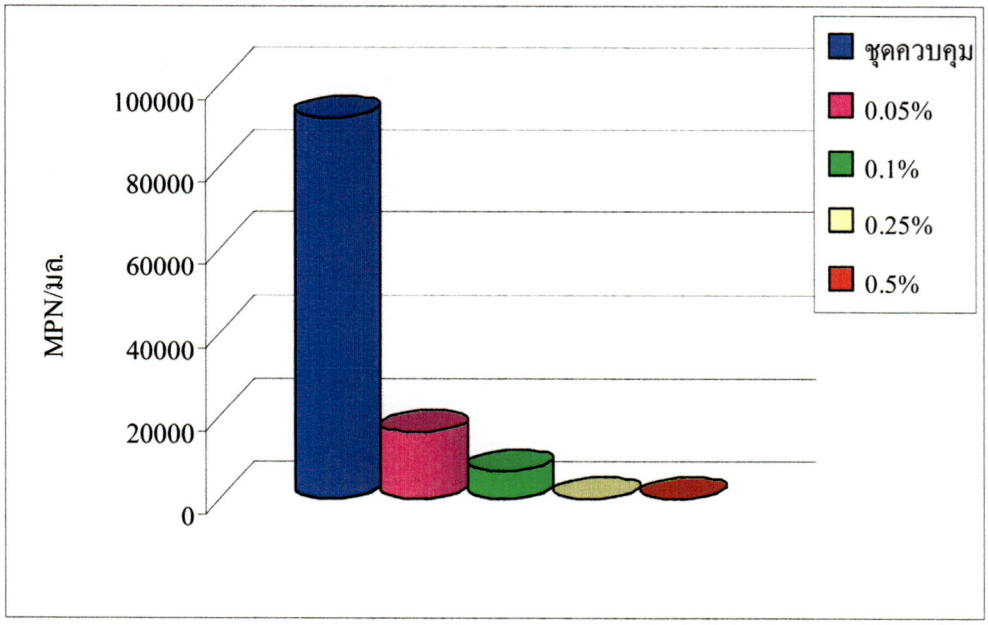
ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 ประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้ง *B. cereus* ATCC11778 ในหลอดทดลอง

1. การศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการนำสปอร์แขวนลอยของ *B. cereus* ATCC11778 เกลี่ยลงบนอาหาร Trypticase soy agar (TSA) พีเอช 6.0 ที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ โดยมีชุดควบคุมเป็นอาหาร TSA ที่ไม่มีไคโตซานผสมอยู่บ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่าไคโตซานสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยพบว่าบนอาหาร TSA ที่ผสมไคโตซานความเข้มข้น 0.05% และ 0.1% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งตรวจพบการเจริญและพัฒนาเป็นเซลล์ปกติในอาหาร TSA ในปริมาณ 1.6×10^4 และ 6.6×10^3 MPN/มิลลิลิตร ตามลำดับในขณะที่ชุดควบคุมตรวจพบโคโลนีของ *B. cereus* ATCC11778 จำนวน 9.2×10^4 MPN/มิลลิลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานเป็น 0.25% พบการพัฒนาของสปอร์เป็นเซลล์ปกติ 0.325 MPN/มิลลิลิตร ส่วนบนอาหาร TSA ที่ผสมไคโตซานความเข้มข้น 0.5% ไม่พบการเจริญแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ดังแสดงในภาพที่ 4-1

เมื่อนำผลการศึกษามาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 พบว่าไคโตซานความเข้มข้น 0.05% และ 0.1% สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 82.29% และ 96.13% ตามลำดับ (ตารางที่ 4-1) ในขณะที่ไคโตซานความเข้มข้น 0.25% และ 0.5% สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้อย่างสมบูรณ์ (100%)



ภาพที่ 4-1 การพัฒนาของสปอร์เป็นเซลล์ปกติของ *B. cereus* ATCC11778 บนอาหาร TSA (พีเอช 6.0) โดยไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ชุดควบคุมเป็นอาหาร TSA ที่ไม่เติมไคโตซาน บ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตารางที่ 4-1 การยับยั้งการงอกของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 บนอาหาร TSA (พีเอช 6.0) ที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ

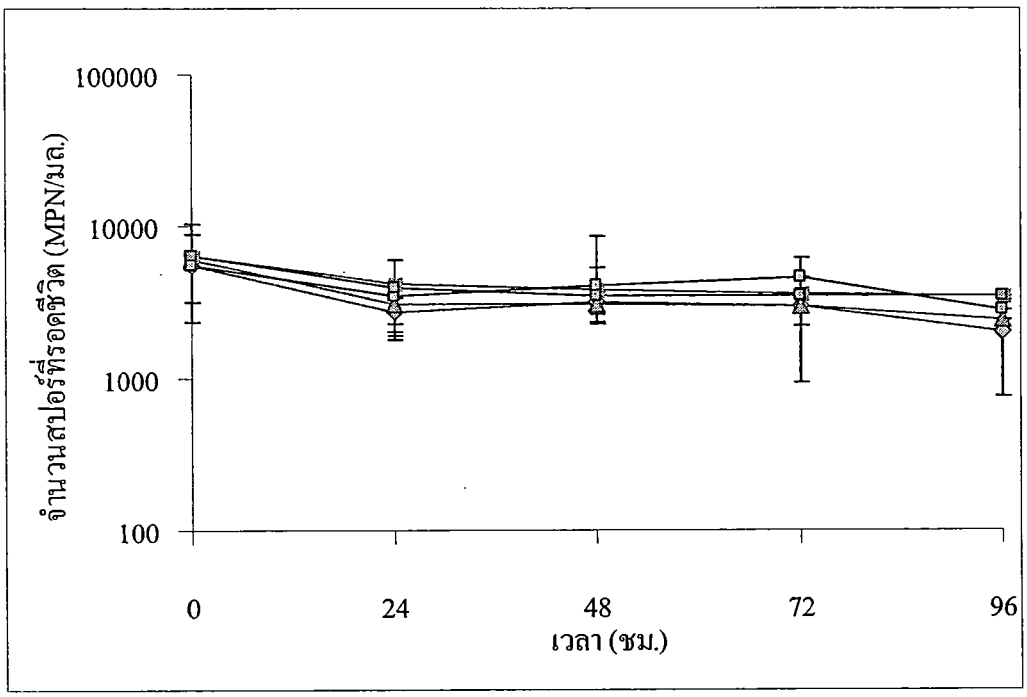
ความเข้มข้นไคโตซาน (%)	การยับยั้งการงอกของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 (%)
0.05	82.26 ± 0.00
0.10	96.13 ± 3.4
0.1●	100 ± 0.00
0.50	100 ± 0.00

หมายเหตุ : การยับยั้งการงอกของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 (%) คำนวณจากสูตรดังนี้
100 - ((ค่า MPN ของชุดทดลอง/ค่า MPN เซลล์เริ่มต้นของชุดควบคุม)×100)
ชุดควบคุมเป็นอาหาร TSA (พีเอช 6.0) ที่ไม่เติมไคโตซาน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง สปอร์ที่งอกได้หมายถึงสปอร์ที่สามารถพัฒนาเป็นเซลล์ปกติและเจริญเป็นโคโลนีปรากฏบนอาหาร TSA

2. ประสิทธิภาพของไคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 ใน 0.85% น้ำเกลือ

จากการนำสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุ 0.85% น้ำเกลือปราศจากเชื้อ (พีเอช 6.0) ที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ โดยมีชุดควบคุมเป็น 0.85% น้ำเกลือที่ไม่มีไคโตซานผสมอยู่ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28±2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลาต่าง ๆ จากนั้นนำสปอร์แขวนลอยดังกล่าวมาตรวจสอบการรอดชีวิต ในอาหาร TSB ผลการทดลองจากชุดควบคุมแสดงให้เห็นว่าการรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 มีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาของการที่สปอร์แขวนลอยอยู่ในน้ำเกลือนานขึ้น โดยพบว่าภายหลังการถ่ายเชื้อลงในน้ำเกลือ 96 ชั่วโมง ปริมาณของสปอร์ลดลงจาก $6.35\times10^{3} \pm 4.03\times10^{3}$ MPN/มิลลิลิตร เหลือเพียง $3.5\times10^{3} \pm 0.00$ MPN/มิลลิลิตร สำหรับในชุดทดลองซึ่งเป็นน้ำเกลือที่เติมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.25%, 0.5%, 0.75% และ

1.0% พบว่าไคโตซานความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลในการทำลายสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 เนื่องจากยังคงมีสปอร์ที่สามารถเจริญเป็นเซลล์ปกติในอาหาร TSB ในจำนวนที่ใกล้เคียงกับชุดควบคุม ในปริมาณ 2.03×10^{3}- 3.5×10^{3} MPN/มิลลิลิตร ดังภาพที่ 4-2



ภาพที่ 4-2 การรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 เมื่อทดสอบใน 0.85% น้ำเกลือพีเอช 6.0 ที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ชุดควบคุมเป็น 0.85% น้ำเกลือที่ไม่เติมไคโตซาน อาหารสำหรับเพาะเลี้ยง (recovery medium) คือ TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส (—▫— : ชุดควบคุม, —◇— :ไคโตซาน 0.25%, —△— :ไคโตซาน 0.5%, —□— : ไคโตซาน 0.75%, —▣—: ไคโตซาน 1.0%)

3. ประสิทธิภาพของไคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ *B. cereus* ATCC11778 ใน 0.85% น้ำเกลือ

จากการนำเอาเซลล์ *B. cereus* ATCC11778 ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุ 0.85% น้ำเกลือปราศจากเชื้อพีเอช 6.0 ที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ โดยมีชุดควบคุมเป็น0.85% น้ำเกลือที่ไม่มีไคโตซานผสมอยู่ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 ±2 องศาเซลเซียส) จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยดังกล่าวมาตรวจสอบการรอดชีวิตโดยเพาะเชื้อในอาหาร TSB ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการรอดชีวิตของเซลล์ *B. cereus* ATCC11778 ลดลงเมื่อระยะเวลาของการที่เซลล์แขวนลอยอยู่ในน้ำเกลือนานขึ้น โดยจากผลที่ตรวจพบในชุดควบคุมพบว่าภายหลังการถ่ายเชื้อลงในน้ำเกลือ 36 - 48 ชั่วโมง ปริมาณของเซลล์ลดลงจาก $9.57\times10^{3} \pm 6.25\times10^{3}$ MPN/มิลลิลิตร เหลือเพียง $1.87\times10^{3} \pm 0.40\times10^{3}$ MPN/มิลลิลิตร ในชุดทดลองซึ่งเป็นน้ำเกลือที่เติมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.25%, 0.5%, 0.75% และ1.0% พบว่าไคโตซานมีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ทันทีภายหลังที่มีการใส่เซลล์ลงไปทดสอบ (ใช้เวลาประมาณ 15-20 นาที หลังการถ่ายเชื้อ) โดยที่เวลาเริ่มต้นพบว่ามีปริมาณเซลล์เพียง 13 ± 0.00 - $1.0\times10^{3} \pm 0.92\times10^{2}$ MPN/มิลลิลิตร เมื่อนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์ พบว่าสามารถยับยั้งได้ถึง $80.60 \pm 4.50\%$ - $99.89 \pm 0.00\%$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เริ่มต้นของชุดควบคุม (ตารางที่ 4-2) หลังจากนั้นจนถึงที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเซลล์ลดอีกเล็กน้อยและค่อนข้างคงที่ 4.5 ± 0.00 - 33.3 ± 0.00 MPN/มิลลิลิตร การยับยั้งการเจริญของเซลล์คิดเป็น 96.5 ± 0.00 - $99.98 \pm 0.00\%$ โดยที่ผลของไคโตซานระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ *B. cereus* ATCC11778 นั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4-2 การยับยั้งการเจริญของเซลล์ *B. cereus* ATCC11778 เมื่อทดสอบใน 0.85% น้ำเกลือ พีเอช 6.0 ที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นไคโตซาน (%)	การยับยั้งการเจริญของเซลล์ *B. cereus* ATCC11778 (%)[ก]		
	เวลาเริ่มต้น[ข]	24 ชม.	48 ชม.
0.01	88.91 ± 0.00	88.91 ± 0.00	96.51 ± 0.00
0.05	84.78 ± 6.40	99.34 ± 0.03	99.39 ± 0.16
0.10	80.60 ± 4.50	97.74 ± 0.00	97.80 ± 1.54
0.25	99.76 ± 0.00	99.86 ± 0.01	99.98 ± 0.00
0.50	99.89 ± 0.00	99.91 ± 0.00	99.98 ± 0.00
0.75	99.71 ± 0.07	99.89 ± 0.04	99.98 ± 0.00
1.00	96.29 ± 2.73	99.95 ± 0.00	99.98 ± 0.00

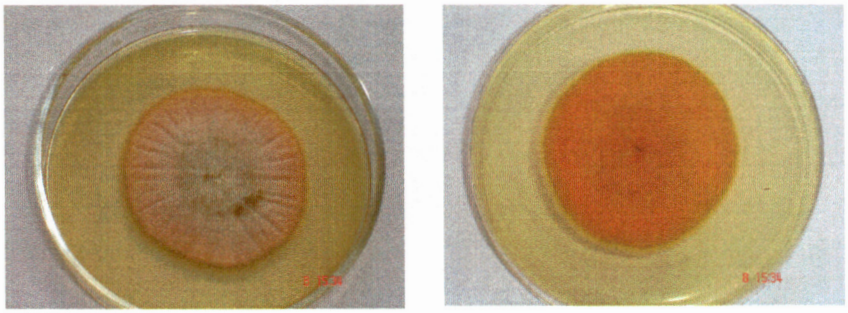
หมายเหตุ [ก] เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์ *B. cereus* ATCC11778 คำนวณจากสูตรดังนี้
100-((ค่า MPN ของชุดทดลอง×100)/ค่า MPN เซลล์เริ่มต้นของชุดควบคุม)
ชุดควบคุมเป็นน้ำเกลือ (0.85%) พีเอช 6.0 ไม่เติมไคโตซาน

[ข] เวลาเริ่มต้นนับจากการลงเชื้อและเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์การเจริญซึ่งใช้เวลาประมาณ 15-20 นาที

ตอนที่ 2 ประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้ง *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างอะฟลาทอกซิน

1. การเจริญของ *A. flavus* 05-21 บนอาหาร AFPA

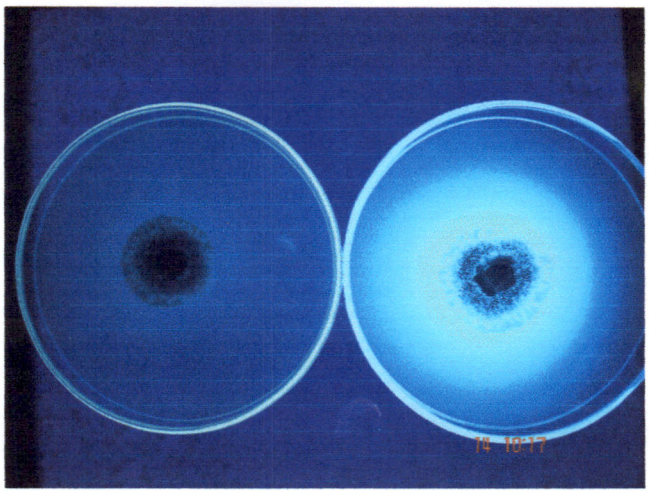
ราที่มีความสามารถในการสร้างอะฟลาทอกซินที่นำมาศึกษาในครั้งนี้คือ *A. flavus* สายพันธุ์ 05-21 ซึ่งคัดแยกได้จากเมล็ดถั่วลิสง *A. flavus* 05-21 ที่เจริญบนอาหาร PDA มีลักษณะเส้นใยมีสีขาวฟูเล็กน้อย สปอร์มีสีเขียว มาเพาะเลี้ยงบน AFPA พบว่า *A. flavus* 05-21 ให้ลักษณะของโคโลนีสีเขียวอมเหลือง เส้นใยฟูเล็กน้อย และเมื่อสังเกตลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่างของโคโลนี พบว่ามีสีเหลืองอมส้มเห็นรอยหยักใต้เส้นใยชัดเจน ดังภาพที่ 4-3



ภาพที่ 4-3 ลักษณะด้านบน (ซ้าย) และด้านล่าง (ขวา) ของโคโลนี *A. flavus* 05-21 ขณะเจริญบนอาหาร AFPA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน

2. ความสามารถในการสร้างอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* 05-21

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. flavus* 05-21 บนอาหาร coconut agar แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 วัน จนสังเกตเห็นลักษณะโคโลนีของ *A. flavus* 05-21 เจริญค่อนข้างสมบูรณ์ กล่าวคือสังเกตเห็นเส้นใยและสปอร์ชัดเจน จากนั้นตรวจสอบการเรืองแสงรอบ ๆ โคโลนีโดยนำไปส่องด้วยแสงอัตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร พบว่ามีการเรืองแสงสีน้ำเงินอมเขียวชัดเจนมาก (+4) รอบโคโลนีของ *A. flavus* 05-21 ดังภาพที่ 4-4



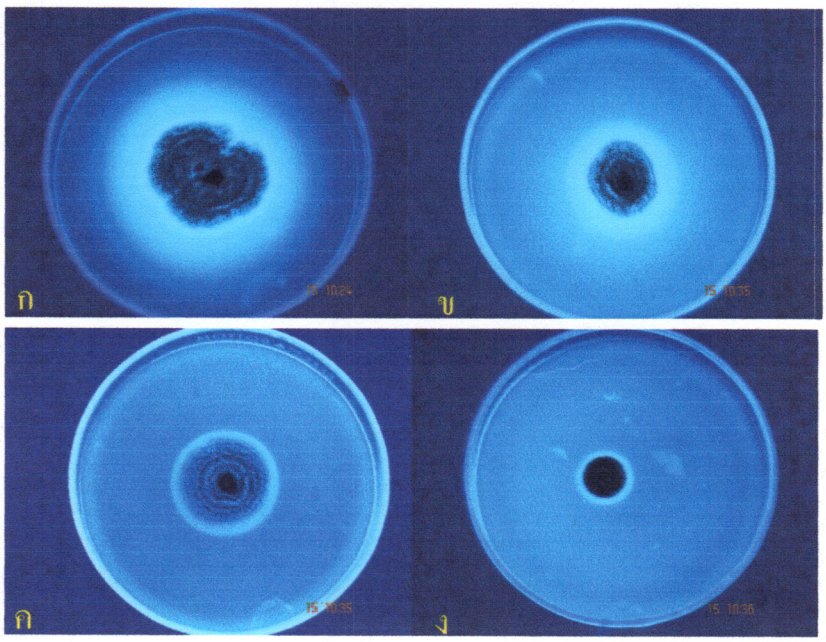
ภาพที่ 4-4 ลักษณะการเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตรของ *A. flavus* 05-21 (ขวา) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร coconut agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน โดยราที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงลบคือ *A. oryzae* (ซ้าย)

หมายเหตุ ++++ = พบการเรืองแสงชัดเจนมาก
+++ = พบการเรืองแสงชัดเจน
++ = พบการเรืองแสงชัดเจนเล็กน้อย
+ = พบการเรืองแสงแต่ไม่ชัดเจน
- = ไม่พบการเรืองแสง

3. ผลของไคโตซานต่อการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* 05-21

เมื่อนำเส้นใยของ *A. flavus* 05-21 ที่เจริญบนอาหาร AFPA มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร coconut agar ที่มีไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.25%, 0.5%, 0.75% และ 1.0% โดยมีชุดควบคุมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ coconut agar ที่ไม่เติมไคโตซาน นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนสังเกตเห็นลักษณะการเจริญที่ค่อนข้างสมบูรณ์ (ประมาณ 4-5 วัน) คือสังเกตเห็นเส้นใยและสปอร์ชัดเจน วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและตรวจสอบการสร้างอะฟลาทอกซิน โดยการตรวจการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ซึ่งเป็นการตรวจสอบด้วยตาเปล่า พบว่าไคโตซานความเข้มข้น 0.25% สามารถลดการเรืองแสงรอบโคโลนีของ *A. flavus* 05-21จากชัดเจนมาก (+4) เป็นชัดเจนเล็กน้อย (+2) ในขณะที่ไคโตซานความเข้มข้น 0.5%, 0.75% และ 1.0% ไม่พบการเรืองแสง

รอบโคโลนี (ภาพที่ 4-5) การยับยั้งการเจริญของเส้นใย *A. flavus* 05-21พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* 05-21 เพิ่มขึ้นเมื่อไคโตซานมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นดังตารางที่ 4-3 โดยที่ระดับความเข้มข้นไคโตซาน 0.25%, 0.5%, 0.75% และ 1.0% สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* 05-21 ที่บ่มอุณหภูมิห้องนาน 5 วัน ได้ 9.09 ± 0.00%, 25.0 ± 0.0%, 62.5 ± 1.61% และ 75.0 ± 0.0% ตามลำดับ



ภาพที่ 4-5 ลักษณะการเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตรของ *A. flavus* 05-21 เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 5 วัน บนอาหาร coconut agar (ก) ชุดควบคุมไม่เติมไคโตซาน (ข) เติมไคโตซาน 0.25%, (ค) เติมไคโตซาน 0.5% และ (ง) เติมไคโตซาน 0.75%

ตารางที่ 4-3 ผลของไคโตซานต่อการเจริญของเส้นใยและการสร้างอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* 05-21 เมื่อเพาะเลี้ยงบน coconut agar นาน 4 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

ความเข้มข้นไคโตซาน (%)	การเรืองแสงรอบโคโลนี	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย *A. flavus* 05-21
ชุดควบคุม	++++	0.00
0.25	++	9.09 ± 0.0
0.50	-	25.0 ± 0.0
0.75	-	62.5 ± 1.61
1.00	-	25.0 ± 0.0

หมายเหตุ ++++ = พบการเรืองแสงชัดเจนมาก
+++ = พบการเรืองแสงชัดเจน
++ = พบการเรืองแสงชัดเจนเล็กน้อย
+ = พบการเรืองแสงแต่ไม่ชัดเจน
- = ไม่พบการเรืองแสง

4. ผลของไคโตซานต่อการมีชีวิตรอดของสปอร์ *A. flavus* 05-21

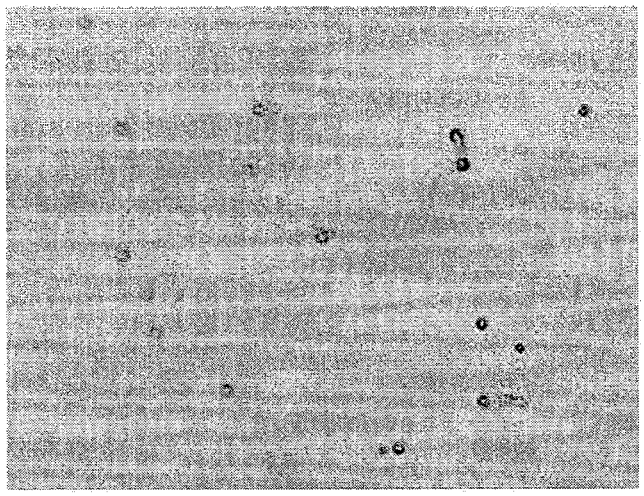
จากการนำสปอร์แขวนลอยของ *A. flavus* 05-21 ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลาย 0.1% Tween 80 ปราศจากเชื้อ (ปรับพีเอชเป็น 6.0 ด้วย 1% กรดอะซิติก) ที่มีไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ (0.25%, 0.5%, 0.75% และ 1.0%) ชุดควบคุมเป็นสารละลาย 0.1% Tween 80 (พีเอชเป็น 6.0) ที่ไม่มีไคโตซานผสมอยู่บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสปอร์แขวนลอยดังกล่าวมาตรวจสอบการรอดชีวิตบนอาหาร AFPA โดยเกลี่ยให้ทั่วจาน ตรวจสอบการงอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 จาน สุ่มตรวจสปอร์จำนวนทั้งหมด 115 ± 5 สปอร์ รายงานเปอร์เซ็นต์สปอร์ที่มีชีวิตรอดหรือสปอร์ที่งอกได้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการรอดชีวิตของสปอร์ *A. flavus* 05-21 ลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานในอาหาร (ดังตารางที่ 4-4 และแสดงการงอกของสปอร์ได้ดังภาพที่ 4-6) โดยที่ระดับความเข้มข้นไคโตซาน 0.25%, 0.5%, 0.75% และ 1.0% เปอร์เซ็นต์สปอร์

A. flavus 05-21 ที่มีชีวิตรอดเท่ากับ 42.90 ± 5.24%, 30.72 ± 5.24%, 14.78 ± 0.87% และ 9.28 ± 3.62% ตามลำดับ

ตารางที่ 4-4 ผลของไคโตซานต่อการรอดชีวิตของสปอร์ *A. flavus* 05-21

ความเข้มข้นไคโตซาน (%)	เปอร์เซ็นต์สปอร์ของ *A. flavus* 05-21 ที่มีชีวิตรอด
ชุดควบคุม	95.65 ± 0.0
0.25	42.90 ± 5.24
0.50	30.72 ± 5.24
0.75	14.78 ± 0.87
1.00	9.28 ± 3.62

หมายเหตุ ตรวจสอบจำนวนสปอร์ที่งอกบนอาหาร AFPA ภายในเวลา 5 ชั่วโมง โดยสุ่มตรวจจำนวนสปอร์ทั้งหมด 115 ± 5 สปอร์



ภาพที่ 4-6 ลักษณะการงอกของสปอร์บนอาหาร AFPA เมื่อเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง กำลังขยาย 10X

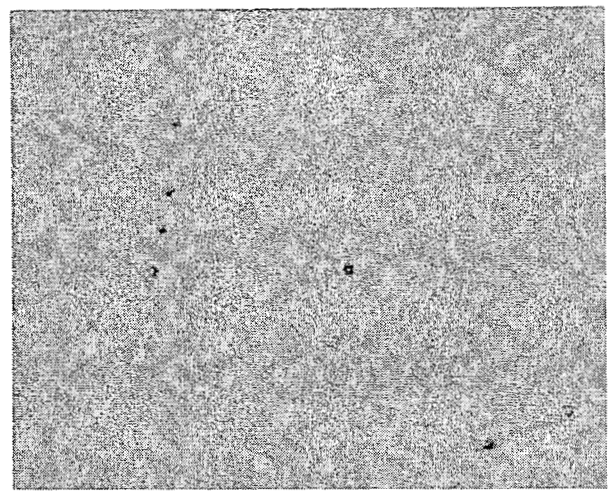
5. ผลของไคโตซานต่อกางอกของสปอร์รา *A. flavus* 05-21

จากการนำสปอร์แขวนลอยของ *A. flavus* 05-21 เกลี่ยลงบนอาหาร AFPA ที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ (0.25%, 0.5%, 0.75% และ 1.0%) โดยมีชุดควบคุมเป็นอาหาร AFPA ที่ไม่เติมไคโตซาน บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบการงอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 จาน สุ่มตรวจสปอร์จำนวนทั้งหมด 115 ± 5 สปอร์ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานในอาหารเปอร์เซ็นต์สปอร์ที่สามารถงอกได้มีจำนวนลดลง (ดังตารางที่ 4-5 และแสดงการงอกของสปอร์ได้ดังภาพที่ 4-7) โดยที่ระดับความเข้มข้นไคโตซาน 0.25%, 0.5%, 0.75% และ 1.0% เปอร์เซ็นต์สปอร์ *A. flavus* 05-21 ที่สามารถงอกได้เท่ากับ 92.46 ± 1.33%, 55.36 ± 6.64%, 48.70 ± 6.27% และ 6.09 ± 2.61% ตามลำดับ

ตารางที่ 4-5 ผลของไคโตซานต่อการงอกของสปอร์ *A. flavus* 05-21

ความเข้มข้นไคโตซาน (%)	เปอร์เซ็นต์สปอร์ *A. flavus* 05-2 ที่สามารถงอกได้
ชุดควบคุม	100.00 ± 0.0
0.25	92.46 ± 1.33
0.25	55.36 ± 6.64
0.25	48.70 ± 6.27
1.00	6.09 ± 2.61

หมายเหตุ ตรวจสอบจำนวนสปอร์ที่งอกบนอาหาร AFPA ที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ภายในเวลา 8 ชั่วโมง โดยสุ่มตรวจจำนวนสปอร์ทั้งหมด 115 ± 5 สปอร์



ภาพที่ 4-7 ลักษณะการงอกของสปอร์บนอาหาร chitosan-AFPA เมื่อเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมง กำลังขยาย 10X

ตอนที่ 3 ประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้ง *B. cereus* ATCC 11778 และ *A. flavus* 05-21 ในน้ำพริกปรุงรส

ก. ประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้ง *B. cereus* ATCC 11778 ในน้ำพริกปรุงรส

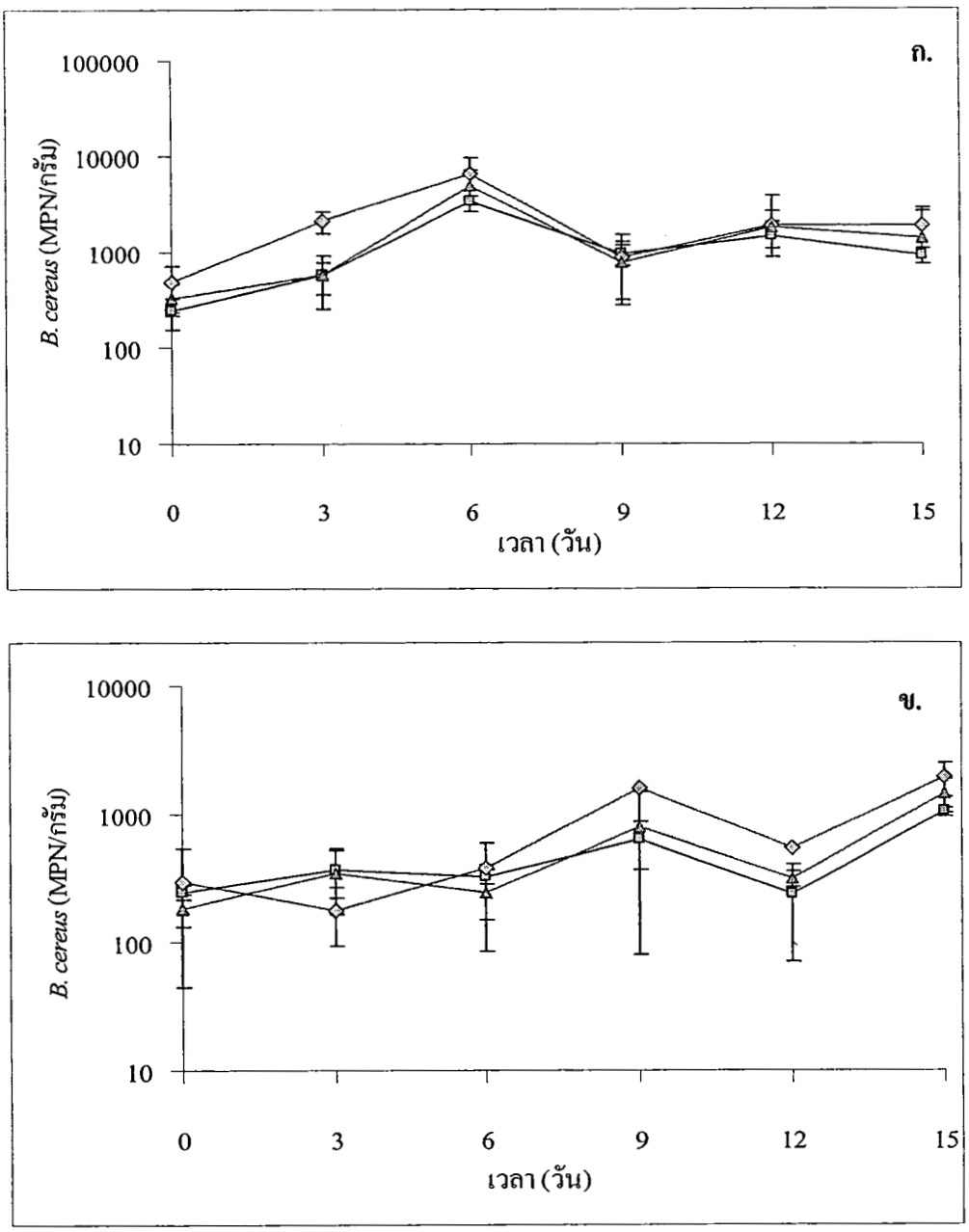
น้ำพริกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นน้ำพริกเผาและน้ำพริกตาแดง เมื่อนำเซลล์ *B. cereus* ATCC11778 เติมลงในน้ำพริกดังกล่าวที่ผสมไคโตซานความเข้มข้น 0.5% และ 1.0% โดยมีชุดควบคุมเป็นน้ำพริกที่ไม่ผสมไคโตซาน สุ่มเก็บตัวอย่างทุก 3 วันเป็นเวลานาน 15 วัน นำมาวิเคราะห์ปริมาณ *B. cereus* ATCC11778 โดยวิธี Most probable number (MPN) ระบบ 5 จานเพาะเชื้อ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าจำนวน *B. cereus* ATCC11778 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาของการที่ *B. cereus* ATCC11778 อยู่ในน้ำพริกเผานานขึ้นจากนั้นมีจำนวนลดลง โดยจากผลที่ตรวจพบในชุดควบคุมพบว่าภายหลังการถ่ายเชื้อลงในน้ำพริกเผา 3-6 วัน ปริมาณของ *B. cereus* ATCC11778 เพิ่มขึ้นจาก $2.4\times10^{2} \pm 8.5$ MPN/กรัม เป็น $3.367\times10^{3} \pm 3.79$ MPN/กรัม และเริ่มลดลงเมื่อวันที่ 9-15 เหลือเพียง $8.93\times10^{2} \pm 1.710^{2}$ MPN/กรัม สำหรับในชุดทดลองซึ่งเป็นน้ำพริกเผาที่เติมไคโตซานความเข้มข้น 0.5% และ 1.0% พบว่าไคโตซานความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญ *B. cereus* ATCC11778 เนื่องจากมีจำนวน *B. cereus* ATCC11778 ที่ใกล้เคียงกับชุดควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 4-8 ก

ส่วนในชุดการทดลองที่ใช้น้ำพริกตาแดงพบว่าจำนวน *B. cereus* ATCC11778 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาของการที่ *B. cereus* ATCC11778 อยู่ในน้ำพริกตาแดงนานขึ้น โดยจากผลที่ตรวจพบในชุดควบคุมพบว่าภายหลังการถ่ายเชื้อลงในน้ำพริกตาแดง 15 วัน ปริมาณของ *B. cereus* ATCC11778 เพิ่มขึ้นจาก $2.46\times10^{2} \pm 3.0\times10^{1}$ MPN/กรัม เป็น $1.05\times10^{3} \pm 8.6\times10^{1}$ MPN/กรัม สำหรับในชุดทดลองซึ่งเป็นน้ำตาแดงที่เติมไคโตซานความเข้มข้น 0.5% และ 1.0% พบว่าไคโตซานความเข้มข้นดังกล่าวมีผลในการเพิ่มจำนวน *B. cereus* ATCC11778 เป็น $1.97\times10^{3} \pm 5.8\times10^{2}$ MPN/กรัม และ$1.45\times10^{3} \pm 4.33\times10^{2}$ MPN/กรัม ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4-8 ข

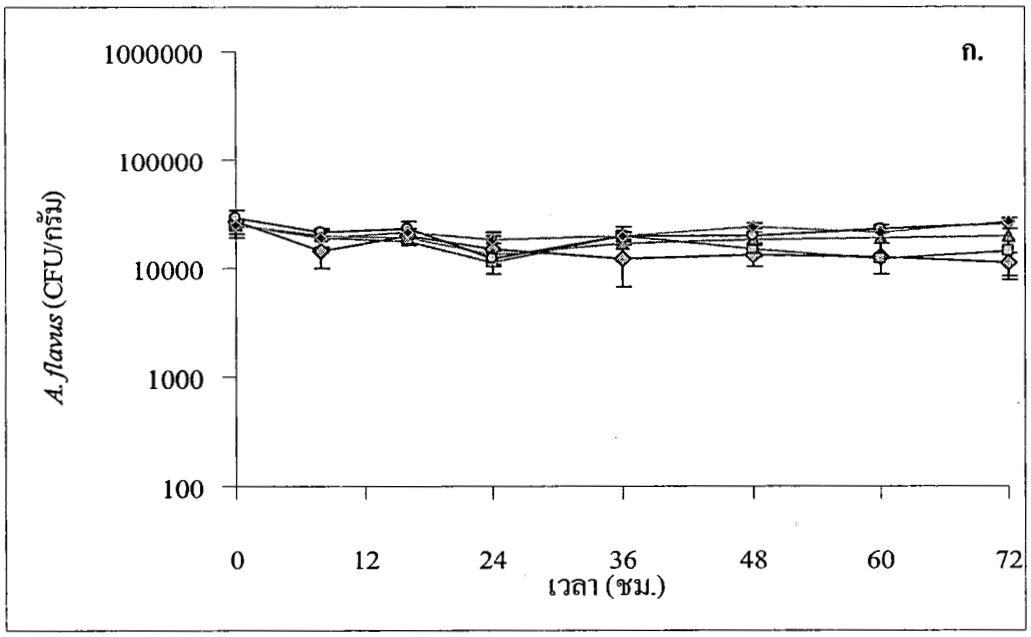
ข. ประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้ง *A. flavus* 05-21 ในน้ำพริกปรุงรส

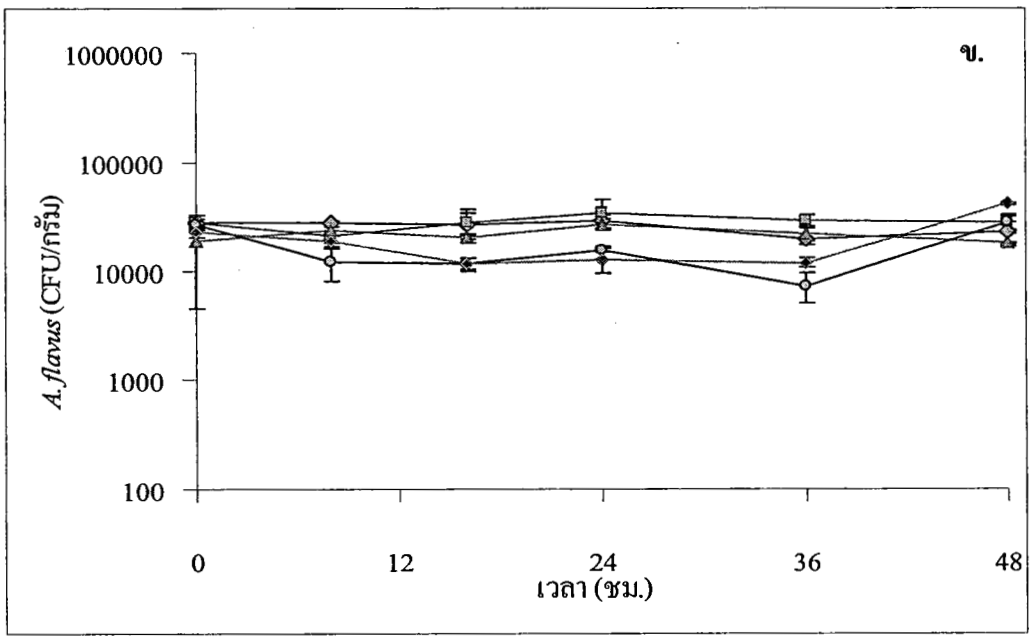
สำหรับการนำสปอร์ *A. flavus* 05-21 เติมลงในน้ำพริกเผาและน้ำพริกตาแดงที่ผสมไคโตซานความเข้มข้น 0.5%, 1.0%, 1.5% และ 2.0% โดยมีชุดควบคุมเป็นน้ำพริกที่ไม่ผสมไคโตซาน สุ่มเก็บตัวอย่างทุก 8-12 ชั่วโมง เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ปริมาณ *A. flavus* 05-21 โดยวิธี dilution spread plate บนอาหาร Potato dextrose agar บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ผลการทดลองจากชุดควบคุมแสดงให้เห็นว่าจำนวนสปอร์ *A. flavus* 05-21 มีแนวโน้มการรอดชีวิตลดลงเล็กน้อยและค่อนข้างคงที่เมื่อระยะเวลาของ *A. flavus* 05-21 อยู่ในน้ำพริกดังกล่าวนานขึ้น โดยจากผลที่ตรวจพบในชุดควบคุมพบว่าภายหลังการถ่ายเชื้อลงในน้ำพริกเผา 72 ชั่วโมง ปริมาณของ *A. flavus* 05-21 ลดลงจาก $2.65\times10^{4} \pm 7.5\times10^{3}$ CFU/กรัม เป็น $1.1\times10^{4} \pm 2.6\times10^{3}$ CFU/กรัม (ภาพที่ 4-9 ก) สำหรับในชุดทดลองซึ่งเป็นน้ำพริกเผาที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.5%, 1.0%, 1.5% และ 2.0% พบว่าไคโตซานความเข้มข้นดังกล่าวมีผลช่วยเพิ่มการรอดชีวิตสปอร์ *A. flavus* 05-21 ในน้ำพริกเผาเป็น $1.45\times10^{4} \pm 6.7\times10^{3}$, $1.95\times10^{4} \pm 3.7\times10^{3}$, $2.60\times10^{4} \pm 2.6\times10^{3}$ และ $2.69\times10^{4} \pm 3.8\times10^{3}$ CFU/กรัม ตามลำดับ และในชั่วโมงที่ 84 พบเส้นใยราและสปอร์ชัดเจนบนน้ำพริกเผาที่ผสมไคโตซาน 2.0%

ผลที่ตรวจปริมาณ *A. flavus* 05-21 ในชุดควบคุมน้ำพริกตาแดงมีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับน้ำพริกเผาคือภายหลังการถ่ายเชื้อลง 48 ชั่วโมง ปริมาณของ *A. flavus* 05-21 ลดลงเล็กน้อย (ภาพที่ 4-9 ข) สำหรับในชุดทดลองซึ่งเป็นน้ำพริกตาแดงที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.5%, 1.0%, 1.5% และ 2.0% พบว่าไคโตซานความเข้มข้นดังกล่าวมีผลช่วยเพิ่มการรอดชีวิตสปอร์ *A. flavus* 05-21 เช่นเดียวกันกับน้ำพริกเผาเป็น $2.8\times10^{4} \pm 4.2\times10^{3}$, $1.78\times10^{4} \pm 1.73\times10^{2}$, $2.75\times10^{4} \pm 5.3\times10^{3}$ และ $4.1\times10^{4} \pm 8.4\times102$ CFU/กรัม ตามลำดับ และในชั่วโมงที่ 60 พบเส้นใยราชัดเจนบนน้ำพริกตาแดงที่ผสมไคโตซาน 1.5% และ 2.0% (ภาพที่ 4.10)

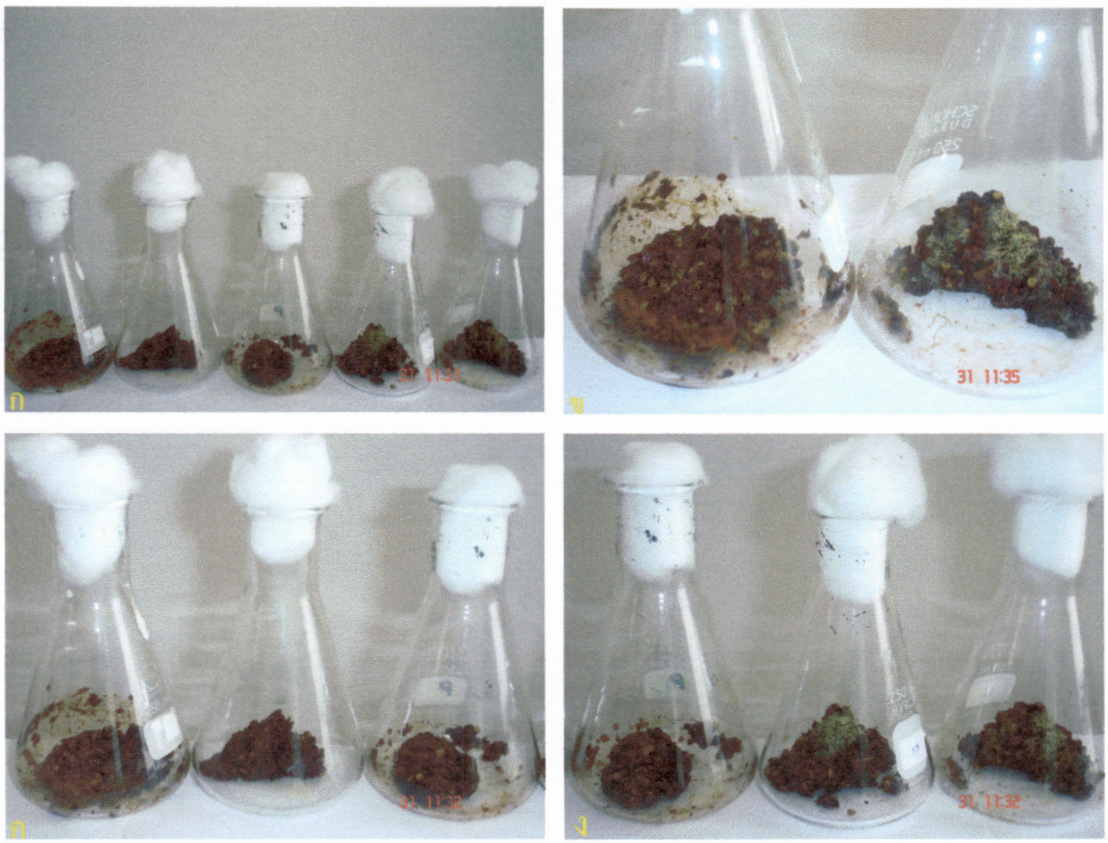


ภาพที่ 4-8 การเปลี่ยนแปลงจำนวน *B. cereus* ATCC11778 (MPN/กรัม) ใน (ก) น้ำพริกเผา และ (ข) น้ำพริกตาแดงที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ ชุดควบคุมเป็นน้ำพริกเผาที่ไม่ผสมไคโตซาน บ่มที่อุณหภูมิห้อง (—□— : ชุดควบคุม, —◇—:ไคโตซาน 0.5%; —△— :ไคโตซาน 1.0%)





ภาพที่ 4-9 จำนวน *A. flavus* 05-21 (CFU/กรัม) ในตัวอย่าง (ก) น้ำพริกเผา และ (ข) น้ำพริกตาแดง ผสมไคโตซานความ เข้มข้นต่าง ๆ ชุดควบคุมเป็นน้ำพริกเผาที่ไม่ผสมไคโตซาน บ่มที่อุณหภูมิห้อง (—◆— : ชุดควบคุม, —■— : ไคโตซาน 0.5%, —▲— :ไคโตซาน 1.0%, —◇— :ไคโตซาน 1.5%, —✦— :ไคโตซาน 2.0%)



ภาพที่ 4-10 เส้นใยราและสปอร์บนน้ำพริกตาแดงที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ (0.5%, 1.0%, 1.5% และ 2.0%)

ก. น้ำพริกตาแดงชุดควบคุม (ไม่ผสมไคโตซาน) และน้ำพริกตามแดงที่ผสมไคโตซาน 0.5%, 1.0%, 1.5%, และ 2.0% ตามลำดับ (เรียงจากซ้ายไปขวา)

ข. น้ำพริกตาแดงชุดควบคุม (ซ้าย) และน้ำพริกตาแดงที่ผสมไคโตซาน 2.0% (ขวา)

ค. น้ำพริกตาแดงชุดควบคุมและน้ำพริกตาแดงที่ผสมไคโตซาน 0%, 0.5% และ 1.0% ตามลำดับ (เรียงจากซ้ายไปขวา)

ง. น้ำพริกแดงที่ผสมไคโตซาน 1.0%, 1.5%, และ 2.0% ตามลำดับ (เรียงจากซ้ายไปขวา)

ตอนที่ 4 ประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในปรุงรส

จากการนำตัวอย่างน้ำพริกเผาและน้ำพริกตาแดงที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ มาตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด จำนวน *Bacillus* spp. ยีสต์และรา ชุดควบคุมเป็นน้ำพริกที่ไม่ผสมไคโตซาน พบว่าในวันที่ 10 ชุดควบคุมน้ำพริกเผามีการเจริญแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นประมาณ 0.6 log MPN/กรัม คือจากเริ่มต้น $2.5\times10^4\pm1.1\times10^4$ MPN/กรัม เพิ่มเป็น $9.6\times10^4\pm6.2\times10^4$ MPN/กรัม สำหรับในชุดการทดลองซึ่งเป็นน้ำพริกเผาที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.25%, 0.5%, 1.0% และ 2.0% พบว่าไคโตซานความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียในน้ำพริกเผา กลับพบการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดมากกว่าชุดควบคุม ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่ม 0.5 - 1.5 log MPN/กรัม คือจากแบคทีเรียทั้งหมดเริ่มต้น $4.3\times10^4 \pm 3.2\times10^4$ - $6.7\times10^4 \pm 7.0\times10^2$ MPN/กรัม เพิ่มเป็น $1.9\times10^5 \pm 1.3\times10^5$ - $1.7\times10^6 \pm 0.0$ MPN/กรัม (ตารางที่ 4-6) แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบในน้ำพริกเผา ได้แก่ *Bacillus* spp. และ *Streptococcus* sp.

ตารางที่ 4-6 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (MPN/กรัม) ในตัวอย่างน้ำพริกเผาที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นไคโตซาน (%)	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำพริกเผา (MPN/กรัม)		
	เริ่มต้น	วันที่ 5	วันที่ 10
ชุดควบคุม	25016.5 ± 11761.3	94000.0 ± 2828.4	96000.0 ± 62225.4
0.25	66700.0 ± 0.0	138500.0 ± 101116.3	430000.0 ± 0.0
0.50	67200.0 ± 707.1	175000.0 ± 91923.9	193000.0 ± 137178.7
1.00	43850.0 ± 32314.8	310000.0 ± 296984.8	430000.0 ± 0.0
2.00	50166.5 ± 23806.2	360000.0 ± 113137.1	1700000.0 ± 0.0

หมายเหตุ ชุดควบคุมเป็นน้ำพริกเผาที่ไม่ผสมไคโตซาน

เช่นเดียวกันกับการตรวจสอบจำนวน *Bacillus* spp. พบว่าน้ำพริกเผาที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นดังกล่าวมีปริมาณ *Bacillus* spp. มากกว่าชุดควบคุม โดยจากผลที่ตรวจพบในชุดควบคุมพบจำนวน *Bacillus* spp. เริ่มต้น $7.0\times10^{2} \pm 1.94\times10^{5}$ MPN/กรัม เพิ่มขึ้นเป็น $1.94\times10^{4} \pm 1.7\times10^{4}$ MPN/กรัม สำหรับน้ำพริกเผาที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นดังกล่าวมีปริมาณ *Bacillus* spp. เพิ่มจาก $3.3\times10^{2} \pm 0.0$ - $9.75\times10^{2} \pm 3.5\times10^{1}$ MPN/กรัม เป็น $2.55\times10^{3} \pm 2.0\times10^{3}$ – $7.75\times10^{4} \pm 7.4\times10^{4}$ MPN/กรัม (ตารางที่ 4-7)

ตารางที่ 4-7 จำนวน *Bacillus* spp. ในตัวอย่างน้ำพริกเผาที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นไคโตซาน (%)	จำนวน *Bacillus* spp.ในน้ำพริกเผา (MPN/กรัม)		
	เริ่มต้น	วันที่ 5	วันที่ 10
ชุดควบคุม	700.0 ± 0.0	945.0 ± 21.2	19400.0 ± 17819.1
0.25	975.0 ± 35.4	3600.0 ± 3394.1	77500.0 ± 74246.2
0.50	725.0 ± 35.4	2400.0 ± 1838.5	2550.0 ± 2050.6
1.00	700.0 ± 0.0	1100.0 ± 989.9	11300.0 ± 8061.0
1.00	633.5 ± 47.4	1550.0 ± 636.4	20750.0 ± 20152.5

หมายเหตุ ชุดควบคุมเป็นน้ำพริกเผาที่ไม่ผสมไคโตซาน

ส่วนการหาจำนวนยีสต์และรา พบว่ามีการปนเปื้อนจุลินทรีย์จึงไม่สามารถนับจำนวนยีสต์และราได้ และยังพบอีกว่าในวันที่ 15 ของการทดลองน้ำพริกเผามีการเจริญของเส้นใยราเห็นได้อย่างชัดเจน

ในขณะเดียวกันเมื่อนำตัวอย่างน้ำพริกตาแดงที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ มาหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* spp. ยีสต์และรา ชุดควบคุมเป็นน้ำพริกที่ไม่ผสมไคโตซาน ผลการทดลองแสดง ให้เห็นว่าเมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน ชุดควบคุมน้ำพริกตาแดงมีแนวโน้มการเพิ่มปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเช่นเดียวกับน้ำพริกเผาประมาณ 0.7 log MPN/กรัม คือจากเริ่มต้น $5.8\times10^{3}\pm 2.7\times10^{3}$ MPN/กรัม เพิ่มเป็น $3.0\times10^{4}\pm 2.4\times10^{4}$ MPN/กรัม สำหรับในชุดการทดลองซึ่งเป็นน้ำพริกตาแดงที่ผสมไคโคซานความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.25%, 0.5%, 1.0% และ 2.0% พบว่าไคโตซานความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียในน้ำพริกตาแดง กลับพบการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดมากกว่าชุดควบคุม มีการเจริญแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่ม 0.4-1.6 log MPN/กรัม คือจากแบคทีเรียทั้งหมดเริ่มต้น $3.7\times10^{3}\pm 2.1\times10^{2}$ – $8.9\times10^{3}\pm 7.1\times10^{3}$ MPN/กรัม เพิ่มเป็น $1.7\times10^{4}\pm 1.4\times10^{4}$ – $1.6\times10^{5}\pm 0.0$ MPN/กรัม (ตารางที่ 4-8) แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบในน้ำพริกตาแดง ได้แก่ *Bacillus* spp. และ *Streptococcus* sp.

ตารางที่ 4-8 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (MPN/กรัม) ในตัวอย่างน้ำพริกตาแดงที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นไคโตซาน (%)	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำพริกตาแดง (MPN/กรัม)	
	เริ่มต้น	วันที่ 5
ชุดควบคุม	5850.0 ± 2757.7	30500.0 ± 24748.7
0.25	6800.0 ± 5939.7	17900.0 ± 14283.6
0.25	8950.0 ± 7141.8	117500.0 ± 31819.8
1.00	6800.0 ± 5939.7	35500.0 ± 17677.7
1.00	3750.0 ± 212.1	160000.0 ± 0.0

หมายเหตุ ชุดควบคุมเป็นน้ำพริกตาแดงที่ไม่ผสมไคโตซาน

เช่นเดียวกันกับการหาจำนวน *Bacillus* spp. พบว่าน้ำพริกตาแดงที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.25%, 0.5%, 1.0% และ 2.0% มีปริมาณ *Bacillus* spp. มากกว่าชุดควบคุม โดยจากผลที่ตรวจพบในชุดควบคุมพบจำนวน *Bacillus* spp. เริ่มต้น $1.3 \times 10^2 \pm 1.2 \times 10^2$ MPN/กรัม เพิ่มขึ้นเป็น $1.0 \times 10^3 \pm 8.8 \times 10^2$ MPN/กรัม สำหรับน้ำพริกตาแดงที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นดังกล่าว เพิ่มจาก $7.1 \times 10 \pm 1.4 \times 10 - 2.7 \times 10^2 \pm 1.2 \times 10^2$ MPN/กรัม เป็น $1.6 \times 10^3 \pm 1.4 \times 10^3 - 1.6 \times 10^4 \pm 0.0^2$ MPN/กรัม (ตารางที่ 4-9)

ตารางที่ 4-9 จำนวน *Bacillus* spp. (MPN/กรัม) ในตัวอย่างน้ำพริกตาแดงที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นไคโตซาน (%)	จำนวน *Bacillus* spp. ในน้ำพริกตาแดง (MPN/กรัม)	
	เริ่มต้น	120 ชม.
ชุดควบคุม	132.5 ± 123.7	1075.0 ± 883.9
0.25	220.5 ± 197.3	1700.0 ± 0.00
0.25	270.0 ± 127.3	1605.0 ± 1407.1
1.0	87.5 ± 60.1	16000.0 ± 0.0
1.0	71.0 ± 14.1	16000.0 ± 0.0

หมายเหตุ ชุดควบคุมเป็นน้ำพริกตาแดงที่ไม่ผสมไคโตซาน

จากการหาจำนวนยีสต์และราในน้ำพริกตาแดง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณยีสต์และราเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน โดยจากผลที่ตรวจพบในชุดควบคุมพบว่าปริมาณยีสต์และราเริ่มต้นจาก $2.1 \times 10^3 \pm 1.6 \times 10^3$ CFU /กรัม เพิ่มขึ้นเป็น $8.8 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5$ CFU /กรัม สำหรับน้ำพริกตาแดงที่ผสมไคโตซานความเข้มข้น 0.25%, 0.5% และ 2.0% เพิ่มจาก $1.3 \times 10^3 \pm 1.8 \times 10^4 - 1.8 \times 10^3 \pm 1.6 \times 10^3$ CFU /กรัม เป็น $4.6 \times 10^3 \pm 2.8 \times 10^3 - 8.8 \times 10^5 \pm 1.4 \times 10^5$ CFU /กรัม สำหรับไคโตซานความเข้มข้น 1.0% กลับพบว่ามีจำนวนยีสต์และราลดลงจาก $1.8 \times 10^3 \pm 1.6 \times 10^3$ CFU /กรัม เป็น $3.3 \times 10^2 \pm 4.7 \times 10^2$ และ CFU/กรัม (ตารางที่ 4-10) ราที่พบส่วนใหญ่ ได้แก่ *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. และในวันที่ 10 พบว่าน้ำพริกตาแดงมีการเจริญของเส้นใยราเห็นได้อย่างชัดเจน

ตารางที่ 4-10 จำนวน ยีสต์และรา (CFU /กรัม) ในตัวอย่างน้ำพริกตาแดงที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นไคโตซาน (%)	จำนวนยีสต์และราในน้ำพริกตาแดง (MPN/กรัม)	
	เริ่มต้น	120 ชม.
ชุดควบคุม	2166.5 ± 1649.7	883500.0 ± 118086.8
0.25	1835 ± 1647.6	111500.0 ± 26163.0
0.25	1500.0 ± 1173.8	885000.0 ± 143783.1
1.0	1835.0 ± 1647.6	335.0 ± 473.8
1.0	1335.0 ± 1888.0	4685.0 ± 2849.6

บทที่ 5

สรุป และอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการยับยั้ง *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Aspergillus flavus* 05-21 พบว่าไคโตซานสามารถยับยั้งการพัฒนาของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 เมื่อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยไคโตซานความเข้มข้น 0.05% และ 0.1% สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 82.26% และ 96.13% ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานเป็น 0.25-0.5% สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *B. cereus* ATCC 11778 ได้อย่างสมบูรณ์ และจากการทดสอบการรอดชีวิตของสปอร์ในน้ำเกลือ (0.85%) ที่ผสมไคโตซาน 0.25%, 0.5%, 0.75% และ 1.0% โดยบ่มเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าไคโตซานความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการเจริญของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 แต่ในทางตรงกันข้ามในการทดสอบประสิทธิภาพของไคโตซานต่อการรอดชีวิตของเซลล์ *B. cereus* ATCC11778 ในน้ำเกลือ (0.85%) พบว่าไคโตซานความเข้มข้นดังกล่าว รวมทั้งที่ระดับความเข้มข้นที่ต่ำจนถึง 0.01% สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ *B. cereus* ATCC11778 ได้ทันทีภายหลังที่มีการใส่เซลล์ลงไปทดสอบ โดยพบว่ามีเซลล์ถูกยับยั้งได้ประมาณ 80.60±4.50-99.89±0.00% หลังจากนั้นตรวจพบว่ามีปริมาณเซลล์ถูกยับยั้งเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยจนกระทั่งถึง 48 ชั่วโมงของการทดสอบ โดยมีปริมาณเซลล์ที่ถูกยับยั้งโดยรวมทั้งหมด 96.51±0.00-99.98±0.00%

ในขณะเดียวกันเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* 05-21 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ coconut agar และอาหารเลี้ยงเชื้อ AFPA ที่มีการเติมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าไคโตซานความเข้มข้น 0.25% สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้ 9.09±0.00% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานสูงขึ้นจนถึง 1.0% พบว่าการเจริญของเส้นใยราถูกยับยั้งได้ 75.00±0.00% ในขณะเดียวกันความสามารถในการสร้างอะฟลาทอกซินของราสายพันธุ์นี้ลดลงจากระดับ (+4) เป็น (+2) เมื่อในอาหารมีไคโตซานผสมอยู่ 0.25% และไม่พบการสร้างอะฟลาทอกซินเมื่ออาหารทดสอบมีไคโตซานอยู่ในความเข้มข้นที่มากขึ้น (0.5-1.0%) นอกจากนี้ยังพบว่าไคโตซานมีผลต่อการรอดชีวิตของสปอร์รา *A. flavus* 05-21 โดยเมื่อสปอร์ราได้สัมผัสกับไคโตซานความเข้มข้นที่สูงขึ้นจนถึง 1.0%

เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของสปอร์ลดลงเหลือเพียง 9.28±3.62% อีกทั้งยังพบว่าไคโตซานความเข้มข้นดังกล่าวยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. flavus* 05-21 ได้มากกว่า 90%

อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบความสามารถของไคโตซานในการยับยั้ง *B. cereus* ATCC 11778 และ *A. flavus* 05-21 ที่เติมลงในน้ำพริกปรุงรส 2 ชนิด คือ น้ำพริกเผาและน้ำพริกตาแดง พบว่าการเติมไคโตซานไม่มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้ได้ นอกจากนี้ไคโตซานยังไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั่วไป *Bacillus* spp. ยีสต์และราที่ปนเปื้อนในน้ำพริกปรุงรสดังกล่าวได้

อภิปรายผลการทดลอง

ตอนที่ 1 ประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้ง *Bacillus cereus* ATCC 11778 ในหลอดทดลอง

B. cereus เป็นแบคทีเรียสร้างสปอร์สามารถต้านทานสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี จึงพบการปนเปื้อนแบคทีเรียชนิดนี้ทั้งในรูปสปอร์และเซลล์ปกติได้ในอาหารประเภท ผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์ ซอส ข้าว แป้ง ธัญพืช หรือแม้กระทั่งเครื่องเทศแห้ง สปอร์ของ *B. cereus* ที่ปนเปื้อนในอาหารจะงอกและพัฒนาเป็นเซลล์ปกติเมื่อถูกกระตุ้นด้วยความร้อน หรือสารที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเมแทบอลิซึม เช่นกลูโคส กรดแลกติก และอะดีนีน เป็นต้น ซึ่งเซลล์ปกติของ *B. cereus* บางสายพันธุ์สร้างเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษหรือกระเพาะและลำไส้อักเสบ (Concon, 1988) ประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษของแบคทีเรียพบว่ามีการศึกษากันอย่างกว้างขวางทั้งในแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกเช่น *S. aureus* (Xie *et al.*, 2002) *Micrococcus variansz* (Darmadji & Izumimoto, 1994) *Pseudomonas fluorescens* (No *et al,* 2002) และแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ เช่น *Shigella dysenteriae, Aeromonas hydrophila, Salmonella typhimurium* (Chen *et al.*, 1998) *Vibrio parahaemolyticus* (No *et al,* 2002) *E. coli* ATCC27854 และ *Salmonella* group B_1 (วิสาตรี คงเจริญสุนทร และจิราภรณ์ แก่นภักดี, 2545) อย่างไรก็ตามการศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งแบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีค่อนข้างน้อย (Darmadji and Izumimoto, 1994; No *et al.*, 2002) โดยเฉพาะ *B. cereus* (No *et al.*, 2002) ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ทั้งที่อยู่ในรูปของเซลล์และสปอร์ โดยสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาได้แก่ *B. cereus* ATCC11778 ซึ่งมีคุณสมบัติในการสร้างเอนเทอโรทอกซินได้

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 พบว่าไคโตซานสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของไคโตซานที่ใช้ กล่าวคือไคโตซานความเข้มข้น 0.05-0.1%

สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 82.26-96.13% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.25-0.5% พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้อย่างสมบูรณ์ (100%) อย่างไรก็ตามพบว่าสปอร์ที่ไม่สามารถพัฒนาเป็นเซลล์ปกติบนอาหาร TSA ที่ผสมไคโตซานอยู่นั้น สปอร์ดังกล่าวยังคงมีชีวิตเนื่องจากเมื่อขูดบนผิวหน้าอาหารดังกล่าว นำมาเกลี่ยลงในอาหาร TSA ที่ไม่มีไคโตซานผสมอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง พบการเจริญของ *B. cereus* ATCC11778 (ไม่ได้แสดงผล)

การที่ไคโตซานสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 ได้อาจเกิดจากอาหาร TSA ที่ผสมไคโตซานนั้นเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสม (เกิดสภาวะเครียด) ต่อการงอกของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 หรือเกิดจากไคโตซานมีคุณสมบัติเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (chelating agent) สามารถจับกับสารอาหารที่จำเป็นต่อการงอกของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 ทำให้ไม่สามารถนำสารอาหารเหล่านี้มาใช้ได้ตามปกติ ตามรายงานการศึกษาของ Roller&Covill (1999) ซึ่งได้อธิบายกลไกของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของรา *Mucor racemosus* ว่าเกิดขึ้นเนื่องจากไคโตซานสามารถจับกับอิออนของโลหะและธาตุอาหารรอง (trace elements) หรือสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของรา เช่น Ca^{2+} ทำให้ *M. racemosus* ไม่สามารถนำสารอาหารเหล่านี้มาใช้ได้ตามปกติจึงทำให้อัตราการเจริญของ *M. racemosus* ลดลง

ผลที่ได้จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้นสอดคล้องกับการทดสอบประสิทธิภาพของไคโตซานต่อการรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 ในน้ำเกลือ (0.85%) ที่ผสมไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.25%, 0.5%, 0.75% และ 1.0% พบว่าไคโตซานไม่มีผลต่อการมีชีวิต (viability) ของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 กล่าวคือไคโตซานไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายสปอร์ได้เนื่องจากเมื่อนำสปอร์มาเพาะเลี้ยงใหม่อีกครั้ง (recovery) ในอาหาร TSB สปอร์ดังกล่าวสามารถพัฒนาเป็นเซลล์ปกติได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมซึ่งไม่ผสมไคโตซาน การที่ไคโตซานไม่สามารถยับยั้งหรือทำลายการเจริญสปอร์ได้นั้นอาจเกิดจากสปอร์ของ *B. cereus* ATCC11778 มีโครงสร้างที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี โดยประกอบด้วยชั้นนอกสุดที่เรียกว่า เอกโซสปอเรียม (exosporium) ซึ่งไม่ยอมให้สารต่าง ๆ ผ่านเข้าออกได้โดยง่าย ชั้นสปอร์โคท (spore coat) เป็นชั้นที่มีความทนทานสูง มีความหนาและเหนียว อาจมีชั้นเดียวหรือหลายชั้น แต่ที่เห็นชัดเจนมี 2 ชั้น คือ ชั้นใน (inner coat) ที่มีลักษณะบางกว่าล้อมรอบคอร์เทกซ์ และชั้นนอก (outer coat) ที่มีความหนามากที่สุด ผนังชั้นนี้จะป้องกันการถูกย่อยด้วยไลติกเอนไซม์ เพราะประกอบด้วยสารคล้ายเคราติน (keratin-like protein) และมีซีสทีน (cystene) มากด้วยจึงเกิดพันธะไดซัลไฟด์เชื่อมระหว่างพอลิเพปไทด์ ทำให้สปอร์ทนต่อการซึมผ่านของสารได้ดี ชั้นสปอร์คอร์เทกซ์ (spore cortex) เป็นชั้นที่มีปริมาตรมากที่สุด (มีปริมาตรประมาณครึ่งหนึ่งของสปอร์ทั้งหมด)

และหนาที่สุด ชั้นนี้ทนทานต่อความร้อนได้ดีที่สุดเนื่องจากประกอบด้วยเกลือแคลเซียมของกรดไดพิโคลินิก (dipicolinic acid) ชั้นผนังสปอร์ (spore wall) และชั้นสปอร์บอดี (spore body) (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544)

ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าไคโตซานสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ แต่ไม่สามารถฆ่าหรือทำลายสปอร์ของ *B. cereus* ATCC11778 ได้ ในทางตรงกันข้ามการทดสอบประสิทธิภาพของไคโตซานต่อการรอดชีวิตของเซลล์ *B. cereus* ATCC11778 ในน้ำเกลือ (0.85%) กลับพบว่าไคโตซานความเข้มข้นที่ทดสอบ (0.01 - 1.0%) สามารถทำลายเซลล์ *B. cereus* ATCC11778 ได้ทันทีภายหลังที่มีการใส่เซลล์ลงไปทดสอบ โดยที่เวลาเริ่มต้นพบว่าเซลล์มีการรอดชีวิตเพียง 014±0.00-20.65±7.69% (เวลาเริ่มต้นในที่นี้หมายถึงระยะเวลานับจากใส่หัวเชื้อทดสอบและเตรียมเซลล์เพื่อการนับจำนวน ซึ่งใช้เวลารวมทั้งหมดประมาณ 15-20 นาที ซึ่งช่วงเวลาดังกล่าวนี้อาจเป็นระยะเวลานานพอที่ไคโตซานจะเข้าทำปฏิกิริยากับเซลล์ ทำให้ปรากฏผลการยับยั้งเซลล์เกิดขึ้น ณ เวลาเริ่มต้นนี้) หลังจากนั้นจนถึงที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการรอดชีวิตของเซลล์ลดอีกเล็กน้อยและค่อนข้างคงที่ซึ่งอยู่ในช่วง 0.02±0.00-3.49±0.00 โดยที่ผลของไคโตซานระดับความเข้มข้น 0.1-1.0% ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ *B. cereus* ATCC11778 นั้นไม่มีความแตกต่างกันมากนัก จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไคโตซานในความเข้มข้นที่ทดสอบนี้สามารถลดจำนวนเซลล์ของ *B. cereus* ATCC11778 ลงได้ประมาณ 3-4 log cycles ผลการทดลองดังกล่าวนี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ No *et al.* (2002) ที่พบว่าไคโตซานความเข้มข้น 0.1% สามารถยับยั้ง *B. megaterium* และ *B. cereus* ได้ 3 - 4 log cycles เมื่อทดสอบใน Mucler Hinton broth (pH 5.9) และ Simpson *et al.* (1997) พบว่าไคโตซานเข้มข้น 0.02% สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ได้อย่างสมบูรณ์ในกุ้งสด

กลไกในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ของไคโตซานเท่าที่มีการศึกษาและตั้งสมมติฐานไว้ คืออาจเกิดจากไคโตซานทำให้ผนังเซลล์เสียหาย และเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพเลือกผ่านของเซลล์ (cell permeability) ไคโตซานมีประสิทธิภาพในการทำลายการจัดระเบียบโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลให้หน้าที่ปกติของเยื่อหุ้มเซลล์เสียไปจุลินทรีย์จึงถูกทำลายในที่สุด โดย Choi *et al.* (2001) และ Qin *et al.* (2006) รายงานว่าไคโตซานสามารถเกิดเป็นสารประกอบพอลิอิเลคโตรไลต์ที่ซับซ้อนบริเวณผิวหน้าของผนังเซลล์จุลินทรีย์โดยก่อตัวเป็นชั้นบาง ๆ รอบเซลล์ ซึ่งเป็นการขัดขวางการส่งผ่านสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์เข้าสู่เซลล์ ทำให้คุณสมบัติการเลือกผ่านของเซลล์สูญเสียไป นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพอลิเมอร์ประจุบวกของไคโตซาน (หมู่ NH_3^+ ของหน่วยย่อยกลูโคซามีน) ที่ pH ต่ำกว่า 6.3 สามารถเกิดปฏิกิริยากับประจุลบของผนังเซลล์จุลินทรีย์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์ ส่งผลให้ผนังเซลล์เกิด

ความเสียหายเกินกว่าที่จะซ่อมแซมได้ ทำให้เกิดการรั่วของสารสำคัญต่าง ๆ ออกจากเซลล์ (Roller & Covill, 1999, Helander *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004) Darmadji & Izumimoto (1994) รายงานว่าไคโตซานสามารถเข้าไปรบกวนระบบและกลไกการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์จุลินทรีย์ให้ผิดปกติไป นอกจากนี้ไคโตซานอาจมีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีน ซึ่งจากรายงานของ Kurakake, *et al.* (2000) กล่าวว่า *B. cereus* สามารถสร้างเอนไซม์ไคโตซาเนสได้ ซึ่งเอนไซม์ไคโตซาเนสจะย่อยไคโตซานให้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลงหรือเป็นโอลิโกเมอร์ (สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2544) ทำให้สามารถแพร่ผ่านเข้าไปภายในเซลล์ของ *B. cereus* และจับกับกรดนิวคลีอิกทำให้เกิดการยับยั้งหรือขัดขวางการทำงานของ mRNA เซลล์ *B. cereus* จึงตายในที่สุด อย่างไรก็ตามกลไกดังกล่าวไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับการศึกษาในครั้งนี้ เนื่องจาก *B. cereus* ต้องการสารเหนี่ยวนำในการสร้างเอนไซม์ไคโตซาเนส (Kurakake *et al.*, 2000) แต่จากการทดลองได้เตรียมหัวเชื้อบนอาหาร NA และทดสอบประสิทธิภาพไคโตซานในน้ำเกลือ (0.85%) ดังนั้น *B. cereus* จึงไม่น่าที่จะสามารถสร้างเอนไซม์ดังกล่าวได้

ตอนที่ 2 ประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของ *Aspergillus flavus* 05-21 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

Aspergillus flavus 05-21 เป็นราสายพันธุ์ที่สร้างอะฟลาทอกซินได้สูง คัดแยกมาจากเมล็ดถั่วลิสง (อุษณีย์ กลิ่นนาค, 2549) ลักษณะของราชนิดนี้เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เส้นใยมีสีขาว สปอร์มีสีเขียวอมเหลือง เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ AFPA (*Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar) เส้นใยเจริญอัดกันแน่น โคโลนีมีรอยแยกเป็นแฉก สร้างสปอร์ได้น้อยมาก พบการสร้างสเครอโรเทียมสีน้ำตาลและพบลักษณะเฉพาะของราชนิดนี้คืออาหารบริเวณด้านล่างโคโลนีมีสีเหลืองส้ม ซึ่งถือเป็นลักษณะเฉพาะที่แตกต่างจากการเจริญของราชนิดอื่น ๆ ทั้งนี้เนื่องจากในอาหารชนิดนี้มีส่วนประกอบที่สำคัญ คือ ferric citrate และ yeast extract ซึ่ง ferric citrate จะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเม็ดสี (pigment) สีเหลืองส้มได้ (Pitt *et al.*, 1983)

ในการศึกษาผลของไคโตซานต่อการเจริญและการสร้างสารอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* โดยเพาะเลี้ยง *A. flavus* 05-21 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ coconut agar ที่มีไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ (0.25-1.0%) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานเพิ่มขึ้น การเรืองแสงรอบโคโลนีและการเจริญของ *A. flavus* 05-21 ลดน้อยลง โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* สายพันธุ์นี้เพิ่มขึ้นเมื่อสารละลายไคโตซานมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Cuero *et al.* (1991) ที่ระบุว่าความสามารถในการสร้างสารอะฟลาทอกซินบนถั่วโดย *A. flavus* ลดลง เมื่อความเข้มข้นของไคโตซานเพิ่มขึ้น รวมทั้งยังมีรายงานของวรเนตร หอมแก่นจันทร์ (2547) ซึ่งรายงานว่า

ไคโตซานความเข้มข้น 0.3-1.0% สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *A. flavus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ได้แต่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งค่อนข้างต่ำ กล่าวคือ 7.5±0.2-14.5±0.2% และในการศึกษาดังกล่าวนี้ยังพบว่าไคโตซานความเข้มข้น 0.1-1.0% สามารถยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าไคโตซานสามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษในราชนิดอื่น ๆ ด้วย ดังเช่นรายงานของ Bhaskara *et al.* (1998) ที่ระบุว่าไคโตซานมีผลต่อการเจริญและการสร้างสารพิษของ *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานมากขึ้น การเจริญและการสร้างสารพิษของราชนิดนี้มีน้อยลง การยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษของราโดยไคโตซานอาจเนื่องมาจากไคโตซานเข้าไปทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบที่จำเป็นต่อการเจริญและการสร้างสารพิษของรา ทั้งนี้เนื่องจากไคโตซานเข้าไปจับกับ Cu, Zn และ Mn (Muzzarelli *et al.*, 1980) ซึ่งธาตุเหล่านี้มีความจำเป็นต่อการเจริญและการสร้างสารพิษโดยราดังกล่าว (Cuero *et al.*, 1991)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยราโดยไคโตซานต่ำกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานอื่น ๆ เช่นจากรายงานการศึกษาของประไพภรณ์ (2545) พบว่าเมื่อใช้ไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.1-0.5% สามารถยับยั้งการเจริญของ *Phytophthora parasitica* ได้ 83.75-100% เหตุผลประการหนึ่งที่นำมาอธิบายได้ คือ *P. parasitica* นั้นเป็นราชั้นต่ำ (Zycomycota) ที่มีลักษณะโครงสร้างของเส้นใยเป็นแบบไม่มีผนังกั้น ทำให้หากเกิดการทำลายบริเวณใดบริเวณหนึ่งบนเยื่อหุ้มเซลล์ ก็จะทำให้เกิดการรั่วไหลของไซโตพลาสซึมออกจากเส้นใยราจนหมดได้ สำหรับ *A. flavus* จัดเป็นราชั้นสูงเส้นใยมีนิวเคลียสหลายอันและมีผนังกั้นเส้นใย หากเกิดการทำลายเส้นใยไปบางส่วน ก็ยังมีเส้นใยส่วนอื่นที่ยังคงมีความสมบูรณ์อยู่ซึ่งทำให้ราชนิดนี้ก็ยังสามารถเจริญต่อไปได้ นอกจากนี้ยังอาจเกี่ยวข้องกับกลไกภายในเซลล์ ซึ่งทำให้ราแต่ละชนิดมีความต้านทานต่อไคโตซานได้แตกต่างกัน รวมถึงไคโตซานมีกลไกในการยับยั้งราแต่ละชนิดได้ต่างกันจึงส่งผลให้ไคโตซานสามารถยับยั้งการเจริญของราแต่ละชนิดได้ต่างกัน

จากรายงานการศึกษาพบว่าโดยทั่วไปการยับยั้งการเจริญของราโดยไคโตซานเกิดขึ้นได้จากหลายกลไก โดยคาดว่ากลไกหลักจะเกี่ยวข้องกับการเข้าไปรบกวนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น โมเลกุลของไคโตซานเข้าไปจับบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์รา ทำให้เกิดเป็นช่องและเกิดการรั่วไหลของซัยโตพลาสซึมออกจากเซลล์ของราหรือไคโตซานที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้บริเวณดังกล่าวมีคุณสมบัติในการยอมให้สารต่าง ๆ ผ่านเข้าออกได้อย่างสะดวก ทำให้โปรตีนและสารสำคัญต่าง ๆ ไหลออกจากเซลล์ ดังมีรายงานใน *A. alternata* f. sp. *lycopersici* (Bhaskara *et al.*, 1998)

จากรายงานการศึกษาของ Bhaskara *et al.* (1998) พบว่านอกจากไคโตซานจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษของราแล้วยังมีผลต่อการสร้างสปอร์ของราอีกด้วย โดยที่ระดับ

ความเข้มข้นของไคโตซานที่รายังสามารถเจริญได้มีผลทำให้มีการสร้างสปอร์ของราเพิ่มขึ้น เนื่องจากเมื่อราได้สัมผัสกับไคโตซานจะเกิดความเครียด ทำให้มีการสร้างสปอร์ออกมาเป็นจำนวนมาก ลักษณะดังกล่าวพบโดยทั่วไปเมื่อราอยู่ภายใต้สภาวะเครียดต่าง ๆ เช่น การสัมผัสกับสารยับยั้งรา (antifungal agents) และสภาวะที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามสปอร์ดังกล่าวมีความสามารถในการงอกต่ำกว่าปกติ และเมื่อความเข้มข้นของไคโตซานเพิ่มขึ้นก็จะพบการสร้างสปอร์ของราลดลง ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อตรวจสอบการสร้างสปอร์ของ *A. flavus* 05-21 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ coconut agar ที่มีไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ (0.25-1.0%) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของไคโตซานเพิ่มขึ้นการสร้างสปอร์ของ *A. flavus* 05-21 มีปริมาณลดน้อยลง การยับยั้งการสร้างสปอร์พบได้ชัดเจนที่ความเข้มข้นของไคโตซาน 0.75-1.0% (ไม่ได้แสดงผล) ลักษณะการสร้างสปอร์ของ *A. flavus* 05-21 ที่ลดลงและสภาวะที่สปอร์สัมผัสกับไคโตซานส่งผลต่อการงอกของสปอร์รา ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานต่อการงอกของสปอร์รา โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานเพิ่มขึ้นเปอร์เซ็นต์สปอร์ที่สามารถงอกได้ของ *A. flavus* มีค่าลดลง ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเปอร์เซ็นต์สปอร์ที่สามารถงอกได้ลดลงเหลือเพียง 6.09±2.61% เมื่อใช้ไคโตซานเข้มข้น 1.0% สอดคล้องกับรายงานของ Tikhonov *et al.* (2006) ที่กล่าวว่าไคโตซานสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราได้ ความสามารถในการงอกของสปอร์ราที่ลดลงเนื่องจากไคโตซานเหนี่ยวนำทำให้เส้นใยของราเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจึงส่งผลต่อการสร้างสปอร์และการงอกของสปอร์รา สอดคล้องกับรายงานของ Ghaouth *et al.* (1992) ซึ่งรายงานว่าหากใช้ไคโตซานที่มี pH 5.6 และมีความเข้มข้นสูงกว่า 0.15% สามารถเหนี่ยวนำให้เส้นใยของ *B. cinerea* และ *R. stolonifer* เปลี่ยนแปลงรูปร่างและสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราดังกล่าวได้มากกว่า 90% และ 75% ตามลำดับ

เมื่อศึกษาผลของไคโตซานต่อการมีชีวิตรอดของสปอร์ราโดยสุ่มตรวจสอบสปอร์จำนวนทั้งหมด 115 ± 5 สปอร์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานเพิ่มขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสปอร์ *A. flavus* 05-21 มีค่าลดลง กล่าวพบการรอดชีวิตของสปอร์เพียง 9.28±3.62% เมื่อทดสอบกับไคโตซานความเข้มข้น 1.0% สอดคล้องกับรายงานของ Bhaskara *et al.* (1998) ซึ่งระบุว่าสปอร์ราที่สัมผัสกับไคโตซานมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ และรายงานของวรเนตร หอมแก่นจันทร์ (2547) ซึ่งพบว่าเปอร์เซ็นต์สปอร์รา *A. flavus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สัมผัสกับไคโตซานความเข้มข้น 0.1-1.0% มีชีวิตรอดประมาณ 54-89% อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ใช้เวลาสำหรับตรวจสอบการงอกของสปอร์ 5 ชั่วโมง แต่ถ้าหากเวลานานขึ้นสปอร์อาจงอกได้มากขึ้น กล่าวคือสปอร์ที่สร้างขึ้นในสภาวะที่มีไคโตซานยังคงมีชีวิตอยู่ โดยไคโตซานมีผลในการไปชะลอการงอกของสปอร์เท่านั้น

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจสอบลักษณะของเส้นใยราที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมไคโตซาน โดยตรวจสอบลักษณะของเส้นใยราที่เจริญภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าไคโตซานมีผลต่อการแตกแขนงของเส้นใยรา (fungal branching) ซึ่งในอาหารที่ไม่มีไคโตซานเส้นใยรามีการแตกแขนงทุกทิศทาง ทำให้พบความหนาแน่นของเส้นใยรามาก ส่วนการแตกแขนงของเส้นใยราบนอาหารที่มีไคโตซานจะพบว่าเกิดขึ้นได้น้อย ทำให้เส้นใยในโคโลนีพบได้ค่อนข้างเบาบาง (ไม่ได้แสดงผล) การแตกแขนงของเส้นใยราที่เจริญบนอาหารที่มีไคโตซานถูกยับยั้งเนื่องจากไคโตซานไปมีผลต่อการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไคโตซานไปรบกวนขบวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ซึ่งขบวนการดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการเจริญของเส้นใย จากรายงานการศึกษาของ Bhaskara *et al.* (1998) พบว่าลักษณะของเส้นใยรา *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีไคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ มีลักษณะรูปร่างและการเจริญผิดปกติ คือ เส้นใยราจะมีลักษณะบวม มีการแตกกิ่งและมีลักษณะบิดเบี้ยวมากเกินไป เส้นใยที่ปรากฏมีลักษณะโปร่งใสและจะสังเกตเห็นการย่อยสลายของผนังเซลล์ ลักษณะการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเห็นได้ชัดเจนเมื่อไคโตซานมีระดับความเข้มข้นสูงขึ้น อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้ไม่พบลักษณะการเปลี่ยนแปลงมากนัก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง *A. flavus* 05-21 น้อยเกินไป หากเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้นกว่านี้อาจพบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยราได้มากขึ้นก็เป็นไปได้

ตอนที่ 3 ประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้ง *B. cereus* ATCC 11778, *A. flavus* 05-21 และจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ปนเปื้อนในน้ำพริกปรุงรส

ถึงแม้ว่าไคโตซานมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ATCC 11778 และ *A. flavus* 05-21 ได้เมื่อทดสอบในหลอดทดลองหรือบนอาหารเลี้ยงเชื้อ อย่างไรก็ตามผลการทดสอบในน้ำพริกปรุงรสสองชนิดคือน้ำพริกเผาและน้ำพริกตาแดงกลับพบว่าการเติมไคโตซานลงไปไม่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้ได้ อีกทั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดดังกล่าวยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอีกด้วย สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากหลายปัจจัยด้วยกัน ปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งซึ่งมีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานคือความเข้มข้นของไคโตซาน (Oh *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2006) ซึ่งโดยปกติแล้วไคโตซานที่ใช้ผสมลงในตัวอย่างอาหารจริงนั้นมักมีความเข้มข้นสูงกว่าที่ใช้ในหลอดทดลอง ทั้งนี้เนื่องจากในตัวอย่างอาหารจริงมีลักษณะที่ซับซ้อน มีองค์ประกอบที่หลากหลาย ทั้งชนิดและรูปสัมผัส ซึ่งองค์ประกอบต่าง ๆ ในอาหารอาจมีปฏิกิริยากับโมเลกุลของไคโตซานหรือหมู่ปฏิกิริยาบนโมเลกุลของไคโตซาน ทำให้มีไคโตซานที่อยู่ในรูปแอคทีฟในปริมาณน้อยลง จนมีผลทำให้กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์เกิดได้ไม่ดีหรือไม่มี

ผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์เลยก็เป็นได้ (Devlieghere, Vermeulen, & Debevere, 2004) ดังจะเห็นได้จากรายงานของ Oh *et al.* (2001) ซึ่งพบว่าไคโตซานความเข้มข้น 20-70 ppm สามารถยับยั้งยีสต์และแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสียได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth แต่เมื่อทดสอบในมายองเนสพบว่าต้องใช้ไคโตซานความเข้มข้นสูงถึง 100-1000 ppm จึงสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ดังกล่าวได้ โดยในการศึกษานี้ใช้ความเข้มข้นของไคโตซานเท่ากับ 0.5% และ 1.0% เมื่อทดสอบกับ *B. cereus* ATCC 11778 เนื่องจากความเข้มข้นดังกล่าวเป็นความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ดี (ความเข้มข้นของไคโตซานน้อยกว่านี้ก็สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ดีเช่นกัน) ส่วนในกรณีของ *A. flavus* 05-21 ใช้ไคโตซานในความเข้มข้นที่สูงขึ้นจนถึง 2.0% อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ไคโตซานในปริมาณที่มากขึ้น มีผลทำให้ความสามารถในการละลายของไคโตซานลดลง มีความหนืดสูง ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการประยุกต์ใช้งาน (Tsai *et al.*, 2002)

โดยปกติไคโตซานไม่ละลายในน้ำ แต่สามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก จากการศึกษาพบว่าไคโตซานที่เติมลงในน้ำพริกปรุงรสทั้งสองชนิดนี้มีการละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำพริกได้ไม่ดีนัก ทั้งนี้เนื่องจากในน้ำพริกมีปริมาณน้ำอยู่น้อย อีกทั้งยังมีไขมันจากน้ำมันพืชที่ใช้ในการผัดน้ำพริกอยู่ด้วย ความเข้มข้นของไคโตซานสูงสุดที่ใช้ผสมในน้ำพริกคือ 2.0% ซึ่งพบว่าไคโตซานบางส่วนจะจับตัวเป็นก้อน จากลักษณะดังกล่าวนี้ทำให้ไคโตซานมีโอกาสที่จะสัมผัสกับจุลินทรีย์ในน้ำพริกได้น้อยลง ทำให้ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดที่ทดสอบ รวมทั้งจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ปนเปื้อนในน้ำพริกปรุงรสดังกล่าว ได้แก่ แบคทีเรียทั่วไป *Bacillus* spp. ยีสต์และรา

จากข้อจำกัดดังกล่าวข้างต้นทำให้ความพยายามที่จะนำไคโตซานมาประยุกต์ใช้เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์หรือสารกันเสียในตัวอย่างน้ำพริกปรุงรสยังไม่ประสบความสำเร็จ ซึ่งผู้วิจัยเห็นว่าอาจจำเป็นต้องมีการดัดแปลงโมเลกุลของไคโตซานให้มีความสามารถในการละลายน้ำได้มากขึ้น ทั้งนี้เพื่อเอื้อต่อการนำไปใช้จริงในผลิตภัณฑ์ เช่น Yang, Chou, & Li (2005) พบว่าอนุพันธ์ของไคโตซานในรูป *N*-alkylated disaccharide chitosan ซึ่งละลายน้ำได้นั้นมีความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับไคโตซานปกติ (เมื่อทดสอบที่ pH เป็นกลาง) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยใช้ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลลดลง (แต่ยังอยู่ในระดับที่ยังคงคุณสมบัติต้านจุลินทรีย์อยู่ ซึ่ง Jeon & Kim (2000) และ Jeon, Park, & Kim (2001) กล่าวว่าขนาดโมเลกุลของไคโตซานควรมีขนาดมากกว่า 10,000 ดาลตัน) ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของไคโตซานทำให้สะดวกนำไปประยุกต์ใช้จริง (Yoshihiko *et al.*, 2003) ดังรายงานของ Liu *et al.* (2006) ที่ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ $5.5x10^4$-$15.5x10^4$ ดาลตัน พบว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีประสิทธิภาพในการ

ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และรายงานของ Tikhonov *et al.* (2006) ที่กล่าวว่าการใช้ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำสามารถยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรีย ยีสต์และราสายได้เป็นอย่างดี ซึ่งจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้แก่ *E. coli*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Enterobacter agglomerans*, *B. subtilis*, *Candida kruisei* และ *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* รวมทั้งจากการศึกษาของ Chien, Sheu, & Lin (in press) ซึ่งใช้ไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลต่ำเคลือบผลไม้ที่ชื่อว่า red pitayas ซึ่งทดสอบในรูปของผลไม้ที่หั่นเป็นชิ้น พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ชิ้นผลไม้ดังกล่าวได้ รวมทั้งยังช่วยรักษาคุณภาพของผลไม้อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้ไคโตซานโอลิโกเมอร์เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ ซึ่งจากรายงานของ Jeon *et al.* (2001) กล่าวว่าไคโตซานโอลิโกเมอร์สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งกลุ่มแกรมลบและแกรมบวก รวมทั้งแบคทีเรียแลคติกด้วย

อย่างไรก็ตาม Qin *et al.* (2006) รายงานผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *E. coli* และ *Candida albicans* โดยใช้ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ ตั้งแต่ $1.4x10^3$–$4.0x10^5$ ดาลตัน พบว่าไคโตซานที่มีขนาดเล็กลงกว่าปกติและละลายน้ำได้เล็กน้อยรวมทั้งโอลิโกเมอร์ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบ อีกทั้งยังพบว่าไคโตซานขนาดเล็กที่ละลายน้ำได้ดีและโอลิโกเมอร์มีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญของ *C. albicans* ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ $5x10^4$ ดาลตัน (ละลายน้ำไม่ได้) สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด และในการศึกษาของ Jo *et al.* (2001) พบว่าไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่ผสมลงในไส้กรอกไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามการใช้โอลิโกเมอร์ดังกล่าวมีส่วนช่วยรักษาคุณภาพของสีไส้กรอกและลดการเกิดออกซิเดชันของลิปิดได้

การศึกษาความเป็นไปได้ของการนำไคโตซานไปประยุกต์ใช้จริงในผลิตภัณฑ์น้ำพริกปรุงรสเพื่อการยับยั้งจุลินทรีย์นั้นยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมถึงปัจจัยต่าง ๆ นอกจากน้ำหนักโมเลกุล ความเข้มข้นและวิธีในการเตรียมไคโตซานดังกล่าวแล้วข้างต้น ปัจจัยแวดล้อมภายนอกอื่น ๆ ก็จำเป็นต้องมีการศึกษาด้วยเช่นกัน เช่น pH และอุณหภูมิ เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ต่างมีผลร่วมกันในการแสดงออกถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซาน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิและ pH ที่มีผลส่งเสริมประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานในผลิตภัณฑ์น้ำพริกปรุงรส
2. ควรมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพของการใช้อนุพันธ์ของไคโตซานหรือไคโตซานที่มีขนาดเล็กลงในการยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำพริกปรุงรส

เอกสารอ้างอิง

ดวงพร คันธโชติ. (2537). *อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ*. กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

นภาพร เชี่ยวชาญ และธนารัตน์ ศรีธุระวานิช. (2547) ไคโตซานกับการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร. *อาหาร*, 34(2), 190-194.

นันทนา อรุณฤกษ์. (2537). *การจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์*. กรุงเทพฯ: โอเดียน สโตร์.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. (2544). *จุลชีววิทยาทั่วไป* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประไพภรณ์ พนาพงศ์ไพศาล. 2545. การยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชโดยไคโตซาน. ปัญหาทางจุลชีววิทยา ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ป๋วย อุ่นใจ. (2544). ไคติน-ไคโตซาน สารมหัศจรรย์จากธรรมชาติ. วันที่ค้นข้อมูล 23 กุมภาพันธ์ 2547, เข้าถึงได้จาก http://update.se-ed.com/162/chitin.htm

มาลินี ลิ้มโภคา. 2527. พิษวิทยาและปัญหาที่พบในสัตว์. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จรัญสนิทวงศ์.

ยุวดี สมิทธิวาส. (2541). สารพิษอะฟลาทอกซิน (Aflatoxin). หนังสือพิมพ์เดลินิวส์. วันที่ค้นข้อมูล 4 กรกฎาคม 2546, เข้าถึงได้จาก http://www.geocities.com/Tokyo/Harbor/ 2093/ doctors/aflatoxin .html

รัตนา รุจิรวนิช. 2544. การผลิตไคติน-ไคโตซาน ในการประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิสาตรี คงเจริญสุนทร และจิราภรณ์ แก่นภักดี. (2545). ผลของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATTCC27854 *Salmonella* group B_1 และ *Salmonella* group C_2. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 7(1), 25-31.

วรเนตร หอมแก่นจันทร์. (2547). ผลของไคโตซานในการควบคุม *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ที่สร้างอะฟลาทอกซิน. ปัญหาทางจุลชีววิทยา ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย. 2536. *คู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ "เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม"*. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์สาธารณสุขมูลฐานอาเซี่ยน.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. (2545). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

สุวบุญ จิรชาญชัย, รังรอง ยกส้าน และโกสุม สมัครรัตน์. 2544. สมบัติทางเคมีและกายภาพของไคติน-ไคโตซาน ในการประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุวลี จันทร์กระจ่าง. (2544). การประยุกต์ใช้ไคติน-ไคโตซาน. ใน *เอกสารประกอบการบรรยายการประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้* (หน้า 56-58). กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 30-31 สิงหาคม 2544.

โสภณ คงสำราญ. (2524). *แบคทีเรียทางการแพทย์*. กรุงเทพมหานคร: พิฆเนศ.

อุษณีย์ กลิ่นนาค. (2549). *การปนเปื้อนของรา Aspergillus flavus และ Aspergillus parasiticus ที่สร้างอะฟลาทอกซินในเมล็ดธัญพืช*. ปัญหาพิเศษทางจุลชีววิทยา ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Alexander, M. (1965). *Methods of soil analysis part 2: Chemical and microbiological properties*. Madison: American Society of Agronomy.

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., and Blackwell M. (1996). *Introductory Mycology*. New York, John Wiley & Sons.

An overview of bacterial disease. Retrieved January, 29, 2005, from http://www.bmb.leeds.ac.uk /mbiology/ug/SGM_04/SGM0080.html

Bennett, J.W., and Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, *16*, 497-516.

Bhaskara Reddy, M.V., Arul, J., Ait Barka, E., Angers, P., Richard, C., and Castaigne, F. (1998). Effect of chitosan on growth and toxin production by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Biocontrol Science Technology*, *8*, 33-43.

Bothast, R.J., and Fennell, D.I. (1974). A medium for rapid identification and enumeration of *Aspergillus flavus* and related organisms. *Mycologia*, *66*, 365-369.

Cagri, A. Ustunol, Z., and Ryser, E.T. (2004). Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of Food Protection*, *67*, 833-848.

Cell cycle of *Bacillus cereus*. Retrieved February, 13, 2005, from http:// www.agr.Kyus huu.ac.jp./.../eisei/espo.html.

Chen, C.S., Liau, W.Y., and Tsai, G.J. (1998). Antibacterial effects of *N*-sulfonated and *N*-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. *Journal of Food Protection, 61*, 1124-1128.

Chien, P.-J., Sheu, F., and Lin, H.-R. (inpress). Quality assessment of low molecular weight chitosan coating on sliced red pitayas. Journal of Food Engineering.

Choi, B. K., Yoo, Y.J., Kim, K.Y., Choi, J.H., and Kim, C.Y. (2001). *In vitro* antimicrobial activity of a chitooligosaccharide against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *International Journal of Antimicrobial agents, 18*, 553-557.

Concon, J. M., (1988). *Food toxicology part b: Contaminants and additives*. New York: Marcel Dekker.

Coroller, L., Leguerinel, I., and Mafart, P. (2001). Effect of water activity of heating and recovery media on apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spore. *Applied and Environmental Microbiology, 67*, 317-322.

Cuero, R.G., Duffs, E., Osuji, G. and Pettit, R. 1991. Aflatoxin control in preharvest maize: effects of chitosan and two microbial agents. *Journal of Agricultural Science, 117*, 165-169.

Darmadji, P., and Izumimoto, M. (1994). Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Science, 38*, 243-254.

Devlieg, F., Vermeulen, and Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology, 21*, 703-714.

Dodane, V., and Vilivalam, V.D. (1998). Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharmaceutical Science and Technology Today, 1*, 246-253.

Dufrenne, J., Bijwaard, M., Giffel, M.T., Beumer, R., and Notermans, S. (1995). Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. *International Journal of Food Microbiology, 27*, 175-183.

Fente, C.A., Jaimez Ordaz, J., Vazquez, B.I., Franco, C.M., and Cepeda, A. (2001). New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains. *Applied and Environmental Microbiology, 67*, 4858-4862.

Ghaouth, A., Arul, J., Asselin, A., and Benhamou, N. (1992). Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer. Mycology Research, 96*, 769-779.

Gilman, J.C. (1975). A Manual of Soil Fungi. New Delhi. Oxford IBH Publishing.

Gonzalez, I., Lopez, M., Martinez, S., Bernardo, A., and Gonzalez J. (1999). Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores formed at different temperature. *International Journal of Food Microbiology, 51*, 81-84.

Gourama, H., and Bullerman, L.B. (1995). *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* : aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds : a review. *Journal of Food Protection, 58*, 1395-1404.

Griffin, D.H. (1994). *Fungal Physiology.* New York. Wiley-Liss.

Harmon, S.M., Goepfert, J. M., and Bennett, R. W., (1992). *Compendium of methods for the microbiologycal examination of food.* New York: American Public Heath.

Helander, R.H., Nurmiaho-Lassila, E.L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., and Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology, 71*, 235-244.

Hui, Y. H. (1994). *Foodborne disease handbook : Diseases caused by bacteria.* New York : Marcel Dekker.

Jarvis, B. 1971. Factors of aflatoxin the production of mycotoxins. *Journal of Applied Bacteriology, 34*, 199-213.

Jeon, Y.J., Kamil, J.Y., and Shahidi, F. (2002). Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*, 5167-5178.

Jeon, Y.-J., Park, P.-J., and Kim, S.-K. (2001). Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers, 44*, 71-76.

Jo, C., Lee, J.W., Lee, K.H., and Byun, M.W. (2001). Quality properties of pork sausage prepared with water-soluble chitosan oligomer. *Meat Science, 59*, 369-375.

Joffe, A.Z., and Lisker, N. (1969). Effect of light, temperature and pH value on aflatoxin production *in vitro*. *Applied Microbiology*, *18*, 517-518.

Khor, E., and Lim, L.Y. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, *24*, 2339-2349.

Koide, S.S. (1998). Chitin-chitosan, properties, benefits and risks. *Nutritional Research*, *18*, 1091-1101.

Larone Davise, H. (1993). Medically Important Fungi : A Guide to Identification. Washington D.C. : American Society for Microbiology.

Li, Q., Dunn, E. T., Grandmaison, E.W., and Goosen, M. F. A. (1992). Applications and properties of chitosan. *Bioactive and Compatible Polymers*, *7*, 370-395.

Liu, H., Du, Y., Wang, X., and Sun, L. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*, *95*, 147-155.

Liu, N., Chen, X.-G., Park, H.-J., Liu, C.-G., Liu, C.-S., Meng, X.-H., and Yu, L.-J. (2006). Effect of MW and concentration of chitosan on antimicrobial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers*, *64*, 60-65.

Muzzarelli, R.A., Tanfani, F., and Scarpini, G. (1980). Chelating, film-forming and coagulating ability of the chitosan-glucan complex from *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering*, *22*, 885-896

No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H., and Meyers, S. P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Food Microbiology*, *74*, 65-72.

Pitt, J.I., Ailsa, D., Hocking and Diane, R. (1983). An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Journal of Applied Bacteriology*, *54*, 109-114.

Oh, H.I., Kim, Y.J., Chang, E.J., and Kim, J.Y. (2001). Antimicrobial characteristics of chitosans against food spoilage microorganisms in liquid media and mayonnaise. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, *65*, 2378-2383.

Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Bégin, Holley, R.A. (2000). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, *62*, 139-148.

Qin, C., Li, H., Xiao, Q., Liu, Y., Zhu, J., and Du, Y. (2006). Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*, *63*, 367-374.

Rabea, E.I., Badawy, M.E.T., Stevens, C.V., Smagghe, G., and Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, *4*, 1475-1465.

Rhoades, J., and Roller, S. (2000). Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*, 80-86.

Roller, S. and Covill, N. (1999). The antifungal of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, *47*, 67-77.

Roller, S. and Covill, N. (2000). The antimicrobial properties of chitosan in mayonnaise and mayonnaise-based salads. *Journal of Food Protection*, *63*, 202-209.

Roller, S., Sagoo, S., Board, R., O'Mahony, T., Caplice, E., Fitzgerald, G., Fogden, M., Owen, M., and Fletcher, H. (2002). Novel combination of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. *Meat Science*, *62*, 165-171.

Sagoo, S., Board, R., and Roller, S. (2002). Chitosan inhibits growth of spoilage microorganisms in chilled pork products. *Food Microbiology*, *19*, 175-182.

Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., and Jeon, Y.J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*, *10*, 37-51.

Simpson, B. K., Gagne, N., Ashie, I. N. A., and Noroozi, E. (1997). Utilization of chitosan for preservation of raw shrimp. *Food Biotechnology*, *11*, 25-44.

Tikhonov, V.E., Stephnova, E.A., Babak, V.G., Yamskov, I.A., Palma-Guerrero, J., Jansson, H.-B., Lopez-Llorca, L.V., Salinas, J., Gerasimenko, D.V., Avdienko, I.D., and Varlamov, V.P. (2006). Bacteriocidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-/2(3)-(dodec-2-enyl)succinoyl/-derivertives. *Carbohydrate Polymers*, *64*, 66-72.

Tsai, G.J., Su, W.H., Chen, H.C., Pan, C.L. (2002). Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fishery Science*, *68*, 170-177.

Tsai, G. J., Wu, Z. Y., and Su, W. H. (2000). Antibacterial activity of a chitooligosaccharide mixture prepared by cellulase digestion of shrimp chitosan and its application to milk preservation. *Journal of Food Protection*, *63*, 747-752.

Valero, M., Fernandez, P.S., and Salmeron, M.C. (2003). Influence of pH and temperature on growth of *Bacillus cereus* in vegetable substrates. *International Journal of Food Microbiology*, *82*, 72-79.

Wyllie, T.D., and Morhouse, L.G. (1977). Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses: an encyclopedic handbook. London. Marcell Dekker.

Wang, G. H., (1992). Inhibition and inactivation of five species of food borne pathogens by chitosan. *Journal of Food Protection*, *55*, 916-919.

Xie, W., Xu, P., Wang, W., and Liu, Q. (2002). Preparation and antibacterial activity of a water soluble chitosan derivative. *Carbohydrate Polymer*, *50*, 35-40.

Yang, T.-C., Chou, C.-C., and Li, C.-F. (2005). Antibacterial activity of *N*-alkylated disaccharide chitosan derivertives. *Internatinal Journal of Food Microbiology*, *97*, 237-245.

Yoshihiko, O., Mayumi, S., Takahiro, A., Hiroyuki, S., Yoshihiro, S., and Ichiro, N. (2003). Antimicrobial activity of chitosan with different degrees of acetylation and molecular weights. *Biocontrol Science*, *8*, 25-35.

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Mannitol egg yolk phenol red polymyxin agar ประกอบด้วย

1.1 ส่วนผสมพื้นฐาน

peptone	10.0	กรัม
beef extract	1.0	กรัม
D-mannital	10.0	กรัม
sodium chloride	10.0	กรัม
phenol red	0.025	กรัม
agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดหลอมจนละลาย แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.2 ส่วนผสมเพิ่มเติม

ก. Egg-Yolk emulsion

แช่ไข่ไก่ในสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70% นานประมาณ 1 ชั่วโมง แยกไข่แดงออกจากไข่ขาวโดยเทคนิคปลอดเชื้อ ผสมไข่แดงกับน้ำเกลือด้วยอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ทำให้ผสมเข้ากันดี

ข. Polymyxin B sulphate 0.1%

ละลาย Polymyxin B sulphate 500,000 ยูนิต ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 50 มิลลิลิตร กรองโดยใช้หัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน ที่ปราศจากเชื้อ

<u>วิธีการเตรียม</u>

เติม Egg-Yolk emulsion (ก) 100 มิลลิลิตร และสารละลาย Polymyxin B sulphate 0.1% (ข) 10 มิลลิลิตร ลงในส่วนผสมพื้นฐาน 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเทอาหารใส่จานปราศจากเชื้อ จานละประมาณ 20 มิลลิลิตร ปล่อยให้อาหารแข็ง

2. Nutrient broth (NB) ประกอบด้วย

beef extract	3.0	กรัม
peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดหลอมจนละลาย แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ในการนำอาหารชนิดนี้ไปใช้สำหรับกระตุ้นการสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 จะเติมสารละลาย $MnSO_4$ (ภาคผนวก ข) ลงในอาหาร NB 50 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เป็น 1 ppm (Gonzalez, Lopez, Martinez, Bernarodo, & Gonzalez, 1999)

3. Nutrient agar (NA) ประกอบด้วย

beef extract	3.0	กรัม
peptone	5.0	กรัม
agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดหลอมจนละลาย แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทอาหารใส่จานปราศจากเชื้อ จานละประมาณ 20 มิลลิลิตร ปล่อยให้อาหารแข็ง

4. Trypticase soy broth (TSB) ประกอบด้วย

trypticase peptone	17.0	กรัม
phytone peptone	3.0	กรัม
sodium chloride	5.0	กรัม
dipostassium phosphate	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดหลอมจนละลาย แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. Trypticase soy agar (TSA) ความเข้มข้น 2 เท่า ประกอบด้วย

trypticase peptone	17.0	กรัม
phytone peptone	3.0	กรัม
sodium chloride	5.0	กรัม
dipostassium phosphate	2.5	กรัม
agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดหลอมจนละลาย ปรับพีเอช 6.0 ด้วย 1% กรดอะซิติก แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6. Chitosan-Trypticase soy agar

6.1 ชั่งไคโตซานตามตารางที่ ก ละลายใน 1% กรดอะซิติกให้เข้ากันโดยใช้ความร้อนเข้าช่วย ปรับพีเอชเป็น 6.0 ด้วย 10 N NaOH โดยให้มีความเข้มข้นของไคโตซานเป็น 0.05%, 0.1%, 0.25% และ 0.5% จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6.2 นำสารละลายไคโตซานที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (2 เท่า) ปราศจากเชื้อ ดังตารางที่ ก

ตารางที่ ก-1 การเตรียม Chitosan-Trypticase soy agar

ความเข้มข้นสารละลายไคโตซาน (%)	ปริมาณไคโตซาน (กรัม) ละลายใน 1% กรดอะซิติก ปริมาตร 500 มิลลิลิตร	ปริมาตรของ Trypticasesoy agar ความเข้มข้น 2 เท่า (มิลลิลิตร)
0	0	500
0.05	0.5	500
0.10	1.0	500
0.25	1.0	500
0.50	1.0	500

7. Potato dextrose agar (PDA) องค์ประกอบ

Potato dextrose power	39	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดหลอมจนละลาย แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทอาหารใส่จานปราศจากเชื้อจานละประมาณ 20 มิลลิลิตร ปล่อยให้อาหารแข็ง

8. Coconut agar (CNA) (ดัดแปลงจาก Feate และคณะ, 2001) องค์ประกอบ

เนื้อมะพร้าวขูด : น้ำกลั่น	1: 3	(น้ำหนัก/ปริมาตร)
Agar	1	เปอร์เซ็นต์

ในการเตรียม coconut agar 300 มิลลิลิตร ชั่งเนื้อมะพร้าว 100 กรัม เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร นำไปปั่นในเครื่องตีปั่น เป็นเวลา 2 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง ปรับ pH เป็น 6.9 ปริมาตรที่เหลืออีก 100 มิลลิลิตร นำไปเตรียม agar โดยชั่ง agar 3 กรัมละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แยกฆ่าเชื้อน้ำกะทิและ agar ในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที หลังจากนั้นนำน้ำกะทิที่ฆ่าเชื้อแล้วมากรองอีกครั้งด้วยผ้าขาวบาง (ต้องกรองภายใต้สภาวะที่ปลอดเชื้อ) นำน้ำกะทิที่กรองแล้วผสมกับ agar เติม Ampicillin และ Streptomycin sulfate ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เทอาหารใส่จานปราศจากเชื้อ จานละประมาณ 20 มิลลิลิตร ปล่อยให้อาหารแข็ง

9. Chitosan-coconut agar

3.1 ชั่งไคโตซานตามตารางที่ ข ละลายใน 1% กรดอะซิติกให้เข้ากันโดยใช้ความร้อนเข้าช่วย ปรับพีเอชเป็น 6.0 ด้วย 10 N NaOH โดยให้มีความเข้มข้นของไคโตซานเป็น 0.25%, 0.5%, 0.75% และ 1.0% จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.2 นำสารละลายไคโตซานที่ฆ่าเชื้อแล้วผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ coconut agar ปราศจากเชื้อ ดังตารางที่ ข

3.3 เติม Ampicillin และ Streptomycin sulfate ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เทอาหารใส่จานปราศจากเชื้อ จานละประมาณ 20 มิลลิลิตร ปล่อยให้อาหารแข็ง

ตารางที่ ก-2 การเตรียม Chitosan-coconut agar

ความเข้มข้นสารละลายไคโตซาน (%)	ปริมาณไคโตซาน (กรัม) ละลายใน 1% กรดอะซิติก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร	ปริมาตรของ coconut agar ความเข้มข้น 2 เท่า (มิลลิลิตร)
0	0	50
0.25	0.25	50
0.50	0.25	50
0.25	0.25	50
1.00	1.00	50

10. *Aspergillus flavus* and *parasiticus* agar (AFPA) (Oxoid – Product Detail, 2003) องค์ประกอบ

Peptone	10.0	กรัม
Yeast Extract	20.0	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.5	กรัม
Dichloran	0.002	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

pH 6.3 ± 0.2

ในการทดลองครั้งนี้ใช้ AFPA ที่ดัดแปลงมาจากสูตรข้างต้น ซึ่งในการทดลองจะไม่ใช้ Dichloran เนื่องจาก Dichloran เป็นสารอันตรายที่เลิกผลิตไปแล้ว โดยวิธีการเตรียมAFPA มีดังนี้ ผสมส่วนผสมทั้งหมด ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปหลอมจนวุ้นละลายจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติม Ampicillin และ Streptomycin sulfate ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เทอาหารใส่จานปราศจากเชื้อ จานละประมาณ 20 มิลลิลิตร ปล่อยให้อาหารแข็ง

11. Chitosan-AFPA

5.1 ชั่งไคโตซานชั่งไคโตซานตามตารางภาคผนวก ก-1 ละลายใน 1% กรดอะซิติกให้เข้ากันโดยใช้ความร้อนเข้าช่วย ปรับพีเอชเป็น 6.0 ด้วย 10 N NaOH โดยให้มีความเข้มข้นของ ไคโตซานเป็น 0.1%, 0.25%, 0.5%, 0.75% และ 1.0% จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5.2 นำสารละลายไคโตซานที่ฆ่าเชื้อแล้วผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ AFPA ปราศจากเชื้อดังตารางที่ ค

5.3 เติม Ampicillin และ Streptomycin sulfate ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เทอาหารใส่จานปราศจากเชื้อจานละประมาณ 20 มิลลิลิตร ปล่อยให้อาหารแข็ง

ตารางที่ ก-3 การเตรียม Chitosan-AFPA

ความเข้มข้นสารละลายไคโตซาน (%)	ปริมาณไคโตซาน (กรัม) ละลายใน 1% กรดอะซิติก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร	ปริมาตรของ AFPA ความเข้มข้น 2 เท่า (มิลลิลิตร)
0	0	50
0.25	0.25	50
0.50	0.25	50
0.25	0.25	50
1.00	1.00	50

ภาคผนวก ข
สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. น้ำเกลือ (0.85%) ประกอบด้วย

sodium chloride	8.5	กรัม
tween 80	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมละลายในน้ำกลั่น โดยใช้ความร้อนเข้าช่วย จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. น้ำเกลือ (1.70%) (เพื่อใช้ในการผสมสารละลายไคโตซาน) ประกอบด้วย

sodium chloride	17.0	กรัม
tween 80	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมละลายในน้ำกลั่น โดยใช้ความร้อนเข้าช่วย ปรับพีเอช 6.0 ด้วย 1% acetic acid จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. การเตรียมสารละลาย Manganese (II) sulfate 1,000 ppm

Manganese (II) sulfate	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมละลายในน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. Tween 80 (0.1%v/v)

เตรียมโดย ปิเปต Tween 80 จำนวน 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

5. 10 M NaOH ประกอบด้วย

NaOH	40.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

6. ยาปฏิชีวนะ Ampicillin (stock 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ละลาย Ampicillin ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ กรองโดยใช้หัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน ที่ปราศจากเชื้อ หลังจากนั้นแบ่งใส่ eppendorf tube หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยสัดส่วนการนำมาใช้คือ ใช้ stock ที่เตรียมไว้ 200 ไมโครลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7. ยาปฏิชีวนะ Streptoycin sulphate (stock 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ละลายยาปฏิชีวนะ Streptoycin sulphate ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ กรองโดยใช้หัวกรองขนาด 0.45 ไมครอน ที่ปราศจากเชื้อ หลังจากนั้นแบ่งใส่ eppendorf tube หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยสัดส่วนการนำมาใช้คือ ใช้ stock ที่เตรียมไว้ 200 ไมโครลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของยาปฏิชีวนะเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ค
การนับจำนวนสปอร์

1. การนับจำนวนสปอร์ของราโดย haemacytometer
   (สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย, 2536)
   1.1 เตรียม spore suspension ในสารละลาย Tween 80 (0.1%v/v)
   1.2 วาง cover slip ลงบน counting chamber ให้อยู่ตรงกลางพอดี
   1.3 ใช้ปิเปตดูด spore suspension ที่เตรียมไว้ นำปลายปิเปตจ่อทำมุม 35 องศา ระหว่าง chamber และ cover slip แล้วค่อยๆ ปล่อย spore suspension ให้เต็มแท่นพอดี โดยไม่น้อย หรือมากเกินไป
   1.4 ตั้งทิ้งไว้ให้สปอร์กระจายตัวสม่ำเสมอและตกตะกอนเรียบร้อย
   1.5 ใช้กล้องจุลทรรศน์ตรวจนับสปอร์ด้วยกำลังขยาย 40 เท่า
   1.6 นับสปอร์ 9 ช่อง หากสปอร์ติดเส้นไม่อยู่ตรงกลาง ให้เลือกนับสปอร์ที่ทับเส้นทางซ้าย และเส้นบนของช่องหรือนับสปอร์ที่เส้นทางขวาและเส้นล่างของช่องแบบใดแบบหนึ่ง แสดงดังภาพที่ ค-1
   1.7 เมื่อครบ 9 ช่องแล้วให้คำนวณเป็นจำนวนสปอร์/มิลลิลิตร

2. วิธีการคำนวณเป็นจำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร

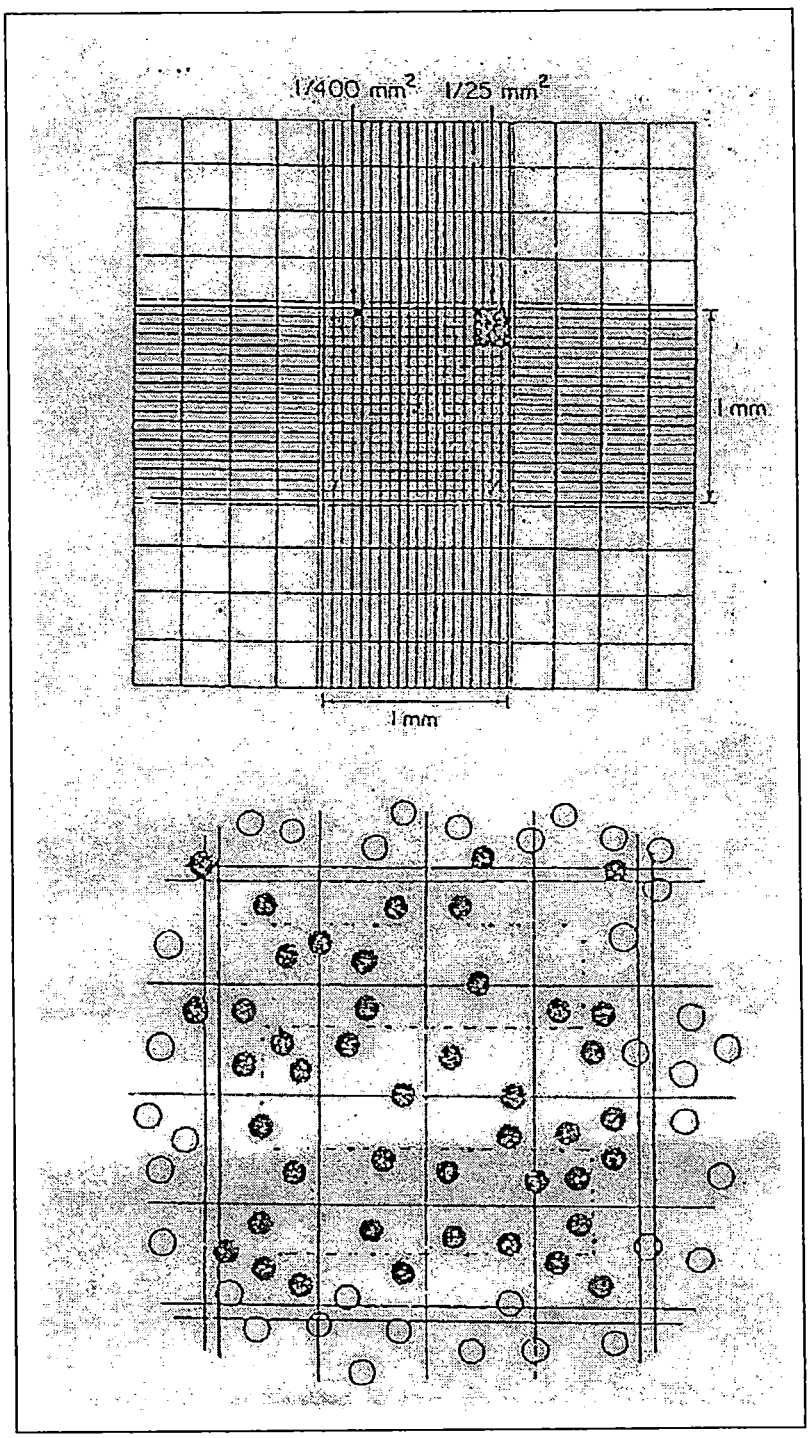
   พื้นที่ของ 1 ช่อง haemacytometer คือ 1/25 ตารางมิลลิเมตร = 0.04 ตารางมิลลิเมตร
   ลึก = 0.1 มิลลิเมตร

   ปริมาตรของแต่ละช่อง = พื้นที่ x ความลึก
   = 0.04 ตารางมิลลิเมตร x 0.1 มิลลิเมตร
   = 0.004 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

   สำหรับ haemacytometer ปริมาณช่องที่นับ 9 ช่อง = A สปอร์
   ดังนั้น 1 ช่อง = A/9 สปอร์ = X สปอร์

   ในปริมาตร 0.004 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มี = X สปอร์

   หาก 1,000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มี = $(X \times 1,000)/0.004$
   = $X/4 \times 10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร
   = $X \times 0.25 \times 10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร



ภาพที่ ค-1 ตารางของ Counting chamber สำหรับนับเซลล์โดยแสดงตัวอย่างการนับสปอร์ที่ทับเส้นทางซ้ายรวมกับเส้นบนของช่อง และวิธีการนับเซลล์

● เซลล์ที่ต้องนับ O เซลล์ที่ไม่ต้องนับ

(ที่มา: สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย, 2536)

ถ้านับปริมาณของสปอร์แล้วไม่ได้ปริมาณตามต้องการให้คำนวณโดยใช้สูตร

$$C1V1 = C2V2$$

โดยที่ C1 = ความเข้มข้นครั้งแรกที่นับจำนวนสปอร์ได้

V1 = ปริมาตรที่ต้องนำจำนวนสปอร์ครั้งแรกมาเจือจาง

C2 = ความเข้มข้นของจำนวนสปอร์ที่ต้องการ

V2 = ปริมาณของเหลวที่ใช้เจือจางสปอร์เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของจำนวนสปอร์ที่ต้องการ

ภาคผนวก ง

ตาราง MPN และการแปลผล MPN

ตารางที่ ง-1 ตาราง MPN สำหรับใช้กับตัวอย่างเจือจาง 10 เท่าตามลำดับ และใช้หลอดทดสอบจำนวน 5 หลอด

p1	p2	Most probable number for indicated values of p3					
		0	1	2	3	4	5
0	0	-	0.018	0.036	0.054	0.072	0.09
0	1	0.018	0.036	0.055	0.073	0.091	0.11
0	2	0.037	0.055	0.074	0.092	0.11	0.13
0	3	0.056	0.074	0.093	0.11	0.13	0.15
0	4	0.075	0.094	0.11	0.13	0.15	0.17
0	5	0.094	0.11	0.13	0.15	0.17	0.19
1	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.12
1	1	0.04	0.061	0.081	0.1	0.12	0.14
1	1	0.061	0.082	0.1	0.12	0.15	0.17
1	1	0.083	0.1	0.13	0.15	0.17	0.19
1	1	0.11	0.13	0.15	0.17	0.19	0.22
1	1	0.13	0.15	0.17	0.19	0.22	0.24
2	0	0.045	0.068	0.091	0.12	0.14	0.16
2	2	0.068	0.092	0.12	0.14	0.17	0.19
2	2	0.093	0.12	0.14	0.17	0.19	0.22
2	2	0.12	0.14	0.17	0.2	0.22	0.25
2	2	0.15	0.17	0.2	0.23	0.25	0.28
2	2	0.17	0.2	0.23	0.26	0.29	0.32
3	0	0.078	0.11	0.13	0.16	0.2	0.23
3	3	0.11	0.14	0.17	0.2	0.23	0.27
3	3	0.14	0.17	0.2	0.24	0.27	0.31
3	3	0.17	0.21	0.24	0.28	0.31	0.35
3	3	0.21	0.24	0.28	0.32	0.36	0.4
3	3	0.25	0.29	0.32	0.37	0.41	0.45
4	0	0.13	0.17	0.21	0.25	0.3	0.36
4	4	0.17	0.21	0.26	0.31	0.36	0.42
4	4	0.22	0.26	0.32	0.38	0.44	0.5
4	4	0.27	0.33	0.39	0.45	0.52	0.59
4	4	0.34	0.4	0.47	0.54	0.62	0.69
4	4	0.41	0.48	0.56	0.64	0.72	0.81
5	0	0.23	0.31	0.43	0.58	0.76	0.95
5	5	0.33	0.46	0.64	0.84	1.1	1.3
5	5	0.49	0.7	0.95	1.2	1.5	1.8
5	5	0.79	1.1	1.4	1.8	2.1	2.5
5	5	1.3	1.7	2.2	2.8	3.5	4.3
5	5	2.4	3.5	5.4	9.2	16	-

(ที่มา : Alexander, 1965)

วิธีการแปลผลเป็น MPN

(ตัวอย่าง)

ค่าการเจือจาง	จำนวนหลอดที่ให้ผลบวก	ตัวแปลผลเป็นMPN
10^5	5	
10^5	5	$p_1 = 5$
10^5	5	$p_2 = 3$
10^5	5	$p_1 = 5$
10^5	0	
10^{10}	0	

การแปลผล พิจารณาจากตารางที่ 5 พบว่าที่ p_1 เท่ากับ 5, p_2 เท่ากับ 3 และ p_3 เท่ากับ 1 จะมีค่าเท่ากับ 1.1 จากนั้นนำมาคูณด้วยค่าการเจือจางของ p_2 เพราะฉะนั้นตัวอย่างดังกล่าวจะมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1.1×10^7 MPN/มิลลิลิตร

ภาคผนวก จ

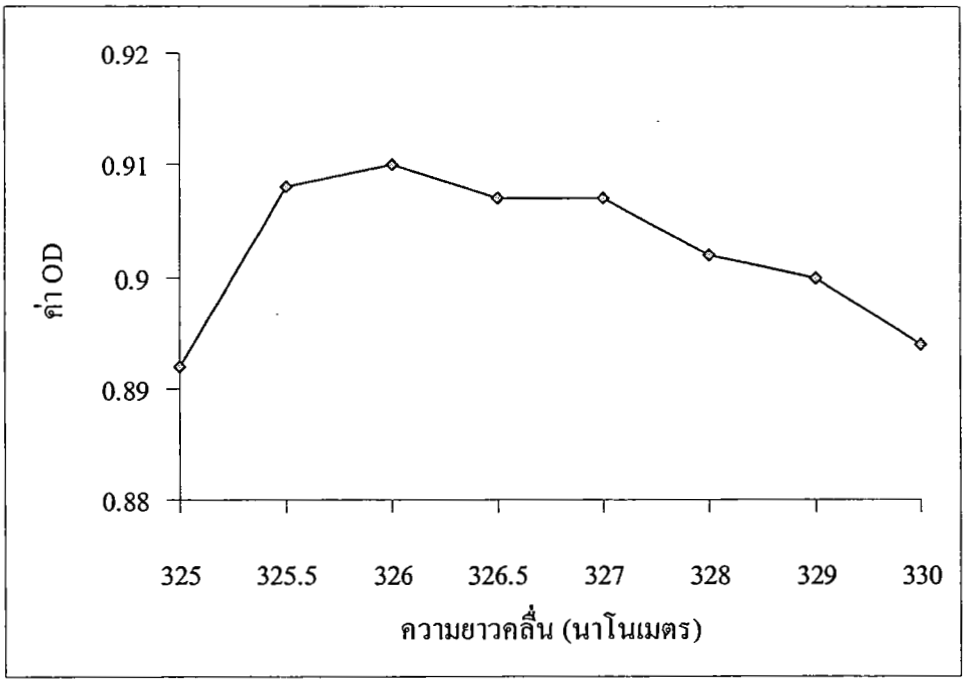
การหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสปอร์ *B. cereus* ATCC11778

เมื่อเตรียมสปอร์แขวนลอยของ *B. cereus* ATCC11778 (บทที่ 3) ได้แล้ว นำมา scan ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เพื่อหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยพิจารณาว่าความยาวคลื่นใดที่อ่านค่า OD ได้มากที่สุด ผลการ scan ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสปอร์แขวนลอย *B. cereus* ATCC11778 แสดงดังตารางที่ จ-1

ตารางที่ จ-1 ค่าการดูดกลืนแสงของสปอร์แขวนลอย *B. cereus* ATCC11778

ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ค่า OD ที่อ่านได้
324.0	-0.386
324.0	-0.386
325.0	0.892
325.0	0.892
324.0	0.910
324.0	0.907
324.0	0.907
324.0	0.907
324.0	0.910
325.0	0.892

จากตารางที่ จ-1 นำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น (นาโนเมตร) กับค่า OD ที่อ่านได้ ดังภาพที่ จ-1

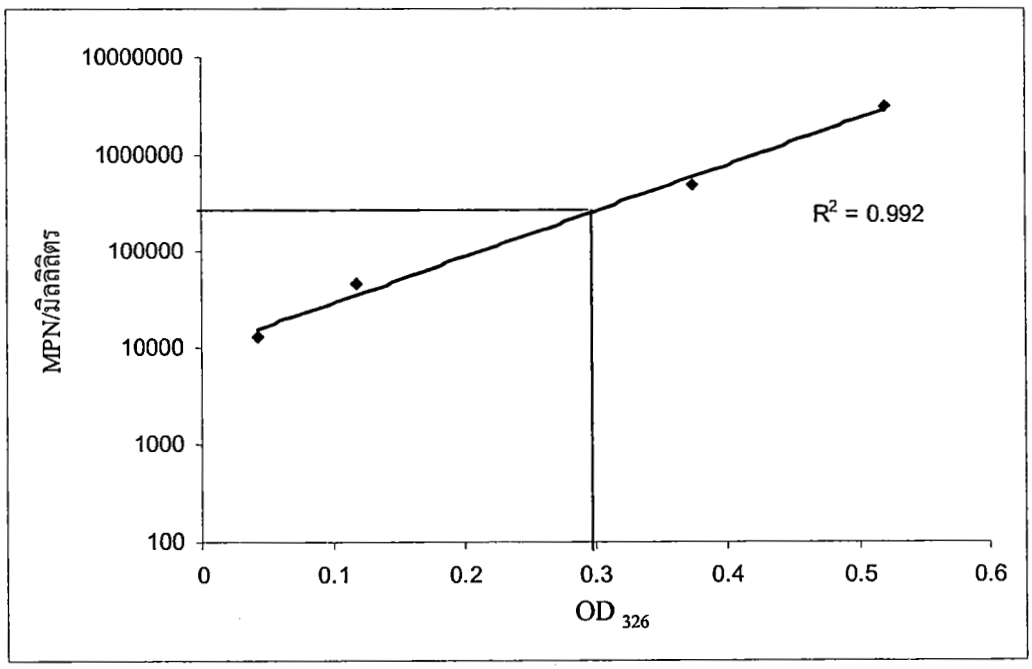


ภาพที่ จ-1 ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น (นาโนเมตร) กับค่า OD ที่อ่านได้ของสปอร์แขวนลอย *B. cereus* ATCC11778

จากภาพที่ จ-1 จะเห็นได้ว่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสปอร์แขวนลอย *B. cereus* ATCC11778 คือ 326 นาโนเมตร จากนั้นนำสปอร์แขวนลอยมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 326 นาโนเมตรเทียบกับปริมาณสปอร์ด้วยวิธี MPN แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และปริมาณสปอร์ของ *B. cereus* ATCC11778 ดังตารางที่ จ-2 และภาพที่ จ-2

ตารางที่ จ-2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 326 นาโนเมตร และปริมาณสปอร์ *B. cereus* ATCC11778

ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 326 นาโนเมตร	MPN/มิลลิลิตร
0.520	3.2×10^6
0.374	4.9×10^5
0.117	4.6×10^4
0.117	1.3×10^4



ภาพที่ จ-2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 326 นาโนเมตร และปริมาณสปอร์ *B. cereus* ATCC11778

จากภาพ จ-2 การศึกษาในครั้งนี้จึงได้เตรียมหัวเชื้อสปอร์ *B. cereus* ATCC11778 เทียบความขุ่น (OD_{326}) เท่ากับ 0.3 ซึ่งมีจำนวนสปอร์ประมาณ 2×10^5 MPN/มิลลิลิตร

ภาคผนวก ช
การเตรียมน้ำพริกปรุงรส

1. น้ำพริกเผาผสมไคโตซาน

1.1 การปรุงน้ำพริกเผา

ส่วนผสม (น้ำพริกเผา 1,000 กรัม)

กุ้งแห้ง	150	กรัม
หอมแดงซอย	350	กรัม
กระเทียมซอย	350	กรัม
พริกแห้ง	100	กรัม
น้ำปลา	180	กรัม
น้ำตาลปี๊บ	150	กรัม
มะขามเปียก	150	กรัม
น้ำมัน	1/2	ถ้วย

วิธีการปรุง

1. ทอดกุ้งแห้ง หอมแดง กระเทียมจนเหลืองกรอบ แล้วนำมาบดผสมให้เข้ากัน
2. พริกแห้งแกะเม็ดเจียว
3. โขลกทุกอย่างแล้วผสมกัน ตั้งกระทะผัดน้ำมัน
4. ปรุงแต่งรสด้วยเครื่องปรุงแต่งรส ได้แก่ น้ำตาลปี๊บ น้ำปลา มะขามเปียก ตามสัดส่วน (ในการทดลองใช้ 1% กรดอะซิติกแทนมะขามเปียก) คนเรื่อย ๆ พอข้น

1.2 การผสมไคโตซานในน้ำพริกเผา

1. ชั่งไคโตซานและน้ำพริกเผาจากข้อ 1.1 ตารางที่ ช-1 โดยนำไคโตซานละลายใน 1% กรดอะซิติกให้เข้ากัน ตามด้วยน้ำพริกเผาที่ชั่งไว้ผัดให้เป็นเนื้อเดียวกัน
2. ชั่งน้ำพริกเผาที่ผสมไคโตซานแล้วใส่ flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 25 กรัม ปิดด้วยจุกสำลี นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

ตารางที่ ช-1 การเตรียมน้ำพริกเผาผสมไคโตซาน

ความเข้มข้นไคโตซาน (%)	ไคโตซาน (กรัม)	1% กรดอะซิติก (มิลลิลิตร)	น้ำพริกเผา (กรัม)
0	0	35	165.0
0.25	0.5	35	164.5
0.50	1.0	35	164.0
0.10	1.0	35	165.0
0.25	1.0	35	162.0
0.10	4.0	35	164.0

2. น้ำพริกตาแดงผสมไคโตซาน

2.1 การปรุงน้ำพริกตาแดง

ส่วนผสม (น้ำพริกตาแดง 1,000 กรัม)

ปลาย่างสุก	150	กรัม
หอมแดง	350	กรัม
กระเทียม	350	กรัม
พริกแห้ง	100	กรัม
น้ำตาลปี๊บ	150	กรัม
น้ำปลา	180	กรัม
มะขามเปียกสับ	220	กรัม
กะปิ	25	กรัม

วิธีการปรุง

1. นำพริกแห้ง หอมแดง กระเทียม คั่วรวมกันจนสุก แล้วนำมาปั่นรวมกัน
2. นำกะปิห่อใบตองหมกไฟ โขลกผสมพร้อมกับปลาย่าง
3. ปรุงแต่งรสด้วยเครื่องปรุงแต่งรส ได้แก่ น้ำตาลปี๊บ น้ำปลา มะขามเปียกสับ ตามสัดส่วน (ในการทดลองใช้ 1% กรดอะซิติกแทนมะขามเปียกสับ) แล้วโขลกรวมกันให้เหนียว