

การยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบโดยใช้อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซินร่วมกับ  
กรดแลคติก

นางสาวพิมลพร ศรีราช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2553  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANTI-GRAM NEGATIVE BACTERIA USING NISIN-LACTIC ACID LOADED SOLID-LIPID  
NANOPARTICLES

Miss Pimonporn Sriraj

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University



พิมลพร ศรีราช : การยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบโดยใช้อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุ  
ไนซินร่วมกับกรดแลคติก (ANTI-GRAM NEGATIVE BACTERIA USING NISIN-  
LACTIC ACID LOADED SOLID-LIPID NANOPARTICLES) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
หลัก: ผศ.ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร.ณัฐพันธุ์ ศุภกา,  
116 หน้า.

การทดลองนี้เตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่บรรจุสารออกฤทธิ์ บรรจุไนซิน กรด  
แลคติก และไนซินร่วมกับกรดแลคติก ด้วยวิธีโฮโมจีไนเซชันความดันสูงแบบร้อน และวัดขนาด  
ด้วยเครื่องนาโนไฮเซอร์ พบว่าอนุภาคที่เตรียมได้มีขนาดเฉลี่ย  $52.27 \pm 0.43$ ,  $113.80 \pm 1.63$ ,  
 $528.53 \pm 7.19$  และ  $362.86 \pm 28.05$  นาโนเมตร ตามลำดับ (PDI < 0.5) และมีค่าความต่างศักย์  
ไฟฟ้าที่ผิวเฉลี่ยเท่ากับ  $-15.56 \pm 0.81$ ,  $-6.12 \pm 0.11$ ,  $-3.83 \pm 0.30$  และ  $-2.07 \pm 0.02$  มิลลิโวลต์  
ตามลำดับ อนุภากดังกล่าวมีลักษณะพื้นฐานวิทยาเป็นผลึกไขมัน พื้นผิวเรียบ รูปร่างคล้ายเกล็ด  
เลือดเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และประสิทธิภาพการบรรจุไนซิน และ  
กรดแลคติกในอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซิน และกรดแลคติก ที่เตรียมได้พบว่ามีค่า  
เท่ากับ ร้อยละ 66.20 และ 58.62 ตามลำดับ ส่วนอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซินร่วมกับ  
กรดแลคติกจะมีประสิทธิภาพในการบรรจุไนซินร้อยละ 65.86 และประสิทธิภาพในการบรรจุกรด  
แลคติกร้อยละ 59.57 และพบว่าความเป็นกรด-เบสและความเข้มข้นของเกลือต่ออนุภาคมีผลต่อ  
ขนาดและค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคทั้ง 4 ชนิด ส่วนไนซินและกรดแลคติกถูก  
ปลดปล่อยออกจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งประมาณวันที่ 30 ของการทดลอง นอกจากนี้ยัง  
พบว่าอนุภาคที่บรรจุไนซินและกรดแลคติกสามารถยับยั้ง *Listeria monocytogenes* DMST  
17303 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ได้ดีที่ 4 องศาเซลเซียส และการทดสอบในนม  
พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ประมาณ 3 ถึง 5 logCFU ต่อมิลลิลิตร และพบว่า ไขมันในนม  
จัดไม่มีผลต่อการทำงานของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อ.....  
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่อ..... ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
ปีการศึกษา.....2553.....ลายมือชื่อ..... ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

## 5172386623 : **MAJOR** INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

**KEYWORDS:** nisin / lactic acid / solid lipid nanoparticles

PIMONPORN SRIRAJ: ANTI-GRAM NEGATIVE BACTERIA USING NISIN-LACTIC ACID LOADED SOLID-LIPID NANOPARTICLES ADVISOR: ASST. PROF. SUPAT CHAREONPORNWATTANA, Ph.D., CO-ADVISOR: NUTTAPUN SUPAKA, Ph.D.,  
116 pp.

Unloaded, nisin, lactic acid and nisin-lactic acid loaded solid lipid nanoparticles (SLN) was prepared by hot high pressure homogenization. Dynamics light scattering (DLS) analysis showed particle sizes average were  $52.27 \pm 0.43$ ,  $113.80 \pm 1.63$ ,  $528.53 \pm 7.19$  and  $362.86 \pm 28.05$  nm (PDI < 0.5), respectively. and zeta potential average were  $-15.56 \pm 0.81$ ,  $-6.12 \pm 0.11$ ,  $-3.83 \pm 0.30$  and  $-2.07 \pm 0.02$  mV. The scanning electron micrographs demonstrated that platelet shape SLN with smooth surface was produced. The entrapment efficiency of nisin and lactic acid loaded SLNs were 66.20% and 58.62%, respectively. And nisin and lactic acid in nisin-lactic acid loaded SLN was 65.86% and 59.57%, respectively. The difference in pH and salt concentrations also affected size and zeta-potential averages of SLN. Nisin-lactic acid loaded SLN was initially tested for antimicrobial activity in PYG medium and found to confer inhibitory effect on the growth of both indicator strains, *Listeria monocytogenes* DMST 17303 and *Escherichia coli* ATCC 25922, at 4°C. Nisin-lactic acid loaded SLN was also tested in whole and skim milk. It was found that the presence of such a SLN could result in the reduction of 3–5 logCFU/ml in *L. monocytogenes* DMST 17303 or *E. coli* ATCC 25922 counts. And fat in whole milk not affected to SLNs.

Department: ..... Microbiology ..... Student's Signature.....  
Field of Study: ..... Industrial Microbiology ..... Advisor's Signature.....  
Academic Year: ..... 2010 ..... Co-advisor's Signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดีของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.ณัฐพันธุ์ ศุภกา อาจารย์ที่ปรึกษา ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อเสนอแนะต่าง ๆ ทุกขั้นตอน ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับ วิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธานีวัน รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพาณิชการ และ ดร. อิศรา สระมาลา ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการ และกรรมการสอบ วิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต ที่ให้ความสนับสนุนค่าวิจัยในการ ทดลองครั้งนี้

ขอขอบคุณนักวิจัย และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์นาโนเทคโนโลยีที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้และ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ช่วยเหลือและ เอื้ออำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอบคุณนางสาวหยกฤทัย กุลวัฒนศาล นางสาวดาริกา ลาสุดตา และนางสาวนิโรบล เหลากลม ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้อง 449 ทุกคน สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับงานวิจัย ขอขอบคุณสำหรับทุกความช่วยเหลือ และขอบคุณสำหรับทุกความห่วงใยและกำลังใจที่มีให้ตลอด มา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่ให้การสนับสนุนและ ความช่วยเหลือตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง .....	ฅ
สารบัญภาพ .....	ฉ
คำย่อและสัญลักษณ์.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ .....	1
2. วารสารปริทัศน์ .....	4
2.1 การถนอมอาหารและปัจจัยต่อการเจริญของจุลินทรีย์.....	4
2.2 แบคทีเรียโอซิน.....	9
2.3 ไนซิน.....	15
2.4 ข้อจำกัดการใช้ไนซิน.....	25
2.5 กรดแลคติก.....	30
2.6 อนุภาคนาโนไขมันชนิดแข็ง.....	37
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	43
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	43
3.2 เคมีภัณฑ์.....	45
3.3 เชื้อที่ใช้ทดสอบ.....	45
3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	46
4. ผลการทดลอง .....	53
4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง...	54
4.2 ทดสอบประสิทธิภาพการบรรจุไนซิน กรดแลคติก หรือไนซินร่วมกับกรด แลคติกด้วยอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง.....	56

4.3 ศึกษาผลของ pH ความเข้มข้นของเกลือ และอุณหภูมิต่อลักษณะทาง สัณฐานวิทยาและความคงตัว ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่บรรจุ สาร ไนซิน กรดแลคติก หรือไนซินร่วมกับกรดแลคติก.....	57
4.4 หาระยะเวลาที่ไนซินและกรดแลคติกออกจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง บรรจุไนซิน กรดแลคติก หรือไนซินร่วมกับกรดแลคติก.....	73
4.5 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของอนุภาคนาโนชนิดไขมัน แข็งที่บรรจุไนซิน กรดแลคติก หรือไนซินร่วมกับกรดแลคติกในอาหารเลี้ยง เชื้อ PYG.....	79
4.6 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของอนุภาคนาโนชนิดไขมัน แข็งที่บรรจุไนซิน กรดแลคติก หรือไนซินร่วมกับกรดแลคติกในนม UHT ชนิดจืดหรือนมพร้อมมันเนย.....	84
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	89
รายการอ้างอิง .....	93
ภาคผนวก .....	108
ภาคผนวก ก .....	109
ภาคผนวก ข .....	110
ภาคผนวก ค.....	112
ภาคผนวก ง.....	113
ภาคผนวก จ.....	114
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	116



## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอสลินและสารปฏิชีวนะ.....	10
2.2 ตัวอย่างแบคทีเรียโอสลินในกลุ่มต่าง ๆ.....	13
2.3 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้โอสลินเป็นสารถนอมอาหาร .....	24
2.4 ปริมาณการใช้โอสลินเป็นสารถนอมอาหารในประเทศต่างๆ.....	25
2.5 ตัวอย่างการเสริมฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของโอสลิน.....	29
3.1 ปริมาณสารที่ใช้เตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งเพื่อบรรจุ โอสลินกรด แลกติก หรือโอสลินร่วมกับกรดแลคติก.....	47
3.2 ปริมาณสารและความเข้มข้นสุดท้ายของสารที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุโอสลินร่วมกับกรดแลคติก....	52
4.1 ประสิทธิภาพการบรรจุโอสลิน กรดแลคติก และโอสลินและกรดแลคติกด้วยอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง.....	57
6.1 การคำนวณค่าต่างๆ.....	114

## สารบัญญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 ลำดับกรดอะมิโนของไนซิน A Z และ Q .....	17
2.2 กลไกของไนซินในการทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก.....	22
2.3 อนุภาคนาโนชนิดต่างๆ.....	35
2.4 ลักษณะการกระจายตัวของสารออกฤทธิ์ในอนุภาคนาโนชนิดไขมัน .....	38
3.1 เครื่องฮอมอจีไนเซอร์ความเร็วสูง และเครื่องฮอมอจีไนเซอร์ความดันสูง.....	46
3.2 เครื่องนาโนไซเซอร์.....	49
4.1 อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง ที่เตรียมได้จากเครื่องฮอมอจีไนเซอร์ความดันสูง.....	53
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคชนิดต่างๆ ที่ได้จากห้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	54
4.3 ขนาดเฉลี่ยและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนวิเคราะห์ด้วยเครื่องนาโนไซเซอร์.....	55
4.4 ขนาดเฉลี่ยและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคที่ไม่บรรจุสารออกฤทธิ์ บ่มที่ภาวะต่างๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส.....	59
4.5 ขนาดเฉลี่ยและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคที่ไม่บรรจุสารออกฤทธิ์ บ่มที่ภาวะต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง.....	60
4.6 ขนาดเฉลี่ยและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนซิน บ่มที่ภาวะต่างๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส.....	62
4.7 ขนาดเฉลี่ยและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนซิน บ่มที่ภาวะต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง.....	63
4.8 ขนาดเฉลี่ยและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคกรดแลคติก บ่มที่ภาวะต่างๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส.....	65
4.9 ขนาดเฉลี่ยและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคกรดแลคติก บ่มที่ภาวะต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง.....	66
4.10 ขนาดเฉลี่ยและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนซินร่วมกับกรดแลคติก บ่มที่ภาวะต่างๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส.....	68

รูปที่	หน้า
4.11 ขนาดเฉลี่ยและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนซินร่วมกับกรดแลคติก บ่มที่ ภาวะต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง .....	69
4.12 อนุภาคนาโนซินชนิดไขมันแข็งที่บรรจุโนซินร่วมกับกรดแลคติกบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ ในภาวะต่างๆ.....	71
4.13 อนุภาคนาโนซินชนิดไขมันแข็งที่บรรจุโนซินร่วมกับกรดแลคติกบ่มที่ อุณหภูมิห้อง ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ ในภาวะต่างๆ.....	72
4.14 ระยะเวลาที่โนซินและกรดแลคติกออกจากอนุภาคนาโนซินชนิดไขมันแข็งบรรจุสารออก ฤทธิ์เทียบกับสารออกฤทธิ์อิสระ ทดสอบกับ <i>L. monocytogenes</i> DMST 17303 ที่ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง .....	77
4.15 ระยะเวลาที่โนซินและกรดแลคติกออกจากอนุภาคนาโนซินชนิดไขมันแข็งบรรจุสารออก ฤทธิ์เทียบกับสารออกฤทธิ์อิสระ ทดสอบกับ <i>E. coli</i> ATCC 25922 ที่ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง .....	78
4.16 การยับยั้ง <i>L. monocytogenes</i> DMST 17303 ของอนุภาคนาโนซินชนิดไขมันแข็ง บรรจุสารออกฤทธิ์เทียบกับสารออกฤทธิ์อิสระ ที่ 4 องศาเซลเซียส และ ที่อุณหภูมิห้อง.....	82
4.17 การยับยั้ง <i>E. coli</i> ATCC 25922 ของอนุภาคนาโนซินชนิดไขมันแข็งบรรจุสารออกฤทธิ์ เทียบกับสารออกฤทธิ์อิสระ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง.....	83
4.18 การยับยั้ง <i>L. monocytogenes</i> DMST 17303 และ <i>E. coli</i> ATCC 25922 ของ อนุภาคนาโนซินชนิดไขมันแข็งบรรจุสารออกฤทธิ์เทียบกับสารออกฤทธิ์อิสระในนม UHT ชนิดจืด.....	87
4.19 การยับยั้ง <i>L. monocytogenes</i> DMST 17303 และ <i>E. coli</i> ATCC 25922 ของ อนุภาคนาโนซินชนิดไขมันแข็งบรรจุสารออกฤทธิ์เทียบกับสารออกฤทธิ์อิสระในนม UHT ชนิดพร้อมมันเนย.....	88
5.1 โครงสร้างโมเลกุลของไขมันแข็งชนิดอิมิวเตอร์ 900 หรือกลีเซอรอลโมโนสเตียเรต	90
6.1 กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร กับโนซินความเข้มข้น 0-1 กรัม ต่อลิตร.....	113
6.2 กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 258 นาโนเมตร กับกรดแลคติกความ เข้มข้น 0-1 กรัมต่อลิตร.....	113

**คำย่อและสัญลักษณ์**

มล.	=	มิลลิลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม
%	=	ร้อยละ
IU	=	International Unit
MIC	=	minimum inhibitory concentration
$a_w$	=	Water Activity

## บทที่ 1

### บทนำ

ความปลอดภัยของอาหารเป็นสิ่งที่ผู้บริโภคให้ความสำคัญอย่างมากเนื่องจากเกี่ยวข้องกับสุขภาพโดยตรง การเจ็บป่วยเนื่องจากจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเป็นพิษก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ ถึงแม้ว่าผลิตภัณฑ์อาหารจะผ่านกระบวนการแปรรูปอย่างถูกสุขลักษณะ แต่การปนเปื้อนของเชื้อโรคอาจเกิดขึ้นได้ระหว่างการขนส่งที่ไม่เหมาะสมการเก็บ รวมทั้งในระหว่างการวางจำหน่ายสินค้าในร้านค้า เพื่อให้อาหารมีความปลอดภัยมากขึ้น จึงได้มีการใช้วัตถุกันเสียชนิดต่างๆ เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุให้อาหารเน่าเสีย และเป็นการถนอมอาหาร ให้เก็บรักษาไว้ให้นาน โดยไม่ทำให้อาหารนั้นเกิดการเน่าเสีย และยังคงอยู่ในสภาพที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค การถนอมอาหาร เช่น การใส่วัตถุกันเสีย การใช้ความเย็น การใช้ความร้อน เป็นต้น (สุมนทนา วัฒนสินธุ์, 2545)

อย่างไรก็ตามปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญกับผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการบริโภควัตถุกันเสียสังเคราะห์หากใช้ในปริมาณที่มากเกินไป จะทำให้เกิดสารเคมีตกค้างซึ่งจะมีผลต่อผู้บริโภค จึงมีผู้พยายามคิดค้นวัตถุกันเสียจากธรรมชาติที่มีความปลอดภัยมากขึ้น เพื่อลดความเสี่ยงของผู้บริโภคในเรื่องผลข้างเคียงของสารต่อสุขภาพ ในขณะที่เดียวกันยังคงสามารถเชื่อมั่นในความปลอดภัยของอาหาร และผลิตภัณฑ์ก็ยังคงมีอายุการเก็บที่เหมาะสม ตัวอย่างวัตถุกันเสียจากธรรมชาติดังกล่าว ได้แก่ แบคทีเรียโอสลินซึ่งสร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์หลายชนิด (Aasen และคณะ, 2004) ซึ่งปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่ามีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารอย่างแพร่หลาย (Seppo และคณะ, 2004)

แบคทีเรียโอสลิน เป็นเพปไทด์ขนาดเล็กซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบางชนิดที่ก่อให้เกิดโรคและทำให้อาหารบูดเน่า เช่น *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* ปกติแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอสลินจะมีภูมิคุ้มกันต่อแบคทีเรียโอสลินที่สร้างขึ้นมา ดังนั้นจึงทำให้ไม่ถูกยับยั้งจากแบคทีเรียโอสลินที่สร้างขึ้นมา ซึ่งการสร้างแบคทีเรียโอสลินของแบคทีเรียดังกล่าวนี้ เกิดจากการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่มีเชื้อหลายชนิดที่เจริญอยู่ร่วมกัน ทำให้เชื้อที่สร้างแบคทีเรียโอสลินสามารถแย่งอาหารและพื้นที่เพื่อใช้ในการเจริญ ส่วนเชื้อชนิดอื่นที่ไม่สามารถสร้างแบคทีเรียโอสลินได้ก็จะตายลงในที่สุด แบคทีเรียโอสลินจัดเป็นสารชีวภาพที่มีความแตกต่างจากยาปฏิชีวนะ โดยแบคทีเรีย

ไอซินจะทำให้เกิดรูที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดการเสียสมดุลขององค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย แบคทีเรียไอซินถูกสร้างจากแบคทีเรียหลายชนิดแต่ที่ได้รับความนิยมมากที่สุดคือ กลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัยและใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอาหารมานาน

ไนซิน เป็นแบคทีเรียไอซินชนิดหนึ่งสร้างจาก *Lactococcus lactis* sp. *lactis* จะมีผลทำลายแบคทีเรียที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียชนิดที่สร้างมันขึ้นมา ไม่สามารถสังเคราะห์ทางเคมีได้ โครงสร้างของไนซินมีส่วนประกอบของแลนโทไอนีน จึงจัดไนซินอยู่ในกลุ่มแลนโทไอบิโอดีค และประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่พบในธรรมชาติ ได้แก่ แลนโทไอนีน (Lanthionine), บีตาเมธิลแลนโทไอนีน ( $\beta$ -methyl-lanthionine), ดีไฮโดรบริวไทรีน (dehydrobutyrine; Dhb) และดีไฮโดรอะลานีน (dehydroalanine; Dha) (Hoover และ Steenson, 1993) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* และ *Listeria* species (Brewer และคณะ, 2002) ไนซินจะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้กว้างเมื่อเทียบกับแบคทีเรียไอซินชนิดอื่นๆ แต่ยังมีขอบเขตที่แคบกว่าเมื่อเทียบกับสารปฏิชีวนะ โดยไนซินจะจับกับลิพิด II ที่อยู่ในบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย โดยให้ปลายอะมิโน จากนั้นจะส่งผ่านปลายทางด้านคาร์บอกซีเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดรูขึ้น ของเหลวภายในเซลล์จะเกิดการรั่วไหลออกมา เป็นสาเหตุทำให้เซลล์ตาย แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และเชื้อรา อย่างไรก็ตาม ขอบเขตของการทำลายเชื้อต่อแบคทีเรีย แกรมลบอาจเพิ่มขึ้นได้เมื่อใช้ในซินร่วมกับสารคีเลตและสารปฏิชีวนะธรรมชาติ โดยสารคีเลต ได้แก่ โซเดียมพอลิฟอสเฟต และ EDTA เป็นต้น ซึ่งสารคีเลตจะมีผลต่อเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบ โดยนำ  $Ca^{2+}$  และ  $Mg^{2+}$  cation ออกจากไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Gill และคณะ, 2003) ส่วนสารปฏิชีวนะตามธรรมชาติ ได้แก่ กรดแลคติก เพดิไอซิน โมโนลอริน คาร์วาคอรอล ยูจีนอล ไทมอล ซินนามอน ไลโซไซม์ และแลคโทเฟอร์ริน มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบโดยสารปฏิชีวนะตามธรรมชาติแต่ละชนิดจะมีผลในการยับยั้งแตกต่างกัน ในปัจจุบันไนซินได้รับการยอมรับในด้านความปลอดภัยจาก FDA และ FAO/WHO และมีแนวโน้มสำหรับการนำไปพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารด้วยวิธีการทางชีวภาพ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งนอกเหนือจากการใช้สารเคมี (McEntire และคณะ, 2003)

กรดแลคติก เป็นกรดที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) เช่น *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* และ *Leuconostoc* ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโทสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติก ซึ่งกรดแลคติกนี้ยังมีผลในการยับยั้งการเจริญ และทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียรวมทั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรค จึงมีความสนใจในการนำกรดแลคติกมาใช้เป็นสารกันบูดในอาหาร ซึ่งกรดแลคติกสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ เช่น

*Escherichia coli* (Cutter และคณะ, 2001) และ *Salmonella* spp. (Eswaranandam และคณะ, 2004) กรดแลคติกจะทำลายเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งกรดแลคติกมีสมบัติเป็นกรด เมื่ออยู่ข้างนอกเซลล์แบคทีเรียจะไม่แตกตัวเป็นไอออน แต่เมื่อเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแกรมลบแล้วทำให้เซลล์มีสภาพเป็นกรดจะมีการแตกตัวเป็นไอออนและกำจัดไฮโดรเนียมไอออนภายในเซลล์ ทำให้ชั้นของเพปติโดไกลแคนไม่เสถียร ส่งผลให้เยื่อหุ้มชั้นนอกไม่เสถียร จากนั้นไนซินจะเข้าบริเวณเป้าหมายของแบคทีเรียแกรมลบต่อ (Nykanen และคณะ, 1998) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ไนซินยังมีข้อจำกัดหลายประการ ได้แก่ ไนซินจะมีความเสถียรและสามารถละลายน้ำได้ดีที่ pH ต่ำ และเอนไซม์ต่างๆ ในอาหาร เช่น โปรตีเอส สามารถย่อยสลาย ไนซินได้ โดยเฉพาะอาหารที่ไม่ได้ผ่านความร้อน (Inga และคณะ, 2003)

เทคโนโลยีการประดิษฐ์อนุภาคนาโนนั้นสามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับความเหมาะสมในการนำไปใช้งานจึงทำให้เกิดอนุภาคนาโนหลายรูปแบบขึ้น เช่น นาโนอิมัลชัน ไลโปโซม ไนโอโซม สารแขวนลอยอนุภาคนาโน และอนุภาคชนิดนาโนชีวภาพ เป็นต้น (Benech และคณะ, 2002) ในการใช้ไนซินเป็นสารถนอมอาหารจึงควรคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้บริโภคเป็นหลัก จึงเกิดแนวคิดที่จะนำไนซิน บรรจุลงในอนุภาคนาโนที่ทำมาจากไขมันแข็ง (solid lipid nanoparticle) ซึ่งไขมันแข็งที่นำมาใช้นั้นมีข้อดีหลายประการ เช่น ปลอดภัยต่อผู้บริโภคเนื่องจากไม่ใช้สารละลายอินทรีย์ในอนุภาค สามารถบริโภคได้ มีความคงตัวของอนุภาคสูง สามารถบรรจุสารเสริมฤทธิ์ได้ในปริมาณมาก วิธีการเตรียมไม่ได้ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ และการขยายส่วนการผลิตทำได้ง่าย (Wolfgang และคณะ, 2001) ขณะที่วิธีนาโนอิมัลชัน ไลโปโซม ไนโอโซม และสารแขวนลอยอนุภาคนาโน ไม่เหมาะสมในการนำไนซินและกรดแลคติกไปใช้งาน เนื่องจากใช้สารละลายอินทรีย์ในอนุภาคซึ่งจะเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค และวิธีการเตรียมที่ค่อนข้างซับซ้อน (Salmaso และคณะ, 2004)

พินิจพล พรหมบุตร (2550) ศึกษาการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซินพบว่าการใช้การใช้ความดันของเครื่องวิธีฮอโมจีไนเซอร์ที่ 1500 บาร์ 3 รอบ อนุภาคที่ได้มีขนาดเล็ก และมีการกระจายตัวดี และการใช้ไนซินร้อยละ 5 สามารถยับยั้ง *Listeria monocytogenes* DMST 2871 และ *Lactobacillus platarum* TISTR 850 ได้นาน 20 วัน

หยกฤทัย กุลวัฒน์ศาล (2551) ศึกษาการทำงานของไนซินร่วมกับเซทิลไพรดิเนียมคลอไรด์ โดยบรรจุลงในอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง พบว่า สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 และ *E. coli* ATCC 25922 ได้ดีที่สุดในที่ 4 องศาเซลเซียส

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาการทำงานของกรดแลคติกร่วมกับไนซิน เพื่อยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบร่วมกับนาโนเทคโนโลยี มาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มความเสถียรของไนซินและกรด

แลคติก และป้องกันการสูญเสียแอกทิวิตีชีวภาพของไนซินและกรดแลคติกจากการทำปฏิกิริยาจากองค์ประกอบต่างๆ ในอาหาร และควบคุมให้มีการปลดปล่อยออกจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งได้อย่างต่อเนื่อง โดยคาดว่าจะทำให้แอกทิวิตีทางชีวภาพของไนซินและกรด แลคติกคงอยู่ได้นานในอาหารเลี้ยงเชื้อและในนม UHT



## บทที่ 2

### วารสารปริทัศน์

#### 2.1 การถนอมอาหาร

##### 2.1.1 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของจุลินทรีย์

ปัจจัยที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญเพื่อเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ 1. ปัจจัยภายในที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยตรง (intrinsic factors) 2. ปัจจัยภายนอกอันเป็นผลมาจากสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ (extrinsic factors) ซึ่งปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอกมีอิทธิพลต่อการเจริญและการควบคุม

##### 1. ปัจจัยภายในที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยตรง

ปัจจัยภายในเป็นปัจจัยที่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยตรง ได้แก่ สารอาหาร ความชื้น ความเป็นกรด-เบสของอาหาร สารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และโครงสร้างของอาหารตามธรรมชาติที่เป็นอุปสรรคในการเจริญของจุลินทรีย์

1.1 สารอาหาร เช่น ธาตุคาร์บอน ธาตุไนโตรเจน วิตามิน น้ำ

1.2 ความชื้นของอาหาร

เป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการ  $a_w$  ในการเจริญเติบโตต่างกัน โดยแบคทีเรียต้องการ  $a_w$  ในการเจริญเติบโตสูงกว่าราและยีสต์ แม้แต่ในกลุ่มแบคทีเรียด้วยกัน ก็ยังต้องการ  $a_w$  ในการเจริญเติบโตต่างกัน คือ แบคทีเรียแกรมลบต้องการ  $a_w$  สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียส่วนมากจะไม่เจริญถ้า  $a_w$  ต่ำกว่า 0.91 ในขณะที่เชื้อราซึ่งทำให้อาหารเน่าเสียสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีค่า  $a_w$  เพียง 0.80 (Jay, 1996)

1.3 pH ของอาหาร

ตามปกติอาหารที่มี pH เป็นกลาง (ประมาณ 6.6 – 7.5) จุลินทรีย์มักจะเจริญได้ดี ซึ่ง pH ของสิ่งแวดล้อมมีผลต่อแอกติวิตีและความคงตัวของสารประกอบโมเลกุลใหญ่ เช่น เอนไซม์ การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต้องอาศัยแอกติวิตีของเอนไซม์ในการย่อยและการดูดซึมสารอาหาร เพื่อผลิตพลังงาน

## 2. ปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยตรง

ปัจจัยภายนอก หมายถึง ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลทางอ้อมต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ คือ อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ในการเก็บอาหาร และการเก็บรักษาอาหารในสภาวะดัดแปลงบรรยากาศ

### 2.1 อุณหภูมิในการเก็บรักษาอาหาร

มีความสำคัญเจริญเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ คือ จุลินทรีย์ต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเพิ่มจำนวน ทำให้แบ่งจุลินทรีย์ออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrophile) กลุ่มที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำและอุณหภูมิปานกลาง (Psychrotrophs) กลุ่มที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (Mesophiles) และกลุ่มที่ชอบอุณหภูมิสูง (Thermophiles) สำหรับยีสต์และราเจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง คือ 25 องศาเซลเซียส

### 2.2 ความชื้นสัมพัทธ์ในการเก็บรักษาอาหาร

ความชื้นในบรรยากาศครอบคลุมของความชื้นในอาหารเพราะความชื้นในบรรยากาศมีค่าเป็น 100 เท่า ของค่า  $a_w$  ดังนั้นถ้าทราบค่า  $a_w$  หรือค่าความชื้นในบรรยากาศค่าใดค่าหนึ่ง ถ้านำอาหารไปอบเพื่อไล่อากาศทำให้ค่า  $a_w$  ของอาหารเปลี่ยนแปลง หลักการนี้เน้นว่ามีประโยชน์ในการประยุกต์มาใช้พัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารโดยเติมสารที่มีสมบัติในการดูดความชื้นไว้ เป็นผลให้ค่า  $a_w$  ของผลิตภัณฑ์อาหารลดลง เช่น เกลือ น้ำตาล กลีเซอรอล กัม เป็นต้น เป็นการปรับค่า  $a_w$  ของอาหารให้ต่ำกว่าค่า  $a_w$  ต่ำสุดที่แบคทีเรียต้องการในการเจริญเติบโต

### 2.3 การเก็บอาหารโดยการการดัดแปลงบรรยากาศ

ปัจจัยที่เกี่ยวกับการถ่ายเทอิเล็กตรอนของอาหาร ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ต้องการและไม่ต้องการอากาศ ซึ่งในอากาศมีออกซิเจนอยู่ประมาณร้อยละ 21 เมื่อสลายตัวทำให้เกิดความต่างศักย์ หรือมีการให้-รับอิเล็กตรอนเกิดขึ้น ดังนั้นจึงมีการจำกัดออกซิเจนในการเก็บรักษาอาหาร โดยการดูดออกซิเจนออกไปแล้วควบคุมภาวะสุญญากาศโดยใช้ผลิตภัณฑ์ที่จำกัดที่จำกัดการซึมผ่านของออกซิเจน หรือเติมก๊าซอื่นแทน เช่น แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ( $CO_2$ ) และแก๊สไนโตรเจน ( $N_2$ ) เรียกว่าการเก็บรักษาแบบควบคุมบรรยากาศ เช่น การใช้  $CO_2$  บรรจุในเครื่องดื่ม น้ำผลไม้ น้ำอัดลม เบียร์และน้ำโซดา (นวพร ล้ำเลิศกุล, 2549)

## 2.1.2 หลักการถนอมอาหาร

ค.ศ. 1810 Nicolas Appert พ่อค้าชาวฝรั่งเศสสามารถเก็บน้ำต้มเนื้อไว้ในขวดแก้วที่ไล่อากาศออก เขาอธิบายว่า อากาศเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้อาหารเสีย เขาเชื่อว่าการเก็บรักษา น้ำต้มเนื้อไว้ได้เป็นเพราะเขาต้มน้ำในภาชนะไร้อากาศแนวคิดเกี่ยวกับทฤษฎีการสันดาปนี้เป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางในยุโรปสมัยนั้น ต่อมา Louis Pasteur นักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศสได้ค้นพบจุลินทรีย์ และสามารถนำมาอธิบายปัจจัยที่ทำให้อาหารเสียได้ว่าไม่ได้เกิดจากอากาศแต่เป็นจุลินทรีย์จากนั้น ความเชื่อในเรื่องทฤษฎีการสันดาปจึงเปลี่ยนไป เทคนิคการถนอมอาหารที่มีการทำลาย ยับยั้ง และป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ประกอบด้วย วิธีการ ดังนี้

### 1. การใช้ความร้อน

ความร้อนจำแนกออกตามระดับของการใช้เพื่อฆ่าจุลินทรีย์เป็น 2 เทคนิค คือ Pasteur และ Appert ดังนี้

#### 1.1 พาสเจอร์ไรเซชัน (Pasteurization)

เป็นการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิระหว่าง 60-80 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นระยะเวลาหนึ่ง การถนอมอาหารเทคนิคนี้จำแนกออกเป็น 2 วัตถุประสงค์ คือ

1. ใช้เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ในผลิตภัณฑ์อาหารอาจมีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค เพราะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษขึ้น ความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรเซชันนี้ออกแบบมาเพื่อมุ่งทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคซึ่งไม่สร้างสปอร์ในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีความเสี่ยงสูง เช่น นมสด ไข่เหลว ส่วนผสมไอศกรีม และอาหารที่ต้องการความปลอดภัยจากการพาสเจอร์ไรซ์

2. ใช้เพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสีย ในอาหารอาจมีจุลินทรีย์อยู่เป็นจำนวนมาก จุลินทรีย์เหล่านี้ทำให้อาหารเสีย การใช้ความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรซ์เพื่อทำลายจุลินทรีย์จำนวนหนึ่งหรือทำให้จุลินทรีย์บาดเจ็บ มีผลให้มีจุลินทรีย์ลดลงหรือไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ อาหารที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์จึงสามารถเก็บไว้ได้นานกว่าอาหารที่ไม่ได้ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ เช่น นมสด โดยทั่วไปความร้อนไม่สูงมากเหมือนกับความร้อนที่ใช้ในข้อ 1 ดังนั้นอาหารที่เหมาะสมกับกรรมวิธีนี้จึงได้แก่ อาหารที่เป็นกรด เช่น เบียร์ น้ำผลไม้ อาหารหมักดอง และซอสต่างๆ เนื่องจากความเป็นกรดของอาหารจะช่วยควบคุมจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่รอดชีวิตจากความร้อนที่ใช้ในการพาสเจอร์ไรซ์อีกทางหนึ่ง

## 1.2 แอปเพอไทเซชัน (Appertization)

เป็นกระบวนการใช้ความร้อนเพื่อมุ่งทำลายจุลินทรีย์ทุกชนิด ไม่ให้เจริญในขณะเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารไว้ในภาวะปกติ ดังนั้นอาหารที่ผ่านกระบวนการนี้จึงสามารถเก็บรักษาในอุณหภูมิห้องได้ กระบวนการใช้ความร้อนในการถนอมอาหารที่มีความปลอดภัย มีหลักการทำงานว่า จะต้องเข้าถึงภาวะปลอดเชื้อเชิงการค้า โดยการทำลายแบคทีเรียที่มีอันตรายถึงแก่ชีวิต ซึ่งเจริญได้ในภาวะไร้อากาศ เช่น *Clostridium botulinum*

## 2. การอาบรังสี (Irradiation)

การแผ่รังสีจากแม่เหล็กไฟฟ้าที่ความยาวคลื่นและความถี่ต่างๆ ทำให้เกิดพลังงานสามารถนำมาใช้ในการถนอมอาหารได้ รังสีที่ใช้ถนอมอาหารประกอบด้วย

2.1. **รังสีไมโครเวฟ (Microwave radiation)** ช่วงความถี่ของรังสีไมโครเวฟอยู่ระหว่าง  $10^9$  ถึง  $10^{12}$  เฮิรตซ์ (Hz) แต่คลื่นความถี่ที่นำมาใช้ถนอมอาหารมีอยู่ 2 ช่วง คือ ช่วงระหว่าง 2450 เมกะเฮิรตซ์และ 915 เมกะเฮิรตซ์ คลื่นไมโครเวฟทำให้เกิดความร้อนซึ่งเป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ โดยอาศัยน้ำในอาหารเมื่ออยู่ในสนามไมโครเวฟ โมเลกุลของน้ำจะแสดงความเป็นขั้วขึ้นสองตำแหน่งเป็นผลให้โมเลกุลของน้ำเกิดการสั่นสะเทือน พลังงานจลน์ที่เกิดขึ้นจากการสั่นสะเทือนจะส่งต่อไปยังโมเลกุลใกล้เคียงทำให้เกิดความร้อนขึ้น

2.2. **รังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV radiation)** รังสี UV มีความยาวคลื่นต่ำกว่า 450 นาโนเมตร (ประมาณ  $10^{15}$  เฮิรตซ์) ซึ่งจะทำลายโครโมโซมของจุลินทรีย์ รังสี UV มีอำนาจในการทะลุทะลวงต่ำจึงไม่มีประโยชน์ในการนำมาใช้ในการถนอมอาหาร เนื่องจากรังสี UV จะถูกตัวกลางที่รังสีผ่านดูดไว้ เช่น รังสี UV ที่ผ่านน้ำใสๆ ที่ลึกเพียง 5 เซนติเมตร

2.3. **รังสีที่แตกตัวได้ (Ionizing radiation)** เป็นรังสีที่มีช่วงความถี่สูงกว่า  $10^{18}$  เฮิรตซ์ มีพลังงานสูงจนสามารถปลดปล่อยอิเล็กตรอนอิสระออกจากโมเลกุลได้ การนำรังสีประเภทนี้มาใช้จำแนก ออกเป็น 3 ชนิด คือ

1. อิเล็กตรอนพลังงานสูง อำนาจทะลุทะลวงของอนุภาคบีตาต่ำกว่ารังสีที่แตกตัวได้อื่นๆ จึงมีข้อจำกัดในการนำมาใช้กับการถนอมอาหาร

2. รังสีเอกซ์ รังสีเอกซ์มีอำนาจทะลุทะลวงสูงกว่าอนุภาคบีตาแต่ไม่สามารถผ่านแผ่นตะกั่วได้ นิยมใช้ในทางการแพทย์มากกว่าจะนำมาใช้ในการถนอมอาหาร

3. รังสีแกมมา ได้จากการสลายตัวของสารกัมมันตรังสี โดยเฉพาะโคบอลต์ 60 และซีเซียม 137 รังสีแกมมาถูกนำมาใช้ในการถนอมอาหารซึ่งการใช้รังสีสามารถควบคุมจุลินทรีย์ได้

มากกว่าการใช้ความร้อน เนื่องจากรังสีสามารถแทรกเข้าไปในเนื้ออาหารของอาหารได้ดีและสม่ำเสมอกว่าโดยที่ผลิตภัณฑ์อาหารยังมีความสด (สุมาลี เหลืองสกุล, 2541)

### 3. การใช้อุณหภูมิต่ำในการเก็บรักษาอาหาร

การเก็บแบบแช่เย็น อาหารแช่เย็นเป็นอาหารเก็บที่อุณหภูมิเหนือจุดเยือกแข็ง โดยทั่วไปนิยมเก็บอาหารหลายชนิดไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 0 ถึง 5 องศาเซลเซียส

แม้ว่าแบคทีเรียจำพวกไซคาโทรปเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ แต่การเจริญก็ยังเป็นไปอย่างช้าๆ การเน่าเสียจึงเกิดขึ้นช้าๆ อุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาอาหารและปัจจัยอื่นๆ เช่น ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์เริ่มต้น สามารถนำมาคำนวณเพื่อประเมินอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์อาหารได้ จุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำเนื่องจากองค์ประกอบของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนมากประกอบด้วยกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวและกรดไขมันโมเลกุลสั้น ซึ่งกรดไขมันเหล่านั้นมีจุดหลอมเหลวต่ำเป็นผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ทำงานได้และยอมให้สารอาหารและเอนไซม์บางชนิดผ่านเข้าสู่เซลล์ ทำให้แบคทีเรียที่เจริญในอุณหภูมิต่ำเจริญได้

### 4. การใช้สารเคมี

แม้ว่าสารเคมีในอาหารจะทำให้ปนเปื้อน แต่สารเคมีก็ยังมีผลต่อกรรมวิธีการผลิตอาหารบางอย่าง เช่น การใช้เพื่อปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัส กลิ่น-รส คุณค่าทางโภชนาการและสีของอาหาร เป็นต้น

วัตถุกันเสีย (preservative) คือ เป็นสารที่ยับยั้ง ชะลอ หรือหยุดยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หรือป้องกันการเน่าเสียของอาหารสืบเนื่องมาจากจุลินทรีย์ในอาหารหรือสารที่ใช้เพื่อป้องกันการเสียของอาหาร ทั้งนี้ไม่รวมสารที่ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีที่นำไปสู่การจำกัดอายุการเก็บรักษา เช่น กันเหิน และป้องกันการเปลี่ยนแปลงสี เป็นต้น วัตถุกันเสียอาจเป็นสารที่มีผลทำลายจุลินทรีย์และมีผลป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ไม่ให้เกิดจำนวนขึ้นก็ได้ ผลการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์โดยส่วนใหญ่จะขึ้นอยู่กับปริมาณที่ใช้ ถ้าใช้ในปริมาณสูงจุลินทรีย์จะถูกทำลายมาก แต่การใช้กับอาหารมักจะถูกจำกัดปริมาณที่ค่อนข้างต่ำ จึงมีผลเพียงควบคุมไม่ให้จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนมากขึ้น ด้วยเหตุผลนี้สารเคมีที่ใช้เป็นวัตถุกันเสีย จึงมีประโยชน์ในแง่ของการควบคุมอาหารที่มีปนเปื้อนจุลินทรีย์ไม่สูงมากนัก ดังนั้นจึงนำสารกันเสียตามธรรมชาติมาใช้ เช่น น้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ และระบบเอนไซม์แลคโทเพอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) ได้รับความสนใจที่จะนำมาใช้แทนวัตถุกันเสียกันมากขึ้น รวมทั้งการใช้แบคทีเรียแลคติกในการหมัก ทำให้เกิดสารยับยั้งที่เรียกว่าแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

## 2.2 แบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียโอซิน (bacteriocin) เป็นสายเพปไทด์ขนาดเล็กซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบบางชนิดที่ก่อให้เกิดโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *B. cereus*, *C. botulinum*, *L. monocytogenes* และ *S. aureus* ปกติแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซินจะมีภูมิคุ้มกันต่อแบคทีเรียโอซินที่สร้างออกมา ดังนั้นจึงทำให้ไม่ถูกยับยั้งจากแบคทีเรียโอซินที่สร้างขึ้นมา การสร้างแบคทีเรียโอซิน ของแบคทีเรียเกิดจากการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่มีเชื้อหลายชนิดเจริญอยู่ร่วมกัน ทำให้เชื้อที่สร้างแบคทีเรียโอซินสามารถแย่งอาหาร และพื้นที่เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ส่วนเชื้อชนิดอื่นที่ไม่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้ก็จะตายลงในที่สุด แบคทีเรียโอซินจัดเป็นสารชีวภาพที่มีความแตกต่างจากยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ดังตารางที่ 2.1 ซึ่งแบคทีเรียโอซินจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งกว้างกว่ายาปฏิชีวนะ ซึ่งแบคทีเรียโอซินถูกสร้างจากแบคทีเรียหลายชนิด แต่ที่ได้รับการศึกษากันมากคือในแบคทีเรียกรดแลคติก เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัย และใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอาหารเป็นเวลานาน ในปัจจุบันแบคทีเรียโอซินได้รับการยอมรับในด้านความปลอดภัยจาก FDA และ FAO/WHO โดยถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารชนิดต่างๆ

**ตารางที่ 2.1** การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอสลินและสารปฏิชีวนะ (Cleveland และคณะ, 2001)

ลักษณะและสมบัติ	แบคทีเรียโอสลิน	สารปฏิชีวนะ
การนำไปใช้งาน	ทางอาหาร	ทางการแพทย์
กระบวนการสังเคราะห์	ผลิตจากไรโบโซม	เป็นเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ
ฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย	กว้าง	แคบ
ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมาย	น้อย	มาก
การสร้างระบบภูมิคุ้มกันตนเองของเซลล์ผู้ผลิต	มี	ไม่มี
กลไกในการต่อต้านของเซลล์เป้าหมาย	โดยปรับสภาพองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์	โดยการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม
ลักษณะของปฏิกริยาบนเซลล์เป้าหมาย	ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์หรือโครงสร้างภายในเซลล์
ความเป็นพิษหรือผลข้างเคียง	ยังไม่มีรายงาน	มี

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียโอสลินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบจะมีโมเลกุลขนาดใหญ่และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้น้อยกว่าที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวก (Jack และคณะ, 1995) โดยแบคทีเรียโอสลินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบได้มีการศึกษากันในด้านต่างๆ ได้แก่ โครงสร้างของโปรตีน แอ็กทิวิตีในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมาย กระบวนการสังเคราะห์ภายในเซลล์ที่ผลิต กลไกการเข้าทำลายและตำแหน่งของการเข้าทำลายเซลล์เป้าหมาย รวมถึงระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เป้าหมาย ตัวอย่างเช่น colicins ซึ่งผลิตโดย *E. coli* และมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae ชนิดอื่นๆ หรือ microcins ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae และมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบชนิดต่างๆ ส่วนแบคทีเรียโอสลินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมบวก พบว่ามีสมบัติที่น่าสนใจกว่าที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมลบ คือ มีสมบัติในการทำลายแบคทีเรียที่แตกต่างกันได้หลายชนิด รวมทั้งเซลล์เป้าหมายจะมีการต้านทานน้อย และไม่ต้องการตำแหน่งเฉพาะเจาะจงบนเซลล์เป้าหมายเพื่อการเข้าทำลาย นอกจากนี้การควบคุมการผลิตภายในเซลล์ถูกควบคุมได้ทั้งจากพลาสมิดและโครโมโซมโดยในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก พบว่า

แบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญในการสร้างสาร ซึ่งมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ได้หลายชนิดโดยแบคทีเรียโอสิน ซึ่งพบว่าสารดังกล่าวเป็นสารเพปไทด์หรือโปรตีนขนาดเล็ก และในบางครั้งอาจพบกรดอะมิโนที่ไม่ค่อยพบในโปรตีนปกติทั่วไป เช่น ดีไฮโดรอะลานีน ดีไฮโดรพิวเทอริน ที่พบในโนซิน โดยแบคทีเรียโอสินแต่ละชนิดจะมีจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนภายในโมเลกุลที่แตกต่างกัน และสามารถถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteolytic enzymes) (Kleinkauf และ Von Dohrem, 1987) ชนิดของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอสิน ได้แก่ *Acetobacter*, *Actinobacillus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Clostridium* เป็นต้นโดย (Montville และ Kaiser, 1993)

### 2.2.1 การจำแนกประเภทของแบคทีเรียโอสิน

แบคทีเรียโอสินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก โดยทั่วไปมีสมบัติเป็นโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic molecule) และมีประจุบวก ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 20-60 หมู่ โดยสามารถแบ่งชนิดของแบคทีเรียโอสินตามน้ำหนักโมเลกุล และโครงสร้างทางกายภาพ และทางเคมี (ตารางที่ 2) ได้เป็น 3 กลุ่ม (Chen และ Hoover, 2003) ได้แก่

#### 1. แลนติไบโอติก (Lantibiotics)

แบคทีเรียโอสินกลุ่มนี้เป็นสายเพปไทด์สายสั้นๆ ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 19-50 หมู่มีมวลโมเลกุลต่ำกว่า 5 กิโลดัลตัน ทนความร้อน และมีกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงเป็นองค์ประกอบหลายชนิด เช่น แลนไทโอนีน (lanthionine) บีตาเมทิลแลนไทโอนีน ( $\beta$ -methyl-lanthionine) ดีไฮโดรพิวเทอริน (dehydrobutyrine; Dhb) และดีไฮโดรอะลานีน (dehydroalanine; Dha) ดังนั้นแบคทีเรียโอสิน กลุ่มนี้จึงต้องมีกระบวนการดัดแปลงหลังการแปลรหัสเพื่อให้ได้กรดอะมิโนที่สามารถใช้งานได้ ปฏิกิริยาเคมีของการดัดแปลงนี้เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาขจัดน้ำ (dehydration) ที่ปลายเซรีน และธรีโอนีน ได้เป็น Dha และ Dhb ตามลำดับ หลังจากนั้นหมู่ซัลไฟไฮดริล (sulfhydryl) ของปลายซิสเตอีน จะเกิดปฏิกิริยากับ Dha และ Dhb สร้างเป็นสะพานซัลไฟด์ของแลนไทโอนีน (Ala-s-Ala) หรือวงแหวนเมทิลแลนไทโอนีน (Ala-s-Aba) นอกจากนี้เมื่อมีการขนส่งแบคทีเรียโอสินชนิดนี้ด้วยวิธี ABC transport system ออกจากเซลล์จะมีการกำจัดเพปไทด์สายนำด้วยโปรตีเอส

แบคทีเรียโอสินชนิดต่างๆ ในกลุ่มแลนติไบโอติกยังมีความแตกต่างทางโครงสร้างทางกายภาพและกลไกในการยับยั้งทำให้แยกแลนติไบโอติกได้อีกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

1.1 แลนติไบโอติกที่มีโครงสร้างสายเพปไทด์เป็นเส้นตรงบิดเป็นเกลียว มีสมบัติไม่ชอบน้ำ และมีประจุบวก แลนติไบโอติกในกลุ่มนี้ที่ถูกค้นพบเป็นครั้งแรก คือโนซิน (nisin) ซึ่งปัจจุบันมี



ความสำคัญในแง่ของการเป็นสารถนอมในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากมีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียค่อนข้างกว้างขวาง

1.2 แลนติไบโอติกที่มีโครงสร้างสายเพปไทด์เป็นรูปร่างกลม (globular) ไม่มีประจุหรือมีประจุลบ และมีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียค่อนข้างกว้างทำให้เป็นที่สนใจและในอนาคตอาจเป็นสารต้านจุลชีพที่เป็นจุดเด่นของแบคทีเรียแลคติกที่สำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร

## 2. แบคทีเรียโอซินที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและทนต่อความร้อน

แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้เป็นสายเพปไทด์ที่ไม่มีการดัดแปลง มีมวลโมเลกุลต่ำกว่า 10 กิโลดัลตัน และทนความร้อนได้ 60-100 องศาเซลเซียส มากกว่า 30 นาที แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้สามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อยคือ

2.1 กลุ่มแบคทีเรียโอซินที่มีลักษณะคล้ายเพปไทด์เพดิโอซิน (pediocin-like peptide)

2.2 กลุ่มแบคทีเรียโอซินที่ประกอบด้วยเพปไทด์ที่แตกต่างกัน 2 ส่วน (two peptide bacteriocins) ซึ่งแบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้จะทำงานได้ก็ต่อเมื่อเพปไทด์ทั้ง 2 ส่วนนี้ทำงานร่วมกัน

2.3 กลุ่มแบคทีเรียโอซินที่ต้องการโปรตีน sec ในการส่งแบคทีเรียโอซินชนิดนี้ออกนอกเซลล์ แบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซิน (sec dependent secreted bacteriocin)

นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียโอซินใหม่อีก 2 กลุ่มที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและทนต่อความร้อน กลุ่มแรกเป็นแบคทีเรียโอซินที่ประกอบด้วยซิสเตอีนหนึ่งหรือสองชิ้นส่วน คือ ไธออลไบโอติก (thiolbionics) และซิสตีไบโอติก (cystibionics) ตามลำดับ แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ ได้แก่ แลคโตคอคซิน เอ (lactococcin A) และอีกกลุ่มคือแบคทีเรียโอซินที่ไม่มีส่วนประกอบของซิสเตอีน ได้แก่ แลคโตคอคซิน บี (lactococcin B) (Oscariz และ Pisabarro, 2001)

## 3. แบคทีเรียโอซินที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่แต่ไม่ทนต่อความร้อน

แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่มีมวลโมเลกุลมากกว่า 30 กิโลดัลตัน สูญเสียประสิทธิภาพการทำงานเมื่อถูกความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือมากกว่านั้น โดยแบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้ทั้งหมดจะผลิตจาก *Lactobacillus* sp.

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างแบคทีเรียโชนินในกลุ่มต่าง ๆ (Chen และ Hoover, 2003)

แบคทีเรียโชนิน	จุลินทรีย์ที่สร้าง	เอกสารอ้างอิง
<b>กลุ่ม 1 แลนติไบโอติก</b>		
กลุ่ม 1.1		
โนซิน (nisin)	<i>Lactococcus lactis</i>	Hurst 1981
แลคโตซิน เอส (lactocin S)	<i>Lactobacillus sakei</i>	Mortvedt และ คณะ 1991
เอพิเดอร์มิน (epidermin)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Allgaier และ คณะ 1986
กอลลิเดอร์มิน (gallidermin)	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	Kellner และ คณะ 1988
แลคทิซิน 481 (lactacin 481)	<i>Lactococcus lactis</i>	Piard และ คณะ 1992
กลุ่ม 1.2		
เมอร์ซาซิดิน (mersacidin)	<i>Bacillus subtilis</i>	Altena และ คณะ 2000
ซินนามัยซิน (cinnamycin)	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	Sahl และ Bierbaum 1998
แอนโคเวนิน (ancovenin)	<i>Streptomyces</i> ssp.	Sahl และ Bierbaum 1998
ดูรามัยซิน (duramycin)	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	Sahl และ Bierbaum 1998
แอคทาการ์ดิน (actagardin)	<i>Actinoplanes</i> ssp.	Sahl และ Bierbaum 1998

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างแบคทีเรียโอสลินในกลุ่มต่างๆ (ต่อ)

แบคทีเรียโอสลิน	จุลินทรีย์ที่สร้าง	เอกสารอ้างอิง
<b>กลุ่ม 2 (โมเลกุลขนาดเล็ก และทนต่อความร้อน)</b>		
กลุ่ม 2.1		
เพดิโอสลิน PA-1 (pediocin PA-1)	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Motlagh และคณะ, 1992
ซาคาซิน A (sakacin A)	<i>Lactobacillus sake</i>	Holck และคณะ, 1992
ซาคาซิน P	<i>Lactobacillus sake</i>	Tichaczek และคณะ, 1992
ลิวโคซิน A-UAL187 (leucocin A-UAL 187)	<i>Leuconostoc gelidum</i>	Hastings และคณะ, 1991
มีเซนเทอริซิน Y105 (mesentericin Y105)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Hechard และคณะ, 1992
เอนเทอโรซิน A (enterocin A)	<i>Enterococcus faecium</i>	Aymerich และคณะ, 1996
ไดเวอร์จิน V41 (divergin V41)	<i>Carnobacterium divergens</i>	Metivier และคณะ, 1998
แลคโตคอกซิน MMFII (lactococcin MMFII)	<i>Lactobacillus lactis</i>	Ferchichi และคณะ, 2001
กลุ่ม 2.2		
แลคโตคอกซิน G (lactococcin G)	<i>Lactobacillus lactis</i>	Nissen-Meyer และคณะ, 1992
แลคโตคอกซิน M (lactococcin M)	<i>Lactobacillus lactis</i>	van Belkum และคณะ, 1991
แลคทาซิน F (lactacin F)	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Allison และคณะ, 1994
แพลนทาริซิน A (plantaricin A)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Nissen-Meyer และคณะ, 1993
แพลนทาริซิน EF (plantaricin EF)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Jimenez-Diaz และคณะ, 1995
แพลนทาริซิน JK (plantaricin JK)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Anderssen และคณะ, 1998
กลุ่ม 2.3		
อะซิโดซิน B (acidocin B)	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leer และคณะ, 1995
คาร์โนแบคทีเรียโอสลิน (carnobacteriocin)	<i>Carnobacterium piscicola</i>	Worobo และคณะ, 1994
ไดเวอร์จิซิน A (divergin A)	<i>Carnobacterium divergens</i>	Worobo และคณะ, 1995
เอนเทอโรซิน P (enterocin P)	<i>Enterococcus faecium</i>	Cintas และคณะ, 1997
เอนเทอโรซิน B (enterocin B)	<i>Enterococcus faecium</i>	Nes และ Holo, 2000
<b>กลุ่ม 3 (โมเลกุลขนาดใหญ่ไม่ทนความร้อน)</b>		
เฮลเวทิซิน J (helveticin J)	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Joerger และ Klaenhammer, 1986
เฮลเวทิซิน V-1829 (helveticin V-1829)	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Vaughan และคณะ, 1992

แบคทีเรียโอสลินที่นำมาใช้ทางการค้า คือ โอสลิน (nisin) จำหน่ายโดยใช้ชื่อว่า Nisaplin™ (สร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) และเพดิโอสลิน (pediocin PA-1) จำหน่ายโดยใช้ชื่อว่า ALTA™ 2431 (สร้างจาก *Pediococcus acidilactici*) โอสลินมีการใช้แพร่หลายมากกว่า 48 ประเทศ โดยองค์การอาหารและยา (FDA) ได้ยอมรับว่า Nisaplin™ สามารถจำหน่ายในรูปของสารป้องกันการเน่าเสียที่มาจากธรรมชาติ โอสลินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกได้หลายสปีชีส์ รวมทั้ง *Listeria monocytogenes* ซึ่ง Nisaplin™ นิยมใช้ในนม ผลิตภัณฑ์จากนม และอาหารกระป๋อง (Jeevaratnam และคณะ, 2005) นอกจากนี้ Nisaplin™ แล้วยังมีผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรียโอสลินที่นำมาใช้ทางการค้า เช่น แลคซิทีน 3147 และ แลคซิทีน 481 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการใช้ถนอมอาหาร และช่วยเพิ่มรสชาติด้วย ดังนั้น แบคทีเรียโอสลินจึงน่าจะมีศักยภาพในการเป็นสารถนอมอาหารทางเลือกที่ปลอดภัย

### 2.3 โอสลิน

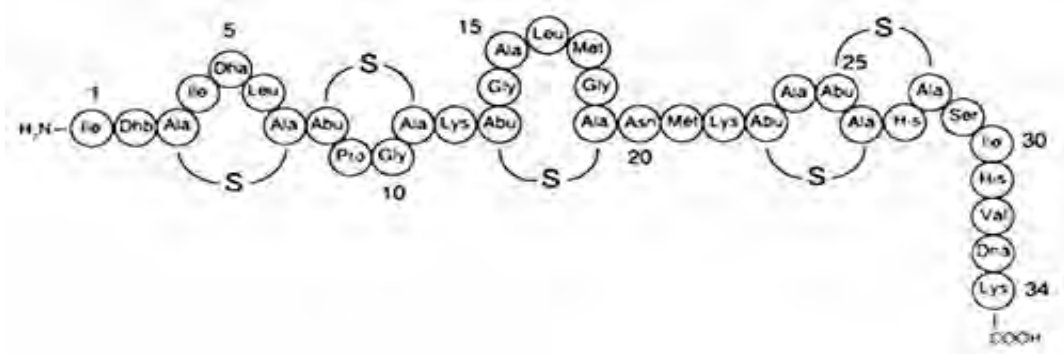
โอสลินเป็นแบคทีเรียโอสลินชนิดหนึ่ง ซึ่งสร้างได้จาก *Lactococcus lactis* sp. *lactis* จะมีผลทำลายแบคทีเรียที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียชนิดที่สร้างมันขึ้นมาเท่านั้น ไม่สามารถสังเคราะห์ทางเคมีได้ ในปี ค.ศ.1928 โอสลินถูกค้นพบครั้งแรกในประเทศอังกฤษโดย Rogers และคณะ พบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactococcus* มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกชนิดอื่นๆ แต่ยังไม่ทราบว่าเป็นผลเนื่องจากการทำงานของโอสลิน ในปี ค.ศ.1933 Whitehead และ Ribbet พบว่านมที่เก็บไว้เพื่อเตรียมเป็นเนยแข็งจะเป็นกรดช้า ซึ่งสาเหตุที่เกิดการเป็นกรดช้าก็เนื่องมาจากหัวเชื้อที่เติมลงไปเพื่อใช้ในการเตรียมเนยแข็งสร้างสารบางอย่างที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างกรด จากนั้นได้ทำการทดลองแยกสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจากนมและพบว่าสารนั้นมีสมบัติเป็นโปรตีนซึ่งถือได้ว่าเป็นการค้นพบโอสลินเป็นครั้งแรก ต่อมาในปี ค.ศ.1947 Mattick และ Hirsch ได้ศึกษาแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactococcus* ที่สร้างสารยับยั้งมีลักษณะทางเซรุ่มวิทยาจัดอยู่ในกลุ่ม N ซึ่งมีสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิดและให้เรียกสารต้านจุลชีพนี้ว่า โอสลิน ซึ่งมาจาก “Group N Inhibitory Substance” ดังนั้นคำจำกัดความของโอสลินก็คือ สารต้านจุลชีพที่ผลิตจากเชื้อในกลุ่ม *Lactococcus* ซึ่งมีลักษณะทางเซรุ่มวิทยาตามการจัดกลุ่มแบบ Lancefield ในกลุ่ม N (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

โอสลินได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ในฐานะของวัตถุกันเสียสำหรับอาหารในหลายประเทศตั้งแต่ปี ค.ศ.1950 และในปี ค.ศ. 1988 องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) ได้อนุมัติให้ใช้โอสลินในอุตสาหกรรมการทำเนย โดยได้รับการรับรองจากองค์การ

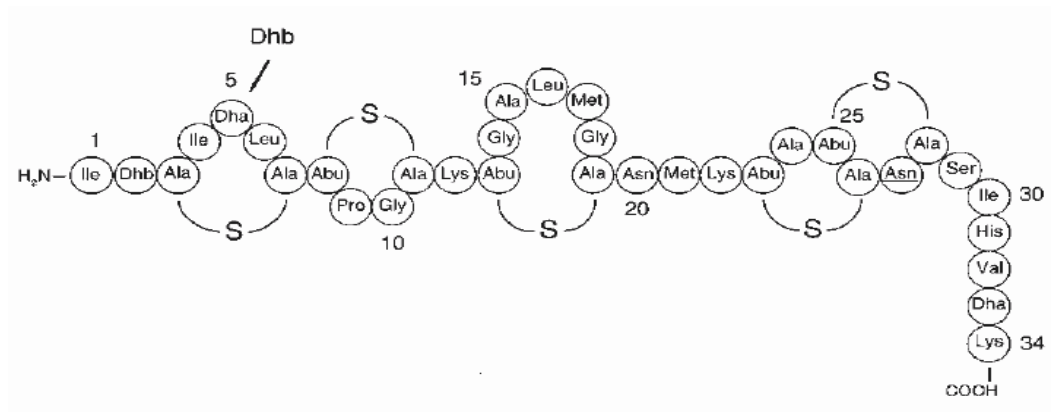
อาหารและยาแห่ง สหรัฐอเมริกาให้เป็นสารที่ปลอดภัย ที่เรียกว่า GRAS (generally recognized as safe) เนื่องจากได้มีการพิสูจน์ว่าไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายใดๆ ต่อผู้บริโภคเมื่อนำมาใช้ในอาหาร ทำให้มีการนำโนซินไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอื่นๆ ตามมาในภายหลัง ( Federal Register, 1988 )

ในปัจจุบันโนซินยังคงจัดเป็นแบคทีเรียโอซินที่มีความสำคัญในเชิงการค้าในอุตสาหกรรมอาหารมากที่สุดเนื่องจากเป็นที่ยอมรับกันในอุตสาหกรรมอาหารในฐานะของวัตถุกันเสียที่ทั่วโลกให้การยอมรับและอนุมัติให้ใช้ในอาหารได้ นอกจากนี้โนซินยังมีความเป็นพิษต่ำมากทำให้ไม่เคยมีการเตือนถึงอันตรายของการใช้โนซิน (Chikindas และ Montville, 2002) โนซินแบ่งออกได้เป็นสามชนิด โดยอาศัยความแตกต่างของกรดอะมิโน ได้แก่ โนซิน A โนซิน Z และโนซิน Q (รูปที่ 2.1) โดยโนซิน A เป็นโนซินชนิดแรกที่ถูกค้นพบ ซึ่งแยกมาจาก *Lactobacillus lactis* subsp *lactis* โนซิน A มีมวลโมเลกุลประมาณ 3.35 กิโลดัลตัน (De Vuyst and Vandamme, 1994) ต่อมาในปี ค.ศ. 1991 ได้มีการค้นพบโนซินที่มีความแตกต่างจากโนซิน A โดยมีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 27 เป็นแอสพาราจिन ขณะที่โนซิน A เป็นฮิสทีดีน โนซิน Z มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 3.33 กิโลดัลตัน ซึ่งแยกได้จาก *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186, *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* N8 และสายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งมีสมบัติการละลายที่ค่าความเป็นกรด-เบสที่เป็นกลางได้ดีกว่าโนซิน A และมีสมบัติในการทำลายแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิดเหมือนกัน ในปี ค.ศ. 2003 Zendo และคณะ ได้ค้นพบโนซิน Q ซึ่งเป็นโนซินชนิดใหม่ที่มีกรดอะมิโนแตกต่างจากโนซิน A โดยในส่วนของเพปไทด์สายหลักมีกรดอะมิโนแตกต่างจากโนซิน A 4 หมู่ ได้แก่ กรดอะมิโนเวอลีน ในตำแหน่งที่ 15 กรดอะมิโนลิวซีนในตำแหน่งที่ 21 กรดอะมิโนแอสพาราจिन ในตำแหน่งที่ 27 และกรดอะมิโนเวอลีน ในตำแหน่งที่ 30 และในส่วนของเพปไทด์สายนำในโมเลกุลของโนซินก่อนการดัดแปลงจะมีกรดอะมิโนแตกต่างจากโนซิน A 2 ตัว ได้แก่ ทริปโตเฟนและไทโรซีน โนซิน Q สังเคราะห์จาก *Lactobacillus lactis* สายพันธุ์ 61-14 ซึ่งแยกจากแม่น้ำในประเทศญี่ปุ่น มีขนาดมวลโมเลกุล 3.32 กิโลดัลตัน

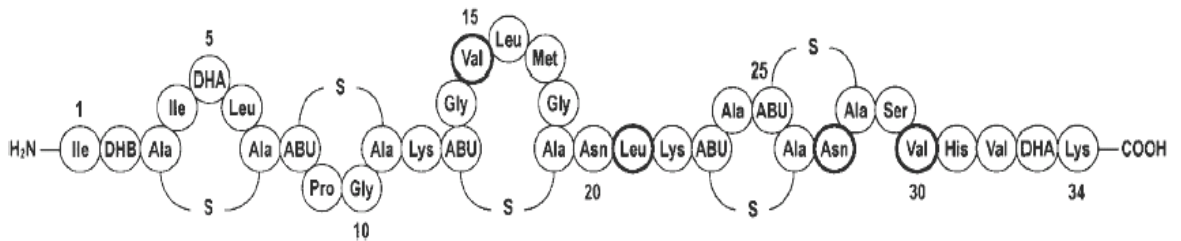
ก.



ข.



ค.



รูปที่ 2.1 ลำดับกรดอะมิโนของไนซิน A Z และ Q โดย ก. แสดงลำดับกรดอะมิโนของไนซิน A จาก *Lactobacillus lactis* subsp *lactis* (De Vuyst และ Vandamme, 1994) ข. แสดงลำดับกรดอะมิโนของไนซิน Z จาก *Lactobacillus lactis* subsp *lactis* (De Vuyst และ Vandamme, 1994) ค. แสดงลำดับกรดอะมิโนของไนซิน Q *Lactobacillus lactis* (Zendo และคณะ, 2003)

### 2.3.1 สมบัติของไนซิน

#### 1. ความสามารถในการละลาย

ไนซินสามารถละลายน้ำได้ดี ในภาวะที่เป็นกรด และความสามารถในการละลายจะลดลงเมื่อมี pH เพิ่มมากขึ้น โดยจากงานวิจัยพบว่าที่ pH 2.5 ไนซินสามารถละลายได้ 12% และการละลายจะลดลงเหลือ 4% ที่ pH 5.0 ส่วนที่ pH เป็นกลาง หรือเป็นเบส ความสามารถในการละลายของไนซินลดลงใกล้ศูนย์ และที่ pH มากกว่า 7.0 โครงสร้างของไนซินมีการเปลี่ยนแปลงแบบผันกลับไม่ได้ และสูญเสียความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อย่างไรก็ตาม การเก็บไนซินไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็น หรือแช่แข็ง จะคงความสามารถของไนซินอยู่ได้เป็นเวลานาน (Delves-Broughton, 1990) อย่างไรก็ตามเนื่องจากการใช้ไนซินในอาหาร จะใช้ไนซินในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น ทำให้การละลายไม่จัดเป็นปัญหาสำคัญ เมื่อนำไนซินไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

#### 2. ความเสถียร

ไนซินจะมีความเสถียรที่ pH ต่ำ โดยจะมีความเสถียรมากสุดที่ pH เท่ากับ 3 ทั้งอุณหภูมิที่ 37 และ 75 องศาเซลเซียส (Liu และ Hansen, 1990) แต่เมื่อสารละลายมี pH เป็นกลางมากขึ้น ความเสถียรของไนซินจะลดลง โดยในภาวะที่เป็นเบส พบว่าความเสถียรของโมเลกุลที่ลดลงเป็นผลเนื่องมาจากการลดลงของประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของโครงสร้างโมเลกุล

ไนซินเป็นโมเลกุลซึ่งทนความร้อนได้ดีจนถึง 121 องศาเซลเซียส เมื่ออยู่ในภาวะ pH ต่ำ แต่ความสามารถในการทนร้อนจะลดลงเมื่อ pH เป็นกลางมากขึ้น (Hurst และ Hoover, 1993) พบว่าสารละลายไนซินสามารถผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที) ที่ pH 3.0-3.5 โดยสูญเสียแอกทิวิตีเล็กน้อย (น้อยกว่าร้อยละ 10) แต่ที่ pH ต่ำ พบว่าไนซินจะสูญเสียแอกทิวิตีเพิ่มมากขึ้น (มากกว่าร้อยละ 90 ที่ pH 1 หรือ 7) ทั้งนี้ยังพบว่าในกระบวนการพาสเจอร์ไรเซชัน ไนซินสูญเสียแอกทิวิตีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ประมาณร้อยละ 20 ที่ pH 5.6-5.8)

เอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (proteolytic enzymes) จะทำลายความสามารถในการยับยั้งเชื้อของไนซินโดยพบว่าแพนครีเอติน (pancreatin), แอลฟาไคโมทริปซิน ( $\alpha$ -chymotrypsin) และฟิซิน (ficin) สามารถย่อยสลายโมเลกุลของไนซินได้ ในขณะที่ทริปซิน (trypsin), เพปซิน (pepsin), อิริปซิน (erepsin), อีลาสเทส (elastase) และคาร์บอกซิเพปติเดส (carboxypeptidase) จะไม่สามารถย่อยสลายโมเลกุลของไนซินได้ (Hurst และ Hoover, 1993)

จากการศึกษาพบว่าการสูญเสียแอกทิวิตีของไนซินในอุตสาหกรรมอาหาร จะเกิดขึ้นได้ 2 ช่วงคือ ช่วงการผลิต และช่วงการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

สำหรับช่วงการผลิต ความเสถียรของไนซินจะขึ้นอยู่กับ ค่า pH ของผลิตภัณฑ์ อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตและฆ่าเชื้อ ดังที่ได้กล่าวในข้างต้น นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับการใช้สารปรุงแต่งอาหาร ซึ่งพบว่าสารบางอย่างจะส่งผลในเชิงลบเมื่อทำงานร่วมกับไนซิน เช่น ไทเทเนียมไดออกไซด์ (titanium dioxide) และสำหรับอุตสาหกรรมอาหารที่ไม่ผ่านกระบวนการใช้อุณหภูมิสูง เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteolytic enzymes) ก็สามารถส่งผลต่อความเสถียรของไนซินได้เช่นกัน

สำหรับช่วงการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ อาหารที่มีระยะเวลาการเก็บรักษา การสูญเสียแอกทิวิตีจะขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัย ได้แก่ pH ของอาหาร อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บ ตลอดจนระยะเวลาในการเก็บรักษา เช่น การเก็บรักษาชีสเป็นเวลา 30 สัปดาห์ ประมาณร้อยละ 80 ที่ 20 องศาเซลเซียส ร้อยละ 60 ที่ 25 องศาเซลเซียส และร้อยละ 40 ที่ 30 องศาเซลเซียส จะเห็นว่าการสูญเสียแอกทิวิตีของไนซินจะเกิดขึ้นน้อยเมื่อใช้อุณหภูมิต่ำในการเก็บรักษาอาหาร ดังนั้นเมื่อต้องการเก็บรักษาอาหารในภาวะที่มีอุณหภูมิสูงขึ้นจึงจำเป็นต้องเพิ่มระดับการใช้ไนซิน

### 2.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไนซินและหน่วยในการวัด

#### 1. การวิเคราะห์หาปริมาณไนซิน

การวิเคราะห์หาปริมาณไนซินสามารถทำได้หลายวิธี โดยวิธีที่ง่ายที่สุดคือ วิธีวัดความขุ่น (turbidimetric assay, photometric assay) หรือวิธีแพร่ซิมในอาหารแข็ง (agar diffusion assay) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ทดสอบแบคทีเรียที่สร้างไนซิน โดยอาศัยสมบัติความเป็นสารต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น

##### 1.1 วิธีวัดความขุ่น (turbidimetric assay, photometric assay)

เป็นวิธีที่ใช้ในการหาปริมาณไนซิน โดยเปรียบเทียบความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียตัวอย่างที่จะทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียที่ไวต่อไนซิน กับไนซินมาตรฐาน ซึ่งสามารถเตรียมในรูปหลอดทดลองหรือในปัจจุบันนิยมใช้ในรูปแบบไมโครไตเตอร์เพลต (microtiter plate) ซึ่งมีความสะดวกและสามารถเตรียมได้หลายตัวอย่าง วิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็ว สามารถประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณไนซินในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ แต่สารที่จะใช้ทดสอบหรืออาหารเลี้ยงเชื้อต้องใสและไม่มีตะกอน (Flores และคณะ, 2003)

##### 1.2 วิธีแพร่ซิมในอาหารแข็ง (agar diffusion assay)

การทดสอบการสร้างไนซินด้วยวิธีแพร่ซิมในวุ้นเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ง่าย และมีต้นทุนต่ำ ดังนั้นจึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ แต่มีข้อจำกัดหลายอย่างโดยเฉพาะในการวิเคราะห์หาปริมาณไนซินที่ต้อง



วิเคราะห์จากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของไซนเป็นสำคัญ ซึ่งหากมีความคลาดเคลื่อนก็จะทำให้เกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ปริมาณ (Pongtharangkul และ Demirci, 2004)

## 2. หน่วยในการวัดไนซิน

### 1. หน่วยในการวัดปริมาณของไนซิน

เป็นหน่วยที่แสดงถึงปริมาณไนซิน เพื่อบอกปริมาณมาก-น้อย นิยมใช้ในเชิงการค้า และอุตสาหกรรมอาหาร แบ่งได้เป็น 2 หน่วย คือ (Hawley, 1957)

1.1 Reading Unit (RU) เป็นหน่วยที่แสดงถึงปริมาณไนซินในเชิงเปรียบเทียบน้ำหนัก โดยที่ 1 ไมโครกรัมของไนซินบริสุทธิ์ จะมีค่าเท่ากับ 40 RU ซึ่งการใช้ไนซินในอาหารควรอยู่ในระดับ 100-400 RU/กรัมของอาหาร

1.2 International unit of nisin (IU) เป็นหน่วยที่นิยมใช้ในเชิงการค้า ซึ่งได้รับความนิยมอย่างมากในภายหลัง เนื่องในอุตสาหกรรมการผลิตไนซิน พบว่าการทำไนซินให้บริสุทธิ์นั้นทำได้ยาก การผลิตไนซินในลักษณะที่มีองค์ประกอบอื่นปนเปื้อนจึงเป็นที่นิยมมากกว่า อย่างไรก็ตามการบอกปริมาณไนซินในเชิงเปรียบเทียบน้ำหนักมักมีความคลาดเคลื่อน เนื่องจากมีน้ำหนักขององค์ประกอบอื่นรวมเข้ามาด้วย จึงต้องทำการบอกปริมาณไนซินในเชิงเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงาน หรือแอกทिवิตี โดยปริมาณไนซินที่มีประสิทธิภาพการทำงานเทียบเท่ากับไนซินบริสุทธิ์ 0.025 ไมโครกรัม หรือไนซินมาตรฐานเช่น Nisaplin 1 ไมโครกรัม จะมีค่าเท่ากับ 1 IU

### 2. หน่วยในการวัดแอกทिवิตีของไนซิน

เป็นหน่วยที่แสดงถึงประสิทธิภาพการทำงานของไนซิน แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ

2.1 Arbitrary unit (AU) หมายถึง ค่าความเจือจางที่สูงที่สุดซึ่งได้จากการทำเจือจางอนุกรมแบบ 2 เท่า ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ไวต่อไนซิน โดยสังเกตจากความขุ่นของเชื้อไม่เพิ่มขึ้น หน่วยนี้นิยมใช้เปรียบเทียบแอกทिवิตี หรือฤทธิ์ในการยับยั้งของไนซินที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

2.2 International unit (IU) ดังที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น IU เป็นหน่วยที่แสดงถึงค่าแอกทिवิตีของไนซิน โดยเทียบกับไนซินมาตรฐาน เช่น เทียบกับ Nisaplin (Nisaplin 1 กรัม มี แอกทिवิตีที่แน่นอน  $10^6$  IU) (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

## 2.4 กลไกในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของไนซิน (Mode of action)

กลไกในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของไนซิน สามารถแบ่งออกได้เป็นสองส่วนหลักๆ ดังนี้ คือ

### 1. กลไกในการยับยั้งการสร้างสปอร์

ไนซินจะไปเปลี่ยนแปลงหมู่ซัลไฟไฮดริลของโปรตีนที่อยู่ในส่วนประกอบของเยื่อหุ้มสปอร์ซึ่งอยู่ในระยะสร้างสปอร์ ทำให้ไม่สามารถเกิดเป็นสปอร์ที่สมบูรณ์ได้ (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

### 2. กลไกในการยับยั้งแบคทีเรียของไนซิน

กลไกในการยับยั้งแบคทีเรียของไนซินมีเป้าหมายอยู่ที่การทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งการอธิบายในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียโดยไนซินนั้น สามารถอธิบายในการอ้างอิงจากแบบจำลอง 2 แบบ ได้แก่

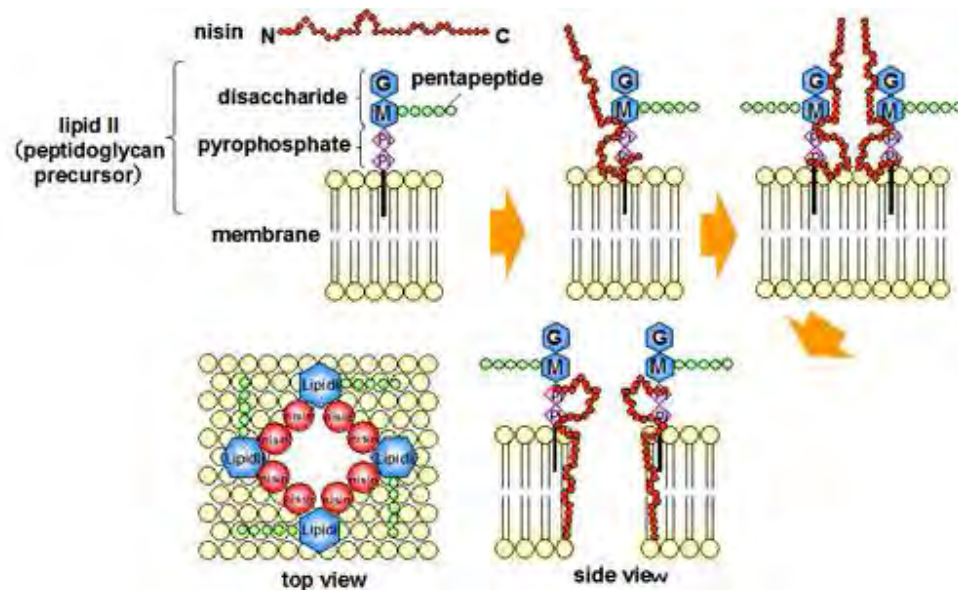
#### 1. Wedge-model (Driessen และคณะ 1995)

กลไกนี้คล้ายกับการทำงานของดีเทอร์เจนต์ โดยไนซินจะเข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย โดยใช้ปลายสายคาร์บอกซี (C-terminus) ของไนซินซึ่งมีประจุบวกทำอันตรกิริยาทางไอออน (ionic interrextion) กับประจุลบของฟอสโฟลิพิด (phospholipids) จากนั้นไนซินจะใช้ส่วนที่ขบหน้าหรือประจุบวกที่บริเวณปลายอะมิโน (N-terminal) ทำอันตรกิริยากับส่วนที่เป็นประจุลบที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น กรดไทโคอิก (teichoic acid) กรดไลโปไทโคอิก (lipoteichoic acid) และฟอสโฟลิพิด (phospholipids) ทำให้เกิดการแทรกตัวของปลายกรดอะมิโนเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะกึ่งกด (wedgelike) และทำให้เกิดการงอของพื้นผิวลิพิด (lipid surface) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดเป็นรูที่ไม่จำเพาะ (non-specific pore) ขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งยังผลทำให้บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียสภาพไป ส่งผลให้สารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น โปแทสเซียม, กรดอะมิโน, นิวคลีโอไทด์, โปรตอน รั่วออกมานอกเซลล์ และเกิดการสูญเสียความต่างศักย์บนเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ไม่สามารถสร้างพลังงานได้ กระบวนการสังเคราะห์ชีวโมเลกุลต่างๆ ก็จะหยุด เป็นสาเหตุให้เซลล์ตายในที่สุด

#### 2. Lipid II model (Wiedemann และคณะ 2001)

สำหรับกลไกที่สองนอกจากไนซินจะทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์เช่นเดียวกับกลไกแรกนั้นแล้ว ยังสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้อีกด้วย เนื่องจากไนซินจะเข้าจับกับลิพิด II คอมเพลกซ์ (Lipid II-complex) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นโมเลกุลที่จะนำหน่วยย่อยเพปติโดไกลแคนไปสังเคราะห์เป็นผนังเซลล์ พบว่าโมเลกุลไนซินจะเข้ามาใกล้บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์

จากนั้นจะใช้ส่วนปลายอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวงจับกับลิพิด II คอมเพลกซ์ แล้วแทรกตัวลงไปในเยื่อหุ้มเซลล์ โดยโมเลกุล 2 โมเลกุลจะจับกับลิพิด II คอมเพลกซ์ 1 โมเลกุล ทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ลิพิด II คอมเพลกซ์ ซึ่งถูกโมเลกุลจับอยู่นั้น จะไม่สามารถนำหน่วยย่อยเพปทิโดไกลแคนไปสังเคราะห์เป็นผนังเซลล์ได้ ดังในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 กลไกของโมเลกุลไนซินในการทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก

สำหรับการที่แบคทีเรียแกรมลบมีความต้านทานต่อไนซิน เนื่องจากผนังเซลล์มีความต้านทานต่อการซึมผ่านมากกว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก โดยด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบบนมีชั้นของไกลโคฟอสโฟลิพิด และไลโปพอลิแซ็กคาไรด์หุ้มอยู่ ไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งอยู่ด้านนอกมีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic property) ทำหน้าที่กั้นโมเลกุลที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำและมีขนาดใหญ่ไม่ให้ผ่านเข้าไปได้ ไนซินซึ่งมีโมเลกุลใหญ่และมีสมบัติไม่ชอบน้ำ จึงไม่สามารถแทรกผ่านชั้นไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ เข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (Ray, 1992; Helander และ Mattila-sandholm, 2000; Delves-Broughton, 2005) แม้ว่าไนซินไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ แต่เมื่อใช้ไนซินร่วมกับสาร EDTA หรือใช้ร่วมกับกระบวนการอื่นๆ เช่น การแช่แข็ง การให้ความร้อน และการลดความเป็นกรด-เบส พบว่าไนซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด เช่น *Salmonella sp.* *Escherichia coli* *Pseudomonas sp.* *Actinobacillus sp.*

*Klesiella* sp. *Yersinia* sp. และ *Aeromonas* sp. (Stevens และคณะ, 1991) ทั้งนี้ เนื่องจากกระบวนการดังกล่าวทำให้ผนังเซลล์ด้านนอกเกิดบาดแผลขึ้น ทำให้ไนซินสามารถเข้าไป และทำให้กระบวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ประสิทธิภาพของไนซิน โดยทั่วไปกล่าวได้ว่า หากในระบบมีปริมาณจุลินทรีย์มากขึ้น จะต้องใช้ปริมาณไนซินมากขึ้นด้วยเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อเหล่านั้น (Delves-Broughton, 2005)

## 2.5 ประโยชน์ของไนซิน และการประยุกต์ใช้ในไนซิน

ไนซินเป็นสารต้านจุลชีพชนิดแรกที่ใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหาร โดยใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ.1950 เพื่อป้องกันการเน่าเสียที่เกิดจาก *Clostridium butyricum* ในเนย ในปี ค.ศ. 1969 องค์การอนามัยโลก (WHO) รับรองว่าไนซินมีความปลอดภัยและอนุญาตให้ใช้ในไนซินเติมในอาหารเพื่อถนอมอาหารได้ ปัจจุบันได้มีการใช้ในไนซินอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารมากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก เนื่องจากไนซินมีสมบัติที่ดี ได้แก่

1. เป็นสารที่จัดอยู่ในบัญชีสารที่จัดว่ามีความปลอดภัย (Generally recognized as safe; GRAS)
2. ไม่เป็นพิษต่อเซลล์สัตว์ เนื่องจากถูกย่อยสลายได้ด้วยโปรตีเอสในน้ำย่อยอาหาร
3. สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนมาในอาหารได้
4. ทนความร้อนได้ดี

จากสมบัติที่กล่าวมาข้างต้น ไนซินจึงถูกนำมาใช้เป็นวัตถุกันเสียเพื่อ

1. เก็บรักษาและยืดอายุผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น เบียร์ ไวน์ และอาหารกระป๋อง
2. ลดปัญหาการก่อโรคจากจุลชีพที่ปนเปื้อนมาในอาหาร
3. คงคุณค่าและรสชาติอาหารไม่ให้เสียไปจากกระบวนการถนอมอาหารด้วยความร้อน
4. หลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีอันตรายเป็นสารถนอมอาหาร

การใช้ไนซินในอาหารจะมีประสิทธิภาพมากน้อยเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับประเภทของอาหาร จุลินทรีย์เป้าหมาย และความเข้มข้นของไนซิน (Cleveland และคณะ, 2001) ซึ่งประเภทของอาหารนั้นจะขึ้นอยู่กับส่วนประกอบทางเคมีและฟิสิกส์ของอาหารนั้นๆ ตัวอย่างในการประยุกต์ใช้ในไนซินแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้ไนซินเป็นสารถนอมอาหาร (Cleveland และคณะ, 2001)

ประเภทอาหาร	จุลินทรีย์เป้าหมาย	ความเข้มข้นของไนซิน (IU/มิลลิลิตร)	เอกสารอ้างอิง
ชีส	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,000	Ferreira และ Lund, 1996
ชีส	<i>Listeria monocytogenes</i>	100	Davies และคณะ, 1997
นมขาดมันเนย	สปอร์ <i>Bacillus cereus</i>	4,000	Wandling และคณะ, 1999
ไส้กรอก	<i>Lactobacillus sake</i> และ <i>Lactobacillus curvatus</i>	1,000	Davies และคณะ, 1999
เนื้อวัว	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	400	Cutter และ Siragusa, 1998
กิมจิ	<i>lactobacilli</i>	100	Choi และ Park, 2000

ในหลายประเทศมีการประยุกต์ใช้ไนซินในการป้องกันการเน่าเสียของอาหารกระป๋องจากแบคทีเรียที่ทนความร้อน และเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่มาจากนม นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเติมไนซินลงไปในปีร์ และไวน์เพื่อลดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียแลคติกที่ทำให้เกิดกรดในผลิตภัณฑ์ปีร์ และไวน์ (Jay, 2000) ตัวอย่างในการประยุกต์ใช้ไนซินแสดงในตารางที่ 2.4 ซึ่งลักษณะการประยุกต์ใช้ไนซินในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่จะเป็นการเติมผงไนซินที่ถูกทำให้บริสุทธิ์จากเชื้อผู้ผลิตเป็นส่วนประกอบของอาหาร ในปริมาณที่กฎหมายในแต่ละประเทศกำหนด

**ตารางที่ 2.4** ปริมาณการใช้ไนซินเป็นสารถนอมอาหารในประเทศต่างๆ (Cleveland และคณะ, 2001)

ประเทศ	อาหารที่มีการยอมรับให้ใช้ในจีน	ระดับไนซินสูงสุด (IU/กรัม)
อาร์เจนตินา	ชีสแผ่น (processed cheese)	500
ออสเตรเลีย	ชีสแผ่น ชีส มะเขือเทศกระป๋อง	ไม่จำกัด
เบลเยียม	ชีส	100
ไซปรัส	ชีส ผักกระป๋อง	ไม่จำกัด
ฝรั่งเศส	ชีสแผ่น (processed cheese)	ไม่จำกัด
อิตาลี	ชีส	500
เม็กซิโก	ไม่จำกัดประเภทอาหาร	500
เนเธอร์แลนด์	ชีส ชีสผง	800
เปรู	ไม่จำกัดประเภทอาหาร	ไม่จำกัด
รัสเซีย	ชีสแผ่น ผักกระป๋อง	8,000
อังกฤษ	ชีส, อาหารกระป๋อง, ครีม	ไม่จำกัด
สหรัฐอเมริกา	ชีสพลาสติกเจอร์โรชี	10,000

### 2.5.1 ข้อจำกัดในการใช้ในจีนเป็นสารถนอมอาหาร

การนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม พบว่าไนซินมีข้อจำกัดอยู่ 3 ประการหลักคือ

#### 1. อาหารจะต้องอยู่ในสภาพเป็นกรด

เนื่องจากไนซินจะมีความเสถียรและสามารถละลายได้ดีในอาหารที่สภาพเป็นกรด และพบว่าความเสถียรและการละลายจะลดลงเมื่ออาหารมีสภาพเป็นกลางมากขึ้น ทำให้ไนซินมีประสิทธิภาพสูงสุดในอาหารที่มีความเป็นกรดเท่านั้น

#### 2. การสูญเสียแอกทิวิตีชีวภาพของไนซิน

การสูญเสียแอกทิวิตีชีวภาพของไนซิน ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากการที่โมเลกุลของไนซินมีทั้งประจุบวกและลบ (amphiphilic molecule) และมีโครงสร้างโมเลกุลบางส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ทำให้ไนซินสามารถจับกับส่วนไม่มีประจุและส่วนที่ไม่ชอบน้ำของแมโครโมเลกุล ซึ่งเป็นองค์ประกอบของอาหาร เช่น โปรตีน และไขมันได้ (Dongsu และคณะ, 1992) นอกจากนี้การสูญเสียแอกทิวิตีชีวภาพในอาหาร อาจมีสาเหตุมาจากเอนไซม์ต่างๆ ที่สามารถย่อยสลายไนซินได้ (Inga และคณะ, 2003) เช่น

เอนไซม์กลูตาไธโอน S-ทรานสเฟอเรส (Rose และคณะ, 1999) ทำให้การควบคุมปริมาณแบคทีเรียก่อโรคในอาหารต้องใช้ไนซินในปริมาณมาก ซึ่งอาจก่อให้เกิดการดื้อต่อไนซินตามมาได้

3. จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดอาหารเน่าเสีย หรือจุลินทรีย์ในอาหารที่ต้องการจะใช้ไนซินเป็นตัวควบคุมต้องเป็นแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น ทำให้ไนซินไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบซึ่งจัดเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารได้ ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มดังกล่าวได้แก่ *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Campylobacter jejuni* เป็นต้น

สาเหตุที่ไนซินไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีส่วนของเยื่อหุ้มชั้นนอกล้อมรอบเยื่อหุ้มเซลล์ และ เพปติโดไกลแคนซึ่งเป็นบริเวณออกฤทธิ์ของไนซิน โดยเยื่อหุ้มชั้นนอกประกอบด้วย กลีเซอโรฟอสโฟลิพิด และไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ทำให้เยื่อหุ้มชั้นนอกมีสมบัติป้องกันโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ และโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ไม่ให้ผ่านเข้าโมเลกุลได้ ไนซินจัดเป็นโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำที่มีขนาดใหญ่ (MW = 3.35 กิโลดัลตัน) ทำให้ไม่สามารถผ่านไปยังเยื่อหุ้มชั้นนอกไปยังบริเวณออกฤทธิ์เพื่อทำงานได้ (Helander และ Sandholm, 2000)

### 2.5.2 การเสริมฤทธิ์การทำงานของไนซิน (Antonio และคณะ, 2007)

การที่ไนซินไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารที่สำคัญได้ ส่งผลให้ไนซินมีข้อจำกัดในการใช้งานในอุตสาหกรรมอาหาร จากเหตุผลดังกล่าว ทำให้มีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องในเรื่องการเสริมฤทธิ์การทำงานของไนซินเพื่อให้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ ต้องให้ไนซินทำงานร่วมกับสารชนิดอื่นๆ หรือวิธีการต่างๆ ซึ่งการเสริมฤทธิ์การทำงานของไนซินเพื่อให้ไนซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบสามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธีหลัก (Antonio และคณะ, 2007)

1. การใช้ไนซินร่วมกับสารต้านจุลชีพอื่น คือ วิธีที่อาศัยการทำงานของสารต้านจุลชีพมาทำให้แบคทีเรียแกรมลบที่เคยต้านทานไนซินมีความไวต่อการถูกยับยั้งด้วยไนซินได้ดียิ่งขึ้น โดยสารดังกล่าวมีหลายชนิด

แลคโตเฟอริริน (lactoferrin) เป็นสารต้านจุลชีพที่ได้จากธรรมชาติ พบในสารคัดหลั่งจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น นม น้ำตา น้ำลาย และซีรัม แลคโตเฟอริรินเป็นโปรตีนก่อนกลที่มีน้ำหนักโมเลกุล 78 กิโลดัลตัน ซึ่งแลคโตเฟอริรินสามารถจับกับประจุบวกได้เหมือนเป็นตัวคีเลต (chelator) ส่งผลให้แลคโตเฟอริรินสามารถปลดปล่อยไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ ออกจากเยื่อหุ้มชั้นนอก

ของแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้เยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบเสียสภาพจึงเป็นการเปิดโอกาสให้ ไนซินผ่านเข้าไปยังบริเวณเซลล์เป้าหมาย เป็นผลให้ไนซินออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้

เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ (cetylpyridiniumchloride) เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบเกลือ แอมโมเนีย จึงนิยมใช้เป็นสารต้านจุลชีพในอุตสาหกรรมสัตว์ปีก เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์มีประจุบวก ทำให้สามารถจับกับฟอสเฟตซึ่งมีประจุลบของเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบได้ ทำให้เยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบเสียสภาพ ส่งผลให้ไนซินสามารถผ่านเข้าสู่บริเวณเซลล์เป้าหมาย เป็นผลให้ไนซินออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้

โปแทสเซียมซอเบต (potassium sorbate) เป็นอนุพันธ์สารประกอบเกลือของ กรดซอร์บิก นิยมใช้เป็นสารวัตถุกันเสีย เนื่องจากมีความเสถียรสูง ใช้ในอุตสาหกรรมเนื้อและสัตว์ปีกอย่างแพร่หลาย โปแทสเซียมซอเบต เมื่อเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียจะอยู่ในสภาพแตกตัว ทำให้ปริมาณประจุภายในเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง เหนียวน้ำให้เยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบ เยื่อหุ้มเซลล์ เสียเสถียรภาพ เป็นผลให้ไนซินออกฤทธิ์ที่บริเวณเป้าหมายยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้

คาร์วอครอล (carvacrol) เป็นสารประกอบฟีนอลิกในน้ำมันหอมระเหยสกัดได้จากพืช นิยมแต่งกลิ่นในอุตสาหกรรมอาหาร และมีสมบัติเป็นสารต้านจุลชีพ ซึ่งคาร์วอครอลจะไปทำลายบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบเป็นผลให้ไนซินออกฤทธิ์ที่บริเวณเป้าหมายยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้

**2. การใช้ไนซินร่วมกับการใช้ความร้อน** คือ ความร้อนสามารถเสริมฤทธิ์การทำงานของไนซินได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากการใช้ความร้อนจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมายมีความไม่เสถียรส่งผลให้ไนซินเข้าสู่บริเวณเซลล์เป้าหมายได้ง่ายมากขึ้น

**3. การใช้ไนซินร่วมกับสารคีเลต** คือ การสารคีเลตสามารถเสริมฤทธิ์การทำงานของไนซินได้ ซึ่งจะรบกวนเซลล์ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ส่งผลให้บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ไม่เสถียรส่งผลให้ไนซินเข้าสู่บริเวณเซลล์เป้าหมายได้ง่ายมากขึ้น

อย่างไรก็ตาม พบว่าการใช้ไนซินร่วมกับสารต้านจุลชีพอื่น จะมีข้อดีมากกว่าการใช้ไนซินร่วมกับความร้อนหรือสารคีเลต เนื่องจากใช้ต้นทุนต่ำ มีกรรมวิธีรวมทั้งเครื่องมือไม่ยุ่งยาก และไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของอาหาร และยังสามารถตอบสนองต่อความต้องการของผู้ผลิตและผู้บริโภคได้เป็นอย่างดี



ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างการเสริมฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของไนซิน (Chen และ Hoover, 2003)

การเสริมฤทธิ์การยับยั้ง แบคทีเรียของไนซิน	ผลที่ได้	อ้างอิง
<b>ไนซินทำงานร่วมกับสารต้านจุลชีพอื่น</b>		
แลคโตเฟอริน	เมื่อใช้ ไนซิน (250 IUต่อมล.) และแลคโตเฟอริน (500 ไมโครกรัมต่อมล.) ร่วมกัน จะสามารถเสริมฤทธิ์ และเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง <i>E. coli</i> และเมื่อใช้ ไนซิน (10IU/มล.) และแลคโตเฟอริน (250ไมโครกรัม/มล.) ร่วมกัน จะสามารถเสริมฤทธิ์ และเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง <i>L. monocytogenes</i>	Murdock และ คณะ, 2007
เซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์	เมื่อใช้ ไนซิน (4,000 IU/มล.) และเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (500 ไมโครกรัม/มล.) ร่วมกัน จะสามารถเสริมฤทธิ์ และเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง <i>Salmonella Typhimurium S36</i>	Thongbai และ คณะ, 2005
กรดแลคติก	เมื่อใช้ ไนซิน (0.04 กรัม/ลิตร/กิโลกรัม) และกรดแลคติก (5%) ร่วมกัน จะเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง <i>Pseudomonas spp.</i>	Gogus และ คณะ, 2006
โปแทสเซียมซอร์เบต	เมื่อใช้ไนซิน(400 IU/มิลลิลิตร)และโปแทสเซียมซอร์เบต (0.3%) สามารถยับยั้งการเจริญของ <i>L. monocytogenes</i>	Buncic และ คณะ, 1995
ซูโครสเฟตตีแอสิดเอสเทอร์	เมื่อใช้ไนซินร่วมกับซูโครสเฟตตีแอสิดเอสเทอร์ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก	Thomas และ คณะ, 1998
คาร์วอครอล	เมื่อใช้ไนซิน (6 IUต่อมิลลิลิตร) ร่วมกับคาร์วอครอล (0.3 มิลลิโมล/ลิตร) สามารถลดการเจริญของ <i>B. cereus</i>	Periago และ คณะ, 2001
โมโนลอริน	เมื่อใช้ไนซิน (100 IU/มิลลิลิตร) ร่วมกับโมโนลอริน (0.25 มิลลิกรัม/ลิตร) สามารถยับยั้ง <i>Bacillus sp.</i> ในน้ำมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ	Mansour และ Millière, 2001

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างการเสริมฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของไนซิน (ต่อ)

การเสริมฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของไนซิน	ผลที่ได้	อ้างอิง
<b>ไนซินทำงานร่วมกับการใช้ความร้อน</b>		
	ไนซิน (1000 IU/กรัม) เมื่อใช้ความร้อนปานกลาง (60 ถึง 65 องศาเซลเซียส) จะลดการเจริญเติบโตของ <i>L. monocytogenes</i> ในกึ่งลอปสเตอร์	Budu-Amoako และคณะ, 1999
	ไนซิน (500 – 2500 IU/มล.) เมื่อลดความร้อน (55 องศาเซลเซียส) จะลดการเจริญเติบโตของ <i>Salmonella Enteritidis</i>	Boziaris และคณะ, 1998
<b>ไนซินทำงานร่วมกับสารคีเลต</b>		
	เมื่อใช้ไนซินร่วมกับ EDTA ซีเตรต หรือแลคเทต ไนซิน (2,000 IU/มิลลิลิตร) ยับยั้งการเจริญของ <i>Samonella Typhimurium</i> และ <i>E. coli</i> O157:H7 อย่างมีประสิทธิภาพ	Cutter และ Siragusa, 1995

## 2.6 กรดแลคติก

กรดแลคติก มีชื่อ IUPAC 2-hydroxypropanoic acid สูตรโมเลกุล  $C_3H_6O_3$  และมีไอโซเมอร์อยู่ 2 ชนิด คือ S-(-)-lactic acid และ L-(+)-Lactic acid แต่จะพบโครงสร้างที่เป็น L-(+)-Lactic acid บ่อยและมีความสำคัญมากกว่า L-(+)-Lactic acid (Nykanen และคณะ, 1998) กรดแลคติกผลิตได้จากธรรมชาติโดยขบวนการหมัก และขบวนการสังเคราะห์ ซึ่งกรดแลคติกส่วนใหญ่จะใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร สมบัติที่ทำให้กรดแลคติกมีความเหมาะสมในการใช้งานในอุตสาหกรรมอาหารคือ มีรสเปรี้ยวที่นุ่มนวลกว่ากรดที่ใช้ในอาหารชนิดอื่นๆ ไม่บดบังกลิ่นรสหอมของอาหาร มีสมบัติในการถนอมอาหารและควบคุมจุลินทรีย์ ปัจจุบันกรดแลคติกนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างกว้างขวาง เนื่องจากได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยา แห่งสหรัฐอเมริกา ให้เป็นสารที่ปลอดภัย ที่เรียกว่า GRAS นิยมใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมยา (Elezi และคณะ, 2003) และผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่าง ๆ เช่น ผลิตภัณฑ์ชีส เนย เจลลี่ผลไม้ และขนมปัง (Katz, 1998)

กรดแลคติกสามารถสร้างได้จากแบคทีเรียที่เรียกรดแลคติก เช่น *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* และ *Leuconostoc* ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวจะใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโทส ซึ่งในปัจจุบันได้นำน้ำตาลหลายชนิด รวมทั้ง เบต้ากลูโคส และซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน (Elezi และคณะ, 2003) ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติก ซึ่งกรดแลคติกนี้ยังมีผลในการ

ยับยั้งการเจริญ และทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียรวมทั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรค ทำให้มีความสนใจในการนำสารมายับยั้งจากธรรมชาติมาใช้เป็นสารกันเสียอาหาร

### 2.6.1 กลไกในการยับยั้งแบคทีเรียของไนซินและกรดแลคติก

ไนซินจะจับกับลิพิด II ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย โดยใช้ปลายทางด้านเอ็น จากนั้นจะเกิดการส่งผ่านปลายทางด้านที่เข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดรูขึ้น ของเหลวภายในเซลล์ จะเกิดการรั่วไหลออกมา เป็นสาเหตุทำให้เซลล์ตาย

กรดแลคติกสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ เช่น *E. coli* (Cutter และคณะ, 2001) และ *Salmonella* spp. (Eswaranandam และคณะ, 2004) กรดแลคติกจะทำลายเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบ เมื่ออยู่ข้างนอกเซลล์แบคทีเรียจะไม่แตกตัวเป็นไอออน แต่เมื่อเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแกรมลบแล้ว ทำให้ภายในเซลล์มีสภาพเป็นกรด และมีการแตกตัวเป็นไอออน ทำให้ชั้นของเพปทิโดไกลแคนไม่เสถียร ส่งผลให้เยื่อหุ้มชั้นนอกไม่เสถียร จากนั้นไนซินจะ ออกฤทธิ์ที่บริเวณเป้าหมายยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ (Nykanen และคณะ, 1998)

Nykanen และคณะ (1998) ศึกษาการลดจำนวนของ *Micrococcus luteus* ATCC9341, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9271 และ *Staphylococcus aureus* โดยใช้กรดแลคติก (ความเข้มข้น 0.5 1.5 และ 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร) ร่วมกับหางนม โดยทดสอบด้วยวิธีแพร่ซิมในอาหารแข็ง พบว่า กรดแลคติกร่วมกับหางนมสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบทั้งหมด โดยที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร มีบริเวณโซนใสกว้างกว่าความเข้มข้น 0.5 และ 1.5 มิลลิกรัม/ลิตร

Phillips (1999) ศึกษาการลดปริมาณเชื้อ *Arcobacter butzleri* โดยใช้กรดแลคติกอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 0.5% 1.0% และ 2.0%(v/v) พบว่ากรดแลคติกความเข้มข้น 0.5%(v/v) สามารถลดจำนวน *A. butzleri* ได้ดีที่สุด

Gogus และคณะ (2006) ศึกษาการลดปริมาณเชื้อ *Pseudomonas* spp. ในเนื้อปลาโดยใช้ไนซิน (0.04 กรัม/ลิตร/กิโลกรัม) ที่ pH 5.2 ร่วมกับกรดแลคติก (5%) ที่ pH 2.9 สามารถลดจำนวนเชื้อ *Pseudomonas* spp. ได้ ซึ่งวันที่ 7 ของการทดลองนับจำนวนเชื้อได้เท่ากับ log 5.95 cfu ต่อมิลลิกรัม( $p < 0.01$ )

Shirazinejad และคณะ (2010) ศึกษาการลดปริมาณเชื้อ *Pseudomonas* spp. ในกุ้งแช่แข็ง โดยกรดแลคติกอย่างเดียว พบว่าเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งการ ใช้สารละลายกรดแลคติกที่ความเข้มข้น 1.0% และ 2.0% (v/v) จะสามารถลดปริมาณของ *Pseudomonas* spp. ได้เพียงเล็กน้อย ดังนั้น Shirazinejad และคณะ (2010) จึงศึกษาการทำงาน

ของกรดแลคติก (ความเข้มข้น 1.0% และ 2.0% (v/v)) ที่ใช้ร่วมกับไนซิน (0.04 กรัม/ลิตร/กิโลกรัม) พบว่าสามารถจำนวนของ *Pseudomonas* spp. ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ( $P \leq 0.05$ )

แต่อย่างไรก็ตามการใช้ไนซินยังมีข้อจำกัด ได้แก่ โครงสร้างบางส่วนเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำจึงทำให้จับกับบริเวณที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีน ไขมันในอาหารและเอนไซม์ต่างๆ ในอาหารสามารถย่อยสลายไนซินได้ (Inga และคณะ, 2003) ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายลดลง ซึ่งอาจก่อให้เกิดการต้านต่อไนซินขึ้น โดยจะทำให้เกิดการสูญเสียแอกทิวิตีชีวภาพของไนซิน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำนาโนเทคโนโลยี ซึ่งได้แก่ อนุภาคนาโน (Nanoparticles) มาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มความคงตัวของไนซินและกรดแลคติก

## 2.7 การเพิ่มประสิทธิภาพด้วยอนุภาคนาโน

### 2.7.1 ชนิดของอนุภาคนาโน (Letchford และ Burt, 2007)

สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะของเมทริกซ์ (matrix) ที่ใช้ในการเตรียม ดังนี้

1. อนุภาคนาโนชนิดพอลิเมอร์ (polymeric nanoparticles)
2. อนุภาคนาโนชนิดไขมัน (lipid-base nanoparticle)

### 2.7.2 อนุภาคนาโนชนิดพอลิเมอร์ (polymeric nanoparticle)

อนุภาคนาโนชนิดพอลิเมอร์ คือ อนุภาคที่ประกอบขึ้นจากพอลิเมอร์ ซึ่งเตรียมด้วยการตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ อนุภาคนาโนชนิดพอลิเมอร์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. **นาโนสเฟียร์ (Nanosphere)** คือ อนุภาคที่ประกอบขึ้นโดยสารออกฤทธิ์ที่บรรจุอยู่ภายในจะเกาะอยู่รอบๆ แกนกลางซึ่งทำจากพอลิเมอร์ซึ่งเตรียมด้วยการตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์
2. **พอลิเมอร์โซม (Polymersome)** คือ อนุภาคที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์ชีวภาพซึ่งสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable polymer) ซึ่งเตรียมด้วยการตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยสารออกฤทธิ์ที่บรรจุอยู่ภายในจะถูกควบคุมการปลดปล่อยจากการสลายตัวของพอลิเมอร์

### 2.7.3 อนุภาคนาโนชนิดไขมัน (lipid-base nanoparticles)

อนุภาคนาโนชนิดไขมัน คือ อนุภาคที่มีองค์ประกอบไขมันทั้งที่เป็นไขมันชนิดเหลว และชนิดแข็งที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ไว้ภายใน

#### 1. ชนิดของอนุภาคนาโนชนิดไขมัน

อนุภาคนาโนชนิดไขมันสามารถแบ่งออกเป็น 4 ชนิด (Letchford และ Burt, 2007)

คือ

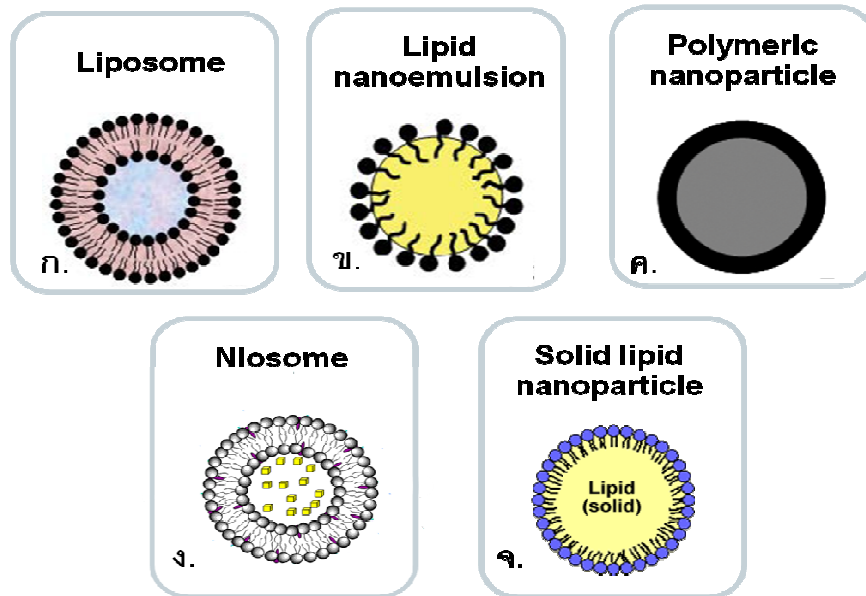
1. **ไมโครอิมัลชัน (microemulsion)** คือ อนุภาคที่เกิดจากผสมและรวมตัวของสารลดแรงตึงผิวในเฟสของน้ำ โดยมีส่วนที่ชอบน้ำเรียงตัวอยู่รอบนอกอนุภาคและส่วนที่ไม่ชอบน้ำหันเข้าข้างในอนุภาค อนุภาคชนิดนี้เหมาะสำหรับการเก็บสารออกฤทธิ์ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งมักจะแทรกตัวกันอยู่ในส่วนที่ไม่ชอบน้ำภายในอนุภาค

2. **ไลโปโซม (liposome)** คือ อนุภาคที่มีลักษณะเป็นถุงกลมมีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น ซึ่งเตรียมได้จากฟอสโฟลิพิด (phospholipids) อนุภาคชนิดนี้สามารถกักเก็บสารออกฤทธิ์ได้ทั้งที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ โดยสารที่ละลายน้ำจะถูกบรรจุอยู่ในบริเวณว่างระหว่างอนุภาค และอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มซึ่งเป็นส่วนชอบน้ำของอนุภาค ส่วนสารที่ไม่ละลายน้ำจะถูกบรรจุอยู่ในบริเวณที่ไม่ชอบน้ำภายในอนุภาค

3. **นาโนอิมัลชัน (nanoemulsion)** คือ อนุภาคที่เกิดจากรวมตัวของน้ำและน้ำมัน ด้วยการปั่นผสมน้ำมันให้กระจายตัวไปในเฟสของน้ำและมีสารลดแรงตึงผิวเป็นตัวทำให้น้ำกับน้ำมันรวมตัวกันได้ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวนี้อาจล้อมรอบอยู่ที่ชั้นนอกของอนุภาค โดยสารออกฤทธิ์จะถูกกักเก็บอยู่ในอนุภาคซึ่งขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารนั้นกับน้ำมัน

4. **ไนโอโซม (niosome)** คือ อนุภาคที่สร้างขึ้นจากสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ มีลักษณะเช่นเดียวกับไลโปโซม โดยมีลักษณะเป็นถุงเล็กคล้ายกระเปาะเก็บกักสารไว้ภายใน โครงสร้างเป็นผนัง 2 ชั้นซึ่งเกิดจากการเรียงตัวของโมเลกุลที่มีขั้วและไม่ขั้วอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน

5. **อนุภาคนาโนไขมันชนิดแข็ง (solid lipid nanoparticle)** คือ อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งเป็นอนุภาคนาโนที่แตกต่างจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันชนิดอื่นๆ เนื่องจากเตรียมขึ้นจากไขมันแข็ง ลักษณะโครงสร้างของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ได้จะมีชั้นที่ห่อหุมนั้นเรียงตัวกันชั้นเดียว และมีขนาดของอนุภาคอยู่ในช่วง 50 ถึง 1,000 นาโนเมตร ซึ่งที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิร่างกายอนุภาคนาโนดังกล่าวจะอยู่ในสถานะของแข็ง (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 อนุภาคนาโนชนิดต่างๆ ก. ลิโพโซม (liposome) ข. ไมโครอิมัลชัน (microemulsion)  
 ค. อนุภาคนาโนชนิดพอลิเมอร์ (polymeric nanoparticle) ง. ไนโอโซม (niosome)  
 จ. อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง (solid lipid nanoparticle)

#### 2.7.4 การประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนเพิ่มความคงตัวของโมเลกุลไนซินและกรดแลคติก

จากที่ได้กล่าวแล้วว่าการสูญเสียแอกติวิตีชีวภาพของไนซินและกรดแลคติกในอาหาร ทำให้การเพิ่มความคงตัวของโมเลกุลไนซินจึงมีความสำคัญมาก ดังนั้นอนุภาคนาโนจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มความคงตัวของไนซิน

สำหรับการนำอนุภาคลิโพโซมมาประยุกต์ใช้นั้น มีผลงานของนักวิทยาศาสตร์ที่ได้ศึกษาแอกติวิตีในการยับยั้งเชื้อ *Listeria innocua* ของไนซินที่บรรจุในอนุภาคลิโพโซม เปรียบเทียบกับไนซินอิสระที่สร้างจากหัวเชื้อผสม (Mixed cultures) ในการหมักเชดคาร์ชีส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากผลการทดลองพบว่า แอกติวิตีการยับยั้งเชื้อของไนซินที่บรรจุภายในลิโพโซมลดลงเพียงร้อยละ 10 ในขณะที่ไนซินที่สร้างจากหัวเชื้อผสม (Mixed cultures) มีแอกติวิตีการยับยั้งเชื้อลดลงถึงร้อยละ 88

ในปี ค.ศ. 2003 Benech และคณะ ได้ศึกษาสมบัติของไนซินที่ถูกบรรจุอยู่ในอนุภาคไลโปโซม พบว่าไนซินจะถูกบรรจุภายในอนุภาคไลโปโซมโดยการเอาส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการแสดงแอกทิวิตีชีวภาพแทรกไปในผนังหุ้มไลโปโซมที่เป็นส่วนของฟอสโฟลิพิด ดังนั้นจึงสามารถปกป้องไนซินจากเอนไซม์และการทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบทางเคมีในอาหารทำให้ไนซินที่ถูกบรรจุมีความคงตัวมากขึ้น (Benech และคณะ, 2003) และจากผลการศึกษาประสิทธิภาพการบรรจุไนซินลงในอนุภาคไลโปโซม (encapsulation efficiencies) พบว่าการใช้อนุภาคไลโปโซมมีข้อจำกัดในการบรรจุไนซิน เนื่องจากความคงตัวของไลโปโซม และการปลดปล่อยไนซินออกจากไลโปโซมจะขึ้นอยู่กับภาวะแวดล้อม แรงกระทำระหว่างบรรจุ และอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) ระหว่างไนซินกับส่วนประกอบของ ไลโปโซมทำให้สมบัติของไลโปโซมไม่คงที่ (Laridi และคณะ, 2003)

นอกจากนี้ จากการศึกษาข้อมูลผลงานวิจัย พบว่าได้มีการนำเทคนิคการบรรจุไนซินลงในพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ โดยการตกตะกอนให้เกิดอนุภาคระดับนาโนเมตรด้วยแอนติโซลเวนต์ (anti-solvent) ซึ่งข้อดีของการเตรียมอนุภาคนาโนด้วยวิธีนี้ คืออนุภาคที่ได้จะมีความคงตัวไม่เปลี่ยนแปลงสมบัติตามภาวะแวดล้อม อนุภาคที่เตรียมได้สามารถควบคุมขนาดและคุณภาพในการผลิตแต่ละครั้งให้คงที่ได้ เนื่องจากมีการควบคุมตัวแปรในขบวนการผลิต เช่น อุณหภูมิ ความดัน อัตราการไหลของสารละลาย และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อ นำสารละลาย เป็นต้น ในงานวิจัยนี้ อนุภาคนาโนชนิดพอลิเมอร์ที่บรรจุไนซินมีขนาดระหว่าง 200-400 นาโนเมตร อนุภาคมีรูปร่างทรงกลมผิวเรียบ และสามารถบรรจุไนซินได้ในปริมาณร้อยละ 84 บรรจุจากปริมาณไนซินเริ่มต้น ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการปลดปล่อยไนซินจากอนุภาคนาโนพบว่า ร้อยละของการปลดปล่อยไนซินขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-เบส และความเข้มข้นของเกลือ โดยการเพิ่มค่าความเป็นกรด-เบสและความเข้มข้นของเกลือจะทำให้ร้อยละการปลดปล่อยไนซินจากอนุภาคนาโนลดลง เนื่องจากค่าความเป็นกรด-เบสและความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ความสามารถในการละลายของไนซินลดลง ทำให้ส่วนที่ไม่ชอบน้ำของไนซินจับกับพอลิเมอร์ได้ดีขึ้นทำให้การปลดปล่อยไนซินออกมาจากอนุภาคน้อยลง และเมื่อผู้วิจัยทำการทดสอบแอกทิวิตีทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *Lactobacillus delbrueckii* ของไนซินที่บรรจุอยู่ในอนุภาคนาโน ปรากฏว่าไนซินที่ปล่อยออกมาจากอนุภาคนาโนนั้นสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้นานถึง 45 วัน ขณะที่ไนซินอิสระยับยั้งเชื้อทดสอบได้เพียง 5 วัน (Salmaso และคณะ, 2004) อย่างไรก็ตามวิธีการประดิษฐ์อนุภาคนาโนด้วยเทคนิคการตกตะกอนด้วยแอนติโซลเวนต์ มีข้อเสียคือ ต้องใช้เครื่องมือประดิษฐ์อนุภาคที่ซับซ้อน มีการควบคุมตัวแปรหลายตัว และต้องใช้

ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมาก ซึ่งถ้าหากกำจัดออกจากผลิตภัณฑ์ได้ไม่หมดอาจทำให้มีสารพิษตกค้าง ซึ่งอาจเกิดอันตรายกับผู้บริโภคได้

Malheiros และคณะ (2010) จากผลการศึกษาประสิทธิภาพไนซินบรรจุในอนุภาคไลโปโซม (เตรียมจากเลซิตินของถั่วเหลือง) มีขนาดอนุภาค 140 นาโนเมตร จากนั้นศึกษาการยับยั้ง *L. monocytogenes* ในอาหาร BHI ทดสอบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าไนซินอิสระสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีกว่าไนซินที่บรรจุในอนุภาคไลโปโซม ส่วนในน้ำนมทดสอบที่อุณหภูมิตู้เย็น ( $7 \pm 1$  องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน พบว่าไนซินอิสระสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้  $3-4 \log \text{ cfu}$  ต่อมิลลิลิตร ส่วนไนซินที่บรรจุอนุภาคไลโปโซมนั้นสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ตั้งแต่วันที่ 5 ของการทดลองเป็นต้นไป

### 2.7.5 อนุภาคนาโนไขมันชนิดแข็ง (solid lipid nanoparticles)

อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งเริ่มต้นพัฒนาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990 เพื่อมาเป็นอีกทางเลือกหนึ่งนอกเหนือจากอนุภาคนาโนที่กล่าวมาข้างต้น อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งเป็นที่กักเก็บสารไขมันแข็ง ซึ่งมีข้อดีกว่าไขมันอื่นๆ คือมีวิธีเตรียมที่ง่าย นอกจากนี้ไขมันแข็งยังเป็นสารที่ย่อยสลายและเข้ากันได้ดีกับร่างกายทำให้มีความปลอดภัยสามารถนำมาใช้ในอาหารได้โดยใช้สารห่อหุ้มประเภทไขมัน เช่น ไตรกลีเซอไรด์และแว็กซ์ ปริมาณร้อยละ 0.1-30 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) เป็นต้น

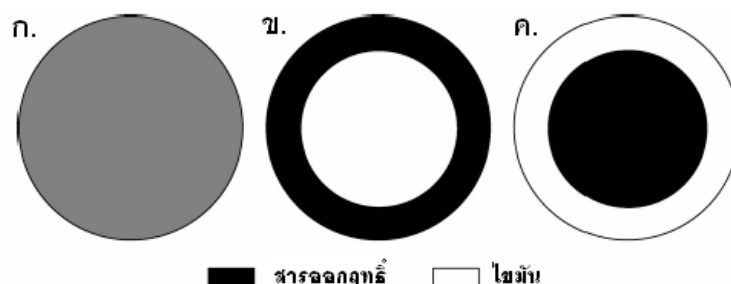
นอกจากนี้การใช้ไนซินเป็นสารถนอมอาหารต้องคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้บริโภคเป็นหลัก เพราะฉะนั้นการเพิ่มความคงตัวของไนซินโดยใช้อนุภาคนาโนจึงต้องเลือกอนุภาคที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคทั้งในแง่กรรมวิธีในการเตรียมและองค์ประกอบของตัวอนุภาคเอง โดยในแง่ของกรรมวิธีในการเตรียมนั้นไม่ควรมีการใช้สารที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค อีกทั้งกรรมวิธีในการเตรียมต้องทำได้ง่าย ราคาถูกเพื่อให้สามารถพัฒนาสู่ระดับอุตสาหกรรมได้ จึงเกิดแนวคิดที่จะนำอนุภาคนาโนที่ทำมาจากไขมันแข็ง (solid lipid nanoparticles; SLN) มาเพิ่มความคงตัวของโมเลกุลไนซิน เนื่องจากอนุภาคชนิดนี้มีวิธีการเตรียมที่ง่ายและสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีจากห้องปฏิบัติการสู่ระดับอุตสาหกรรมได้



### 1. ลักษณะการกระจายตัวของสารออกฤทธิ์ในอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง

ดังที่ได้กล่าวแล้วว่าอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง เป็นอนุภาคที่มีองค์ประกอบไขมันทั้งที่เป็นไขมันชนิดเหลวและชนิดแข็งที่ห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ไว้ภายใน ซึ่งลักษณะของการห่อหุ้มนั้นสามารถแบ่งออกเป็น 3 แบบ (Pardeike และคณะ, 2009) ดังนี้

1. สารออกฤทธิ์กระจายตัวรวมเป็นเนื้อเดียวกันกับไขมัน (homogeneous matrix) (รูปที่ 2.4ก.)
2. ไขมันทำหน้าที่เป็นแกนกลางให้สารออกฤทธิ์ยึดเกาะ (active-free lipid core with active-enriched shell) (รูปที่ 2.4ข.)
3. ไขมันทำหน้าที่เป็นเปลือกห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ (active-free lipid shell) (รูปที่ 2.4ค.)



รูปที่ 2.4 ลักษณะการกระจายตัวของสารออกฤทธิ์ในอนุภาคนาโนชนิดไขมัน (Pardeikeและคณะ, 2009)

### 2. วิธีการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง

การเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งมีวิธีหลักๆ 4 วิธี (Wolfgang และคณะ, 2010) ได้แก่

1. ฮอมอจีไนเซชันความเร็วสูงและการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (High speed and Ultrasound homogenization) วิธีฮอมอจีไนเซชันความเร็วสูงเป็นวิธีการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งโดยการตีปั่นไขมันที่หลอมเหลวกับสารลดแรงตึงผิวด้วยความเร็วสูงเพื่อกระจายไขมันให้รวมตัวกับน้ำเกิดเป็นอนุภาคนาโนขึ้น การเตรียมอนุภาคด้วยวิธีนี้มีขั้นตอนการเตรียมที่ง่าย แต่อนุภาคที่ได้จะมีขนาดแตกต่างกัน โดยมีขนาดอยู่ระหว่าง 80-800 นาโนเมตร

2. การเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งด้วยกระบวนการทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (SLN prepared by solvent emulsification) วิธีการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งด้วยกระบวนการทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เริ่มจากการละลายสารออกฤทธิ์ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่สามารถรวมตัวกับน้ำได้ เช่น ไฮโคลเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และ ไดเอทิลอีเธอร์ เป็นต้น แล้วจึงเทส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสารออกฤทธิ์ละลายอยู่ลงในสารละลายสารลดแรงตึงผิว ทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกซึ่งในขั้นตอนนี้ไขมันจะเกิดการตกตะกอนได้เป็นอนุภาคนาโนที่มีสารออกฤทธิ์บรรจุอยู่ภายใน อนุภาคนาโนที่เตรียมด้วยวิธีนี้จะมีขนาดอยู่ระหว่าง 30-100 นาโนเมตร และเป็นวิธีที่สามารถหลีกเลี่ยงการสลายตัวของสารออกฤทธิ์จากความร้อนได้ดี แต่อย่างไรก็ตามอาจเกิดปัญหาการกำจัดตัวทำละลายออกไม่หมด ทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดความเป็นพิษต่อผู้บริโภคได้

### 3. ไมโครอิมัลชัน (Microemulsion based SLN preparation)

วิธีไมโครอิมัลชันเป็นการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งตัวด้วยการเจือจางไมโครอิมัลชันในน้ำ เริ่มจากการละลายสารออกฤทธิ์ในไขมันหลอมเหลว และเทลงในสารลดแรงตึงผิวที่ละลายในน้ำร้อนซึ่งมีอุณหภูมิเดียวกันกับไขมันหลอมเหลว ทำการกวนอย่างช้าๆ โดยควบคุมอุณหภูมิให้คงที่เท่ากับอุณหภูมิที่ใช้ในการหลอมเหลวไขมัน จากนั้นนำอิมัลชันที่ได้เทลงในน้ำเย็น (2-3 องศาเซลเซียส) ทันที ในอัตราส่วน 1:25 หรือ 1:50 ซึ่งเหตุการณ์นี้จะทำให้เกิดการแตกตัวของไมโครอิมัลชันเป็นนาโนอิมัลชัน และเกิดการแข็งตัวทำให้สารออกฤทธิ์ถูกบรรจุอยู่ภายในอนุภาค

### 4. ฮอโมจีไนเซชันความดันสูง (High pressure homogenization)

วิธีฮอโมจีไนเซชันความดันสูงเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ไม่มีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ และสามารถขยายขนาดการผลิตได้ง่าย โดยอาศัยหลักการทำงานของเครื่องฮอโมจีไนเซอร์ความดันสูง คือ เครื่องจะอัดของเหลวด้วยแรงดัน 100-2,000 บาร์ ผ่านช่องขนาดเล็ก ของเหลวจะกลายเป็นของไหลที่มีความเร็วสูง ทำให้เกิดแรงเฉือนอย่างมากจนไปลดขนาดอนุภาคที่ละลายอยู่ลงจนถึงระดับนาโนเมตร และพบว่าสามารถใช้ไขมันแข็งได้มากถึงร้อยละ 40 ในการเตรียมอนุภาควิธีฮอโมจีไนเซชันความดันสูง ยังแบ่งเป็น 2 แบบ ได้แก่ วิธีฮอโมจีไนเซชันความดันสูงแบบร้อน และวิธีฮอโมจีไนเซชันความดันสูงแบบเย็น

#### 4.1 ฮอมอจีไนเซชันความดันสูงแบบร้อน (Hot homogenization)

วิธีฮอมอจีไนเซชันความดันสูงแบบร้อนมีขั้นตอนการเตรียมอนุภาค คือ ละลายสารออกฤทธิ์ในไขมันที่ถูกหลอมเหลว จากนั้นเติมสารลดแรงตึงผิวซึ่งทำให้ละลายในน้ำร้อน ลงไปในไขมันหลอมเหลวที่มีสารออกฤทธิ์ละลายอยู่ แล้วนำไปตีปั่นด้วยเครื่องฮอมอจีไนเซชันความเร็วสูงเพื่อทำให้ส่วนน้ำและไขมันเข้ากันได้เป็นอิมัลชันและเป็นการลดขนาดอนุภาคให้อยู่ในระดับ นาโนเมตร ซึ่งส่วนใหญ่จะผ่านเครื่องฮอมอจีไนเซชันความดันสูงซ้ำ 3-5 รอบ ที่ความดันประมาณ 500-1,500 บาร์ ขึ้นกับชนิดของไขมันและสารออกฤทธิ์ที่ใช้ เมื่อเสร็จแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของนาโนอิมัลชัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ไขมันที่อยู่ในรูปแบบนาโนอิมัลชันจะเกิดการแข็งตัวทำให้สารออกฤทธิ์ถูกบรรจุเข้าสู่ภายในอนุภาคนาโน โดยในระหว่างขั้นตอนการเตรียมจะต้องรักษาอุณหภูมิในระบบให้สูงกว่าจุดหลอมเหลวของไขมันอยู่ตลอดเวลาเพื่อป้องกันการแข็งตัวของไขมันก่อนที่จะมีการบรรจุสารออกฤทธิ์ วิธีนี้จะให้ขนาดอนุภาคนาโนที่เล็กและมีขนาดในแต่ละอนุภาคใกล้เคียงกันแต่จะไม่เหมาะสำหรับการบรรจุสารออกฤทธิ์ที่ไม่ทนความร้อน เนื่องจากอาจเกิดการสลายตัวในระหว่างการเตรียมอนุภาคได้

#### 4.2 ฮอมอจีไนเซชันความดันสูงแบบเย็น (Cold homogenization)

วิธีฮอมอจีไนเซชันความดันสูงแบบเย็นนั้น ในขั้นตอนแรกจะเหมือนกับวิธีฮอมอจีไนเซชันความดันสูงแบบร้อนกล่าวคือ การละลายสารออกฤทธิ์ในไขมันที่ถูกหลอมเหลว แต่หลังจากนั้นจะทำให้เย็นลงทันทีด้วยไนโตรเจนเหลว ในช่วงนี้สารออกฤทธิ์จะแพร่เข้าไปเป็นเนื้อเดียวกันกับไขมัน เนื่องจากการให้ความเย็นโดยทันที จากนั้นทำการบดเพื่อให้ได้อนุภาคขนาดเล็กและเติมสารลดแรงตึงผิวลงไป ความเย็นจะช่วยทำให้อนุภาคแตกเป็นอนุภาคเล็กยิ่งขึ้น จากนั้นนำเข้าสู่เครื่องฮอมอจีไนเซชันความเร็วสูงที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งวิธีฮอมอจีไนเซชันความดันสูงแบบเย็นจะมีข้อได้เปรียบ คือ ทำให้สารออกฤทธิ์สัมผัสกับความร้อนน้อยลงซึ่งเป็นการหลีกเลี่ยงการสลายตัวของสารออกฤทธิ์ แต่ด้วยวิธีนี้ขนาดอนุภาคที่ได้จะมีขนาดใหญ่กว่าวิธีฮอมอจีไนเซชันความดันสูงแบบร้อน

### 1. ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ออนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง

จากที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นจะเห็นได้ว่า อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งเป็นอนุภาคนาโนชนิดหนึ่ง ที่มีข้อดีกว่าอนุภาคนาโนชนิดอื่น คือ มีกรรมวิธีเตรียมที่ง่ายและต้นทุนต่ำทำให้สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีจากห้องปฏิบัติการไปสู่ระดับอุตสาหกรรมได้ง่าย นอกจากนี้อนุภาคนาโนดังกล่าวยังมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ทำให้สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอางได้ และในด้านของประสิทธิภาพ พบว่าอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งสามารถควบคุมการปล่อยสารออกฤทธิ์ได้นาน

เนื่องจากอนุภาคนาโนที่อยู่ในสถานะของไขมันแข็งจะมีการสลายตัวที่ค่อนข้างช้า ทำให้สารออกฤทธิ์ค่อยๆถูกปล่อยออกมา ทำให้สามารถช่วยยืดระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ที่ถูกห่อหุ้มไว้ภายในได้ดีกว่าอนุภาคที่ประกอบด้วยไขมันเหลวที่มีการสลายตัวเร็วกว่า สาเหตุที่กล่าวมานี้จึงทำให้มีผู้วิจัยสนใจบรรจุสารออกฤทธิ์ต่างๆทั้งที่ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมยาลงในอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอย่างแพร่หลาย

ข้อดีของรูปแบบอนุภาคนาโนชนิดนี้ คือ สามารถควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญและช่วยเพิ่มระยะเวลาในการออกฤทธิ์ เพิ่มความคงตัวของสารสำคัญและผลิตภัณฑ์ เพิ่มการดูดซึมสารลงในชั้นที่ลึกยิ่งขึ้น สามารถนำวิธีการไปผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ง่าย ปัจจุบันได้มีการจดสิทธิบัตรการเตรียมการใช้ high pressure homogenizer โดยบริษัท SkyePharma ประเทศอังกฤษ ส่วนการเตรียมด้วยเทคนิคไมโครอิมัลชัน ได้จดสิทธิบัตรโดยบริษัท Vectorpharma ประเทศอิตาลี

พินิตพล พรหมบุตร (2550) ศึกษาการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในตินด้วยวิธีโฮมอจินิกในเซชันความดันสูง พบว่าการใช้การใช้ความดันของเครื่องวิธีโฮมอจินิกในเซอร์ที่ 1500 บาร์ 3 รอบ พอล็อกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 5 และโซเดียมดีออกซีโคเลต ร้อยละ 0.125 เป็นสารลดแรงตึงผิว และเป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม ตามลำดับ อนุภาคที่ได้มีขนาดเล็ก ทำการบรรจุในซินร้อยละ 0.5-3 มีขนาดอยู่ระหว่าง 159-167 นาโนเมตร และมีค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าอยู่ระหว่าง -28.3 ถึง -29.2 มิลลิโวลต์ ซึ่งการบรรจุในซินร้อยละ 5 ลงในอนุภาคนาโนมีประสิทธิภาพการบรรจุสูงสุด ถึงร้อยละ 73.6 จากนั้นศึกษาการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* DMST 2871 และ *Lactobacillus platarum* TISTR 850 อนุภาคนาโนที่บรรจุในซินร้อยละ 2 จะมีแอกติวิตีทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีที่สุดและคงแอกติวิตีการยับยั้งเชื้อทดสอบได้นาน 20 วัน สำหรับ *Listeria monocytogenes* DMST 2871 และ 10 วัน สำหรับ *Lactobacillus platarum* TISTR 850

หยกฤทัย กุลวัฒนศาล (2551) ศึกษาเพื่อคัดเลือกสารออกฤทธิ์ ได้แก่ เซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (CPC), กรดแลคติก และแลคโตเฟอริน ที่เสริมฤทธิ์การทำงานของไนซินในการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 และ *E. coli* ATCC 25922 พบว่าเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์และไนซินสามารถทำงานร่วมกันแบบเสริมฤทธิ์บางส่วนได้ จากนั้นเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในตินด้วยวิธีโฮมอจินิกในเซชันความดันสูงแบบร้อนอนุภาคที่เตรียมได้มีขนาดอยู่ระหว่าง 129 ถึง 230 นาโนเมตร และมีค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าอยู่ระหว่าง -14.53 มิลลิโวลต์ และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด พบว่า อนุภาคมีลักษณะเป็นผลึกไขมัน พื้นผิวเรียบ สำหรับ

ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบของอนุภาคพบว่าอนุภาคสามารถยับยั้ง ยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 และ *E. coli* ATCC 25922 ได้ดีที่สุดที่ 4 องศาเซลเซียส

จากเหตุผลข้างต้นที่ว่า การเสริมประสิทธิภาพการทำงานของไนซิน ควรต้องมีการเสริมฤทธิ์การทำงานของไนซินเพื่อให้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ ในขณะเดียวกันก็ต้องเพิ่มความคงตัวให้กับโมเลกุลของไนซินไปพร้อมกันด้วย เพื่อให้การเสริมประสิทธิภาพการทำงานของไนซินเกิดได้อย่างสมบูรณ์ จึงทำให้ผู้วิจัยมีแนวคิด ที่จะเลือกวิธีใช้สารต้านจุลชีพซึ่งมีสมบัติทำลายเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบ หยกฤทัย กุลวัฒน์ศาล (2551) ศึกษาการทำงานของไนซินร่วมกับเซทิลไพริมิเดียมคลอไรด์ แลคโตเฟอริน และกรดแลคติกในการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 และ *E. coli* ATCC 25922 พบว่า เซทิลไพริมิเดียมคลอไรด์และกรดแลคติกมีการเสริมฤทธิ์บางส่วนกับไนซินต่อเชื้อทดสอบ ส่วนแลคโตเฟอรินมีการเสริมฤทธิ์กับไนซินต่อเชื้อทดสอบ แต่แลคโตเฟอรินมีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นสารออกฤทธิ์ที่ผู้วิจัยเลือกใช้คือ กรดแลคติกมาทำงานร่วมกับไนซิน เพื่อเสริมฤทธิ์การทำงานของไนซินให้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ เนื่องจากกรดแลคติกเป็นกรดที่สามารถรับประทานได้ หาง่าย ราคาถูก ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของอาหาร และมีรายงานว่าสามารถทำงานร่วมกับไนซินได้ และในด้านของการเพิ่มความคงตัวให้กับโมเลกุลของไนซินนั้น ทางผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะเลือกใช้อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งมาใช้ในการบรรจุไนซินและกรดแลคติก เนื่องจากพบว่าอนุภาคนาโนดังกล่าวนี้ มีข้อได้เปรียบในการควบคุมการปลดปล่อยได้นานและมีความปลอดภัยสามารถนำมาใช้ในอาหารได้ตามที่ได้กล่าวมาข้างต้น

จุดประสงค์ของงานวิจัยคือ การเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุไนซินร่วมกับกรดแลคติกด้วยวิธีโฮมอจีไนเซชันแบบร้อน เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่เตรียมได้ ศึกษาผลของอุณหภูมิ ความเป็นกรด-เบส และความเข้มข้นของเกลือที่มีผลต่อขนาดและประจุของอนุภาค และทดสอบแอกทิวิตีชีวภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบในอาหารเลี้ยงเชื้อและในน้ำมันของไนซินและกรดแลคติกที่เสริมฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบของไนซินที่ถูกปลดปล่อยออกมาเพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป โดยคาดว่าอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง จะช่วยเพิ่มความคงตัวให้ไนซินมีความเสถียรมากขึ้น ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของไนซินให้สามารถนำไปใช้ในอาหารได้หลากหลายประเภทส่งผลให้เกิดการพัฒนาภาคอุตสาหกรรมอาหารบนพื้นฐานของความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น MLS3020 ของบริษัท Sanyo, ญี่ปุ่น
2. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) รุ่น D06063 ของบริษัท Memmert, เยอรมนี
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (Waterbath shaker) รุ่น PL-08 ของบริษัท Memmert, เยอรมนี
4. เครื่องชั่ง รุ่น PG2002-S และ AG285 ของบริษัท Mettler toledo, สวิตเซอร์แลนด์
5. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, สหรัฐอเมริกา
6. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น D06061 ของบริษัท Memmert, เยอรมนี
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, ญี่ปุ่น
  - หัวปั่นเหวี่ยง (Rotor) ขนาดเล็ก รุ่น RA50J
  - หัวปั่นเหวี่ยง (Rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น RA228J
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น 6500 ของบริษัท Kubota, ญี่ปุ่น
  - หัวปั่นเหวี่ยง (Rotor) ขนาดกลาง รุ่น AG-506R
  - หัวปั่นเหวี่ยง (Rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น AG-2506
9. ตู้เขี่ยเชื้อรุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, ไทย
10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Lamda 25 ของบริษัท Perkin Elmer, สหรัฐอเมริกา
11. เครื่องฮอโมจีไนเซอร์ความเร็วสูง (High speed homogenizer) รุ่น Ultra turrax T25 ของบริษัท IKA werke, สหรัฐอเมริกา
12. เครื่องฮอโมจีไนเซอร์ความดันสูง (High pressure homogenizer) รุ่น Microfluidizer Processor M-110EH ของบริษัท Microfluidics, เยอรมนี

13. เครื่องนาโนไซเซอร์ (Nanosizer) รุ่น NanoZS ของบริษัท Malvern, สหราชอาณาจักร
14. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy) รุ่น S-3400 N ของบริษัท Hitachi, ญี่ปุ่น
15. เครื่องแยกสารโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC) รุ่น Water 1283 ของบริษัท Water, เยอรมนี
16. เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonicator) รุ่น SA203 ของบริษัท Misonix, สหรัฐอเมริกา
17. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, สหรัฐอเมริกา
18. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) รุ่น P10, P20, P200 และ P1000 ของบริษัท Gilson, ฝรั่งเศส
19. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, ญี่ปุ่น
20. หลอดอัลตราฟิลเทรชัน (Ultra-filtration tube) ที่สามารถคัดแยกโมเลกุลขนาดน้ำหนัก 100,000 ดัลตันได้ รุ่น Amicon Ultra 4 ของบริษัท Milipore, ไอร์แลนด์
21. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดไนลอนขนาดความกว้างรู 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร และ 25 มิลลิเมตร รุ่น DISMIC-25SC ของบริษัท Tokyo Rosh Kaisha, ญี่ปุ่น
22. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตต ขนาดความกว้างรู 0.2 และ 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร รุ่น DISMIC-25SC ของบริษัท Tokyo Rosh Kaisha, ญี่ปุ่น
23. จานเลี้ยงเชื้อพลาสติกปราศจากเชื้อ (Sterile petridish) Greiner bio-one, ออสเตรีย

### 3.2 เคมีภัณฑ์

1. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, สหรัฐอเมริกา
2. เพปโตน (peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, สหรัฐอเมริกา
3. น้ำตาลกลูโคส (glucose) ของบริษัท Merck, เยอรมนี
4. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท BDH Chemical, ออสเตรเลีย
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, เยอรมนี
6. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดเดคะไฮเดรต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) ของบริษัท Merck, เยอรมนี
7. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) ของบริษัท Merck, เยอรมนี
8. กรดฟอสฟอริก ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) ของบริษัท Merck, เยอรมนี
9. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Merck, เยอรมนี
10. ไบมันแข็งชนิดอิมิเตอร์ 900 (Imwitor 900) ของบริษัท Sasol, เยอรมนี
11. พอล็อกซาเมอร์ 188 (Poloxamer 188) ของบริษัท BASF, เยอรมนี
12. โซเดียมดีออกซีโคลเลต (Sodium deoxycholate) ของบริษัท Fluka, สวิตเซอร์แลนด์
13. กรดไตรฟลูโออะซีติก (Trifluoroacetic acid) ของบริษัท Fluka, สวิตเซอร์แลนด์
14. อะซีโตรไนไตรล์ (acetonitrile) ของบริษัท BDH Chemical, สหราชอาณาจักร
15. ไนซินผลิตจากเชื้อ *Lactococcus lactis* แอคทีวิตีชีวภาพ 1,168,000 IU ต่อกรัม (Nisin) ของบริษัท Sigma, สหราชอาณาจักร
16. กรดแลคติก (lactic acid) ของบริษัท Sigma, สหราชอาณาจักร

### 3.3 เชื้อที่ใช้ทดสอบ

1. *Escherichia coli* ATCC 25922
2. *Listeria monocytogenes* DMST17303



### 3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1. เตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุในซิน กรดแลคติก หรือในซินร่วมกับกรดแลคติก

ละลายในซินและกรดแลคติกลงในไขมันแข็งชนิดอิมิเตอร์ 900 ที่หลอมเหลว เติมสารละลายลดแรงตึงผิวพอล็อกซาเมอร์ 188 และโซเดียมดีออกซีโคเลตซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวร่วมลงไป ปรับปริมาตรด้วยน้ำร้อน ความเข้มข้น และปริมาณสารที่ใช้แสดงในตารางที่ 3.1 คนให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำปั่นด้วยเครื่องฮอโมจีไนเซอร์ความเร็วสูง(รูปที่ 3.1ก.) ที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้มีลักษณะเป็นอิมัลชัน จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเครื่องฮอโมจีไนเซอร์ความดันสูง (รูปที่ 3.1ข.) ที่ความดัน 1,500 บาร์ ทำซ้ำ 3 รอบเพื่อลดขนาดอนุภาคที่อุณหภูมิต่ำ 90 องศาเซลเซียส และตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิต่ำ สำหรับการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่ได้บรรจุสาร อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในซิน อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุกรดแลคติกและอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในซินร่วมกับกรดแลคติก เก็บใส่ขวดสีชา เพื่อทำการทดลองต่อไป



ก.



ข.

รูปที่ 3.1 ก. เครื่องฮอโมจีไนเซอร์ความเร็วสูง (High speed homogenizer) รุ่น Ultra turrax T25 ของบริษัท IKA werke, สหรัฐอเมริกา ข. เครื่องฮอโมจีไนเซอร์ความดันสูง (High pressure homogenizer) รุ่น Microfluidizer Processor M-110EH ของบริษัท Microfluidics, เยอรมนี

ตารางที่ 3.1 ปริมาณสารที่ใช้เตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งเพื่อบรรจุในซินกรดแลคติก หรือ  
ไขมันร่วมกับกรดแลคติก

ชนิดอนุภาคไขมัน แข็ง	ไขมัน (มิลลิกรัม)	กรดแลคติก (ไมโครลิตร)	อิมวิ เตอร์ 900 (กรัม)	พอล็อก ซาเมอร์ 188 (กรัม)	โซเดียมดี ออกซีโคเลต (มิลลิกรัม)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ปริมาตร ทั้งหมด (มิลลิลิตร)
อนุภาคไขมันแข็งที่ ไม่ได้บรรจุสาร	-	-	50.0	25	650	424.35	500
อนุภาคไขมันแข็ง บรรจุไขมัน	2,500	-	47.5	25	650	424.35	500
อนุภาคไขมันแข็ง บรรจุกรดแลคติก	-	125*	47.5	25	650	424.35	500
อนุภาคไขมันแข็ง บรรจุไขมันร่วมกับ กรดแลคติก	1,670	41.8*	47.5	25	650	424.35	500

หมายเหตุ \*ใช้จากสต็อกกรดแลคติก 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

## 2. การเลี้ยง และเตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการทดลอง

### 2.1 การเลี้ยงเชื้อ

*L. monocytogenes* DMST 17303 และ *E. coli* ATCC 25922 เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ  
PYG (ภาคผนวก) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง ในหลอดทดลอง ภาวะไม่เขย่า  
เก็บเชื้อตั้งต้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PYG แบบเฉียง (slant) ซึ่งทำได้โดยเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ

จากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PYG แบบเอียง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

## 2.2 การเตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการทดลอง

เมื่อต้องการนำเชื้อมาทดสอบ ให้นำเชื้อเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นำมาเขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PYG บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้ ถ่ายลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PYG ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PYG ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรได้เท่ากับ 0.179 สำหรับ *L. monocytogenes* DMST 17303 และ 0.2 สำหรับ *E. coli* ATCC 25922 จากนั้นให้นำมาทำการเจือจางอนุกรมแบบ 10 เท่า โดยเจือจางใน 0.85% NaCl จนได้ค่าการเจือจางเป็น  $10^{-3}$  เท่า เมื่อเทียบกับหลอดเริ่มต้น จะได้เชื้อที่มีปริมาณอยู่ในช่วง  $10^5$ - $10^6$  CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการจำลองปริมาณเชื้อปนเปื้อนในอาหารซึ่งจะใช้เป็นต้นแบบในการทดลอง

## 3. ทดสอบประสิทธิภาพการบรรจุในซิน กรดแลคติก หรือในซินร่วมกับกรดแลคติกด้วยอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง

นำอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่ได้บรรจุสารออกฤทธิ์ ที่บรรจุในซิน กรดแลคติก หรือในซินร่วมกับกรดแลคติกที่เตรียมได้ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ล้างอนุภาคนาโนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นชั่งอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่ได้บรรจุสารออกฤทธิ์ ที่บรรจุในซิน กรดแลคติก หรือในซินร่วมกับกรดแลคติกอย่างละ 50 มิลลิกรัม สกัด ในซินและกรดแลคติก ด้วยเมทานอล 1 มิลลิลิตร และตามด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไป และกรองด้วยชุดกรองที่มีขนาดของรู 0.45 ไมโครเมตร เก็บส่วนสารละลายปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำมาวิเคราะห์หาในซินและกรดแลคติกด้วยเครื่องแยกสารโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงแบบรีเวิร์สเฟส (reverse phase HPLC) คอลัมน์ตัวยัดเกาะ C-18 ซึ่งเทียบกับกราฟมาตรฐานของในซิน และกรดแลคติก คำนวณค่าประสิทธิภาพการบรรจุในซินและกรดแลคติก (Encapsulation Efficiency) จากสมการ

$$\text{ประสิทธิภาพการบรรจุ} = \frac{\text{ปริมาณของสารเริ่มต้นที่ทำการทดลองที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน} \times 100}{\text{ปริมาณของสารเริ่มต้นที่ทำการทดลองที่ใช้บรรจุลงในอนุภาค}}$$

4. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความคงตัวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุในซิน กรดแลคติก หรือในซินร่วมกับกรดแลคติก

นำอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่ได้บรรจุสารออกฤทธิ์ ที่บรรจุในซิน กรดแลคติก หรือในซินร่วมกับกรดแลคติก ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) ศึกษาความคงตัวของอนุภาคโดยการวัดขนาดและประจุบนผิวอนุภาคด้วยเทคนิค Dynamic Light Scattering (DLS) โดยใช้เครื่องนาโนไซเซอร์ ซึ่งการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ ได้แก่ นำอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่ได้บรรจุสาร ที่บรรจุในซิน กรดแลคติก หรือในซินร่วมกับกรดแลคติก อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้กระจายตัวด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 30 นาที นำตัวอย่างที่เตรียมได้ วัดขนาดและประจุบนผิวด้วยเครื่องนาโนไซเซอร์ (รูปที่ 3.2)



รูปที่ 3.2 เครื่องนาโนไซเซอร์ (Nanosizer) รุ่น NanoZS ของบริษัท Malvern, สหราชอาณาจักร

5. ศึกษาผลของความเป็นกรด-เบส ความเข้มข้นของเกลือและอุณหภูมิต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความคงตัวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุในซิน กรดแลคติก หรือในซินร่วมกับกรดแลคติก

นำอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่ได้บรรจุสารออกฤทธิ์ ที่บรรจุในซิน กรดแลคติก หรือในซินร่วมกับกรดแลคติก อย่างละ 10 มิลลิกรัม ใส่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ 1 มิลลิลิตร ที่มี pH 4 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 และ 1.0 และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

0.02 โมลาร์ 1 มิลลิลิตร ที่มี pH 7 มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 และ 1.0 นำสารละลายแขวนลอยข้างต้นไปทำให้กระจายตัวด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonicated) เป็นเวลา 2 นาที แบ่งใส่ในขวดสีชาโดยแบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ซึ่งชุดที่ 1 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและชุดที่ 2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 เดือน ทำการเก็บตัวอย่างวันที่ 0, 30 และ 60 ของการทดลอง เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) และศึกษาความคงตัวของอนุภาคโดยการวัดขนาด และประจุบนผิวอนุภาคด้วยเทคนิค Dynamic Light Scattering (DLS) โดยใช้เครื่องนาโนไฮเซเซอร์ ซึ่งการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ ได้แก่ นำอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่ได้บรรจุสาร ที่บรรจุในซิน กรดแลคติก หรือโนซินร่วมกับกรดแลคติก อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้กระจายตัวด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง เป็นเวลา 30 นาที นำตัวอย่างที่เตรียมได้วัดขนาดและประจุบนผิวด้วยเครื่องนาโนไฮเซเซอร์ (รูปที่ 3.2)

6. ทหาระยะเวลาที่โนซินและกรดแลคติกออกจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุโนซิน กรดแลคติก หรือโนซินร่วมกับกรดแลคติก

นำอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่ได้บรรจุสารออกฤทธิ์ ที่บรรจุโนซิน กรดแลคติก หรือโนซินร่วมกับกรดแลคติก โดยนำอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งแต่ละชนิดมาผสมกับอาหาร PYG จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลอง และแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง โดยชุดที่ 1นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และชุดที่ 2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (โดยสัดส่วนการเติมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งและสารออกฤทธิ์อิสระ แสดงในตารางที่ 3.2) ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วันในช่วงแรก และทุกๆ 7 วันในช่วงหลัง บ่มเป็นเวลา 3 เดือน ทุกๆ ครั้งของการเก็บตัวอย่างจะเติม *L. monocytogenes* DMST 17303 หรือ *E. coli* ATCC 25922 เจริญใน PYG ที่มีอายุ 16-18 ชั่วโมง นำมา 50 ไมโครลิตร เจือจางใน 0.85% NaCl ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้  $10^5$ - $10^6$  CFU ต่อ มิลลิลิตร และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 หรืออุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ทำการเจือจางใน 0.85% NaCl ให้มีความเข้มข้นเจือจางเป็น  $10^{-1}$ - $10^{-7}$  จากนั้นนำไปเกลี่ยเชื้อบน PYG plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตของ *L. monocytogenes* DMST 17303 หรือ *E. coli* ATCC 25922 โดยทำการเกลี่ยเชื้อซ้ำ 3 ครั้ง ตามวิธีข้างต้น เพื่อยืนยันความถูกต้องของผลการทดลอง

7. ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในชิน กรดแลคติก หรือในชินร่วมกับกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ PYG

นำอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในชิน กรดแลคติก ในชินร่วมกับกรดแลคติก ในชินอิสระ กรดแลคติกอิสระ และกรดแลคติกร่วมกับกรดแลคติกอิสระ ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PYG เติมเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 หรือ *E. coli* ATCC 25922 ที่มีจำนวนเซลล์  $10^5$ - $10^6$  CFU ต่อมิลลิลิตร ในอาหาร PYG (สัดส่วนการเติมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งและสารออกฤทธิ์อิสระ แสดงในตารางที่ 3.2) จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลองปลอดเชื้อ หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และชุดที่ 2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 60 วัน ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 22, 29, 36, 43, 49, 56 และ 60 วันของการทดลอง เก็บตัวอย่างแต่ละครั้งจะทำการเจือจางใน 0.85% NaCl ให้มีความเข้มข้นเจือจางเป็น  $10^{-1}$ - $10^{-7}$  โดยดูดสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร เกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PYG จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) โดยทำการเกลี่ยเชื้อซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำมาพลอตกราฟการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 หรือ *E. coli* โดยแกน Y คือ จำนวนเชื้อที่รอดชีวิต (log CFUต่อมิลลิลิตร) และแกน X คือ เวลาที่ทำการทดลอง (วัน)

8. ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในชิน กรดแลคติก หรือในชินร่วมกับกรดแลคติกในนมจืดและนมพร่องมันเนย

นำอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในชิน กรดแลคติก ในชินร่วมกับกรดแลคติก ในชินอิสระ กรดแลคติกอิสระ และกรดแลคติกร่วมกับกรดแลคติกอิสระ ผสมในนม UHT ชนิดจืดหรือพร่องมันเนย เติมเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 หรือ *E. coli* ATCC 25922 ที่มีจำนวนเซลล์  $10^5$ - $10^6$  CFU ต่อมิลลิลิตร ผสมในนม UHT (สัดส่วนการเติมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งและสารออกฤทธิ์อิสระ แสดงในตารางที่ 3.2) จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลองปลอดเชื้อ หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 วัน ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 22, 29, 36, 43, 49, 56 และ 60 วันของการทดลอง เก็บตัวอย่างแต่ละครั้งจะทำการเจือจางใน 0.85% NaCl ให้มีความเข้มข้นเจือจางเป็น  $10^{-1}$ - $10^{-7}$  โดยดูดสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร เกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PYG จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) โดยทำการเกลี่ยเชื้อซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำมาพลอตกราฟการ

ยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 หรือ *E. coli* โดยแกน Y คือ จำนวนเชื้อที่รอดชีวิต (log CFUต่อมิลลิลิตร) และแกน X คือ เวลาที่ทำการทดลอง (วัน)

ตารางที่ 3.2 ปริมาณสารและความเข้มข้นสุดท้ายของสารที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง  
แบคทีเรียของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซินร่วมกับกรดแลคติก

ชุดการทดลอง	ปริมาณสารที่ต้องการทดสอบ (ไมโครลิตร)						ปริมาณเชื้อ ที่ต้องการ ทดสอบ (มิลลิลิตร)	ปริมาณ อาหารเหลว PYG (มิลลิลิตร)
	ไนซิน (กรัม)	กรดแลคติก (ไมโครลิตร)	อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอิมิเตอร์ 900					
			ไม่มีการ บรรจุ	บรรจุไน ซิน	บรรจุ กรดแลคติก	บรรจุไนซิน และ กรดแลคติก		
ชุดควบคุม	-	-	-	-	-	-	100	900
ชุดการทดลองไนซินอิสระ	0.856	-	-	-	-	-	100	900
ชุดการทดลองกรดแลคติก อิสระ	-	50	-	-	-	-	100	900
ชุดการทดลองไนซินและ กรดแลคติกอิสระ	0.856	50	-	-	-	-	100	900
ชุดควบคุมลบ	-	-	25	-	-	-	100	900
ชุดการทดลองอนุภาคนาโน บรรจุไนซิน	-	-	-	169	-	-	100	900
ชุดการทดลองอนุภาคนาโน บรรจุกรดแลคติก	-	-	-	-	50	-	100	900
ชุดการทดลองอนุภาคนาโน บรรจุไนซิน ร่วมกับกรด แลคติก	-	-	-	-	-	21.09	100	900

หมายเหตุ วิธีการคำนวณค่าต่างๆ อยู่ในภาคผนวก จ



## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

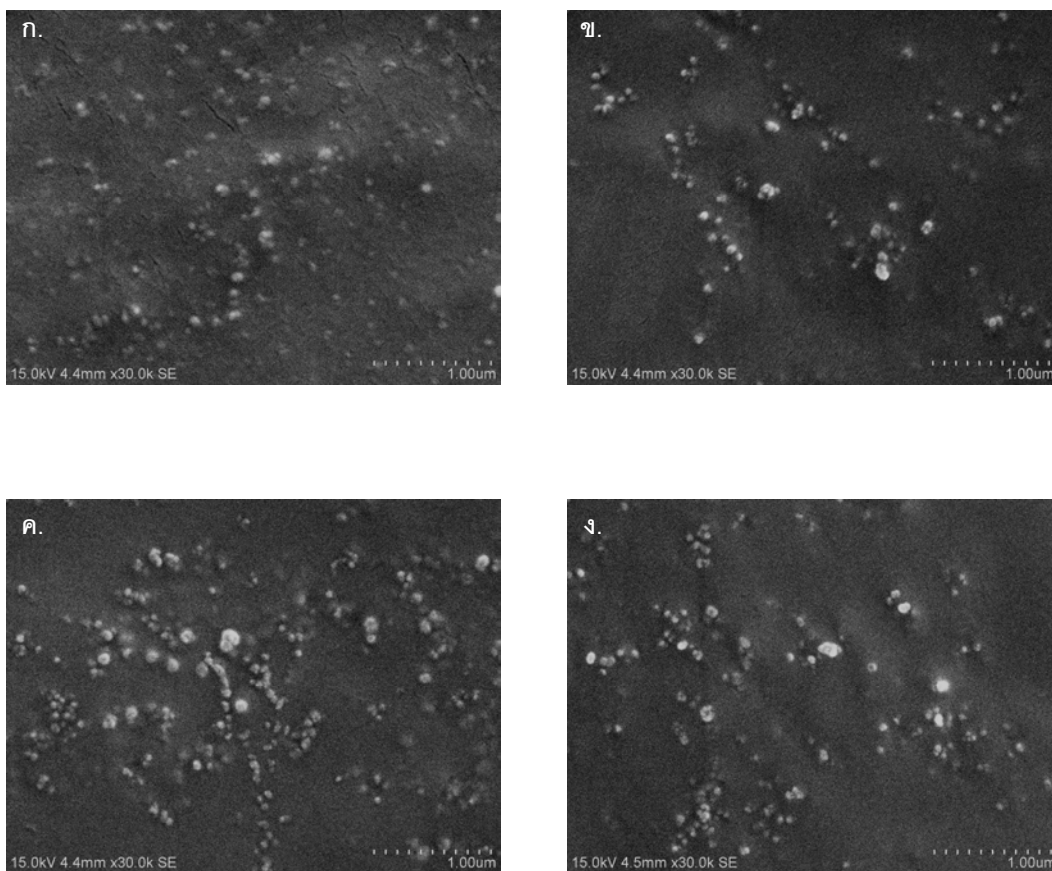
#### 4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง

จากการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในซิน กรดแลคติก และในซินร่วมกับกรดแลคติก ด้วยเครื่องฮอโมจีไนเซอร์ความดันสูง โดยใช้พอลิออกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และไซเตียมดีออกซีโคเลตร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม ตามลำดับ พบว่าอนุภาคที่เตรียมได้นั้นมีลักษณะเป็นครีม สีขาวขุ่น (รูปที่ 4.1)



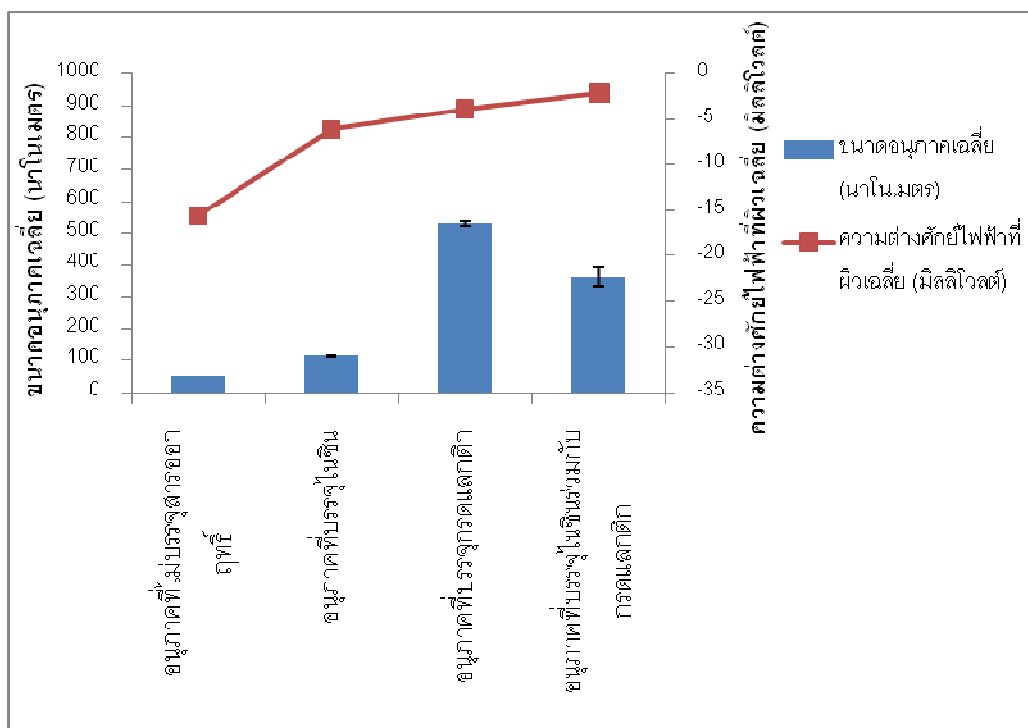
รูปที่ 4.1 อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง ที่เตรียมโดยวิธีเครื่องฮอโมจีไนเซอร์ความดันสูง ก. อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่มีการบรรจุสารออกฤทธิ์ ข. อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุในซิน ค. อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุกรดแลคติก และ ง. อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุในซินร่วมกับกรดแลคติก

เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าลักษณะของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่เตรียมได้ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่มีการบรรจุสารออกฤทธิ์ (ก.) อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุไนซิน (ข.) อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุกรดแลคติก (ค.) และ อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุไนซินร่วมกับกรดแลคติก (ง.) จะมีลักษณะรูปร่างคล้ายกัน กล่าวคือ มีลักษณะรูปร่างเป็นผลึกไขมัน พื้นผิวเรียบ ลักษณะคล้ายเกล็ดเลือด มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงประมาณ  $52.27 \pm 0.43$ ,  $113.80 \pm 1.63$ ,  $528.53 \pm 7.19$  และ  $362.86 \pm 28.05$  นาโนเมตร ตามลำดับ ดังที่แสดงในรูปที่ 4.2



**รูปที่ 4.2** ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง ที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ก. อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่มีการบรรจุสารออกฤทธิ์ ข. อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุไนซิน ค. อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุกรดแลคติก และ ง. อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุไนซินร่วมกับกรดแลคติก

เมื่อนำอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่เตรียมได้มาวิเคราะห์ขนาดด้วยเครื่องนาโนไซเซอร์ พบว่าอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่มีการบรรจุสารออกฤทธิ์ อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุในซินอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุกรดแลคติก และอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุในซินร่วมกับกรดแลคติก พบว่ามีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ  $52.27 \pm 0.43$ ,  $113.80 \pm 1.63$ ,  $528.53 \pm 7.19$  และ  $362.86 \pm 28.05$  นาโนเมตร ตามลำดับ ส่วนค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวเฉลี่ย (zeta-potential) เท่ากับ  $-15.56 \pm 0.81$ ,  $-6.12 \pm 0.11$ ,  $-3.83 \pm 0.30$  และ  $-2.07 \pm 0.02$  มิลลิโวลต์ ตามลำดับ โดยมีค่า PDI เท่ากับ 0.29, 0.22, 0.48 และ 0.01 (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 ขนาดเฉลี่ยและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนชนิดต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องนาโนไซเซอร์

#### 4.2 ทดสอบประสิทธิภาพการบรรจุไนซิน กรดแลคติก หรือไนซินร่วมกับกรดแลคติกด้วยอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง

เมื่อนำอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งทั้ง 4 ชนิดที่เตรียมได้ นำไปปั่นเหวี่ยง และล้างอนุภาคนาโนด้วยน้ำกลั่น จากนั้นชั่งอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งทั้ง 4 ชนิด อย่างละ 50 มิลลิกรัม สกัดไนซินและกรดแลคติกด้วยเมทานอล และตามด้วยกรดไฮโดรคลอริก จากนั้นคำนวณหาปริมาณไนซิน และกรดแลคติกที่บรรจุในอนุภาคนาโนจากกราฟมาตรฐาน พบว่าการบรรจุไนซินลงในอนุภาคจะมีประสิทธิภาพดีกว่าการบรรจุกรดแลคติกลงในอนุภาค โดยอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุไนซินที่เตรียมได้นั้น มีประสิทธิภาพการบรรจุไนซิน ได้ร้อยละ 66.20 ในขณะที่อนุภาคนาโนที่ทำการบรรจุกรดแลคติกมีประสิทธิภาพการบรรจุร้อยละ 58.62 และอนุภาคที่บรรจุไนซินร่วมกับกรดแลคติก พบว่าจะมีประสิทธิภาพในการบรรจุไนซินได้ร้อยละ 65.86 ในขณะที่มีประสิทธิภาพในการบรรจุกรดแลคติกได้ร้อยละ 59.57 (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพการบรรจุไนซิน กรดแลคติก และไนซินและกรดแลคติกในอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง

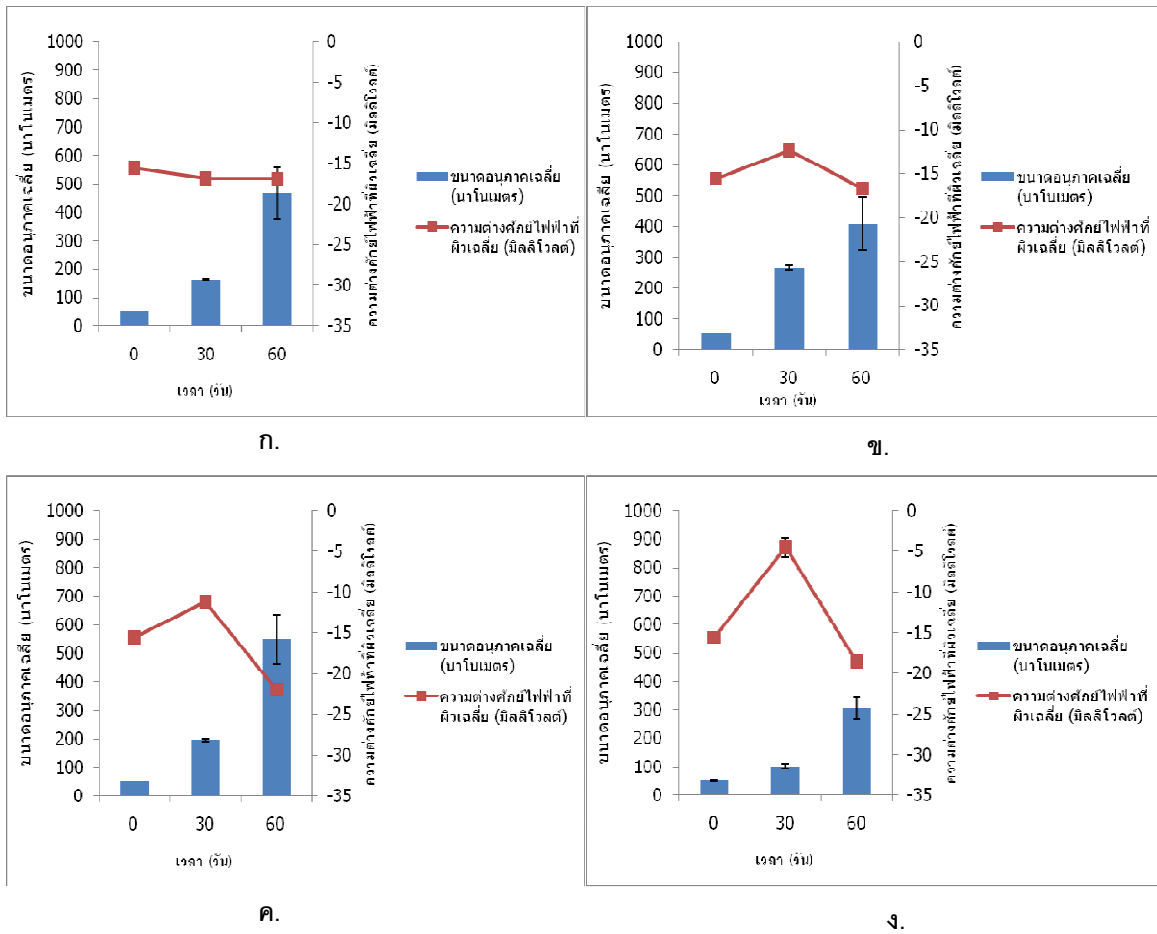
ชนิดอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง	สารออกฤทธิ์ที่บรรจุ	ปริมาณไนซินที่ใส่เริ่มต้น (กรัม)	ปริมาณกรดแลคติกที่ใส่เริ่มต้น (มิลลิกรัม)	ปริมาณไนซินเฉลี่ยตรวจพบจากเครื่อง HPLC (กรัม)	ปริมาณกรดแลคติกเฉลี่ยตรวจพบจากเครื่อง HPLC (มิลลิกรัม)	ประสิทธิภาพการบรรจุ (ร้อยละ)
ไนซิน	ไนซิน	2.5		1.65		66.20
กรดแลคติก	กรดแลคติก		62.5		36.64	58.62
ไนซินและกรดแลคติก	ไนซิน	1.67		1.10		65.86
	กรดแลคติก		20.9		12.45	59.57

#### 4.3 ศึกษาผลของ pH ความเข้มข้นของเกลือ และอุณหภูมิต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความคงตัวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่บรรจุสารออกฤทธิ์ ที่บรรจุในชินกรดแลคติก หรือในชินร่วมกับกรดแลคติก

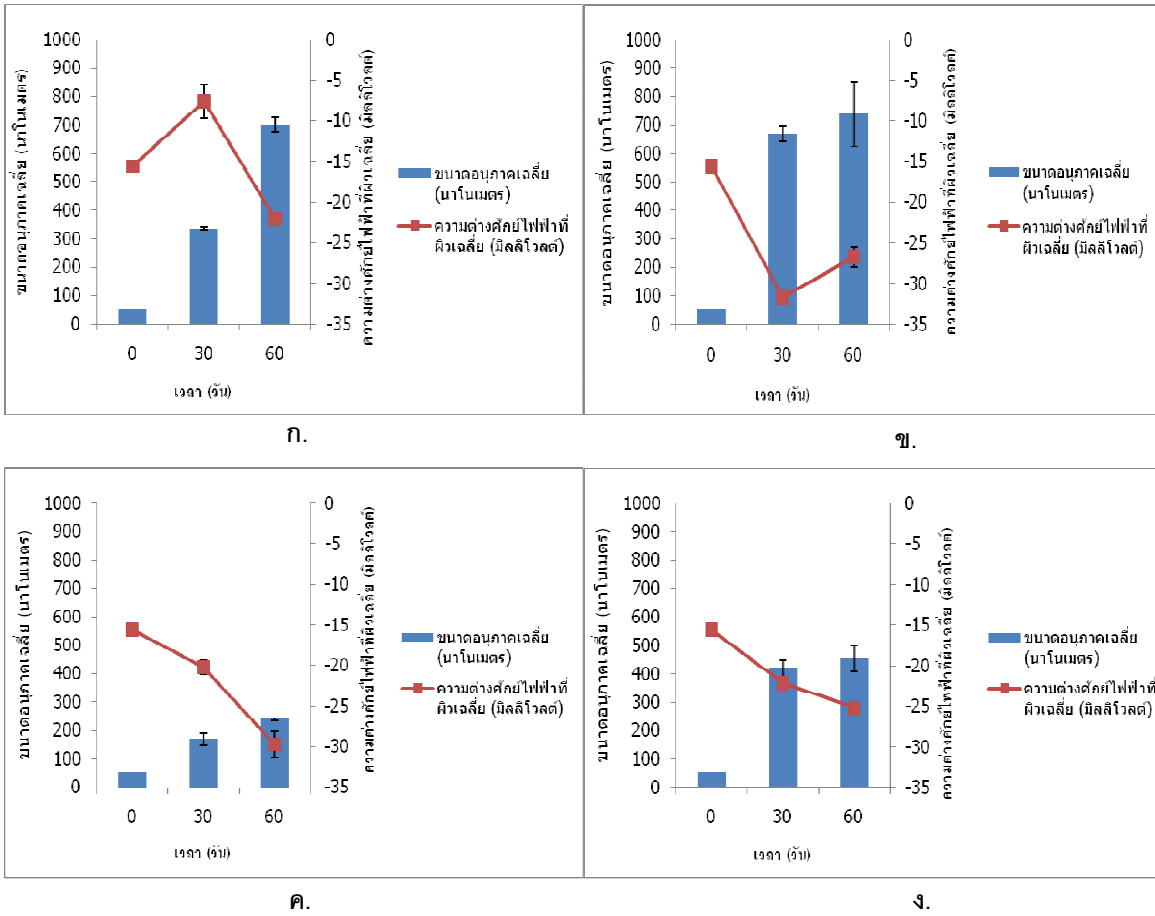
บ่มอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่บรรจุสารออกฤทธิ์ ที่บรรจุในชิน กรดแลคติก หรือในชินร่วมกับกรดแลคติก ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 และ 1.0 และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 และ 1.0 โดยแบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ชุดที่ 1 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และชุดที่ 2 เก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 เดือน โดยเก็บตัวอย่างที่ 0, 30 และ 60 วันของการทดลอง วิเคราะห์ด้วยเครื่องนาโนไซเซอร์ พบว่าอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่บรรจุสารออกฤทธิ์ ที่บรรจุในชิน กรดแลคติก หรือในชินร่วมกับกรดแลคติก จะมีการเปลี่ยนแปลงขนาด และความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวอนุภาคไปในลักษณะเดียวกัน คือ อนุภาคที่บ่มในบัฟเฟอร์ทุกภาวะจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับวันที่ 0 ของการทดลอง ส่วนการเปลี่ยนแปลงค่าความต่างศักย์ที่ผิวอนุภาคพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับวันที่ 0 ของการทดลอง

ผลของขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่บรรจุสารออกฤทธิ์ ซึ่งวันที่ 0 ของการทดลองขนาดอนุภาคเท่ากับ  $54.39 \pm 34.52$  นาโนเมตร ส่วนความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว เท่ากับ  $-11.21 \pm 9.54$  มิลลิโวลต์ เมื่อบ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ที่ 4 องศาเซลเซียสพบว่า ในวันที่ 30 และ 60 ของการทดลองขนาดของอนุภาคจะใหญ่เมื่อเทียบกับวันที่ 0 ของการทดลอง คือ  $165.33 \pm 2.59$  และ  $468.32 \pm 91.53$  นาโนเมตร สำหรับค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวจะมีค่าใกล้เคียงกัน คือ  $-16.83 \pm 0.37$  และ  $-16.86 \pm 0.15$  มิลลิโวลต์ ในวันที่ 30 และ 60 ของการทดลอง ตามลำดับ (รูปที่ 4.4ก.) ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ขนาดอนุภาคจะมีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อเทียบกับวันที่ 0 ของการทดลองเท่ากับ  $337.36 \pm 4.40$  และ  $702.00 \pm 25.57$  นาโนเมตร สำหรับความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว เท่ากับ  $-7.59 \pm 2.08$  และ  $-22.10 \pm 25.57$  มิลลิโวลต์ ในวันที่ 30 และ 60 ของการทดลอง ตามลำดับ (รูปที่ 4.5ก.) เมื่อบ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 ที่ 4 องศาเซลเซียส พบว่า ขนาดของอนุภาคจะมีขนาดใหญ่ขึ้น คือ  $265.43 \pm 6.21$  และ  $408.18 \pm 44.1$  นาโนเมตร ในขณะที่ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว คือ  $-12.36 \pm 0.50$  และ  $-16.7 \pm 1.05$  มิลลิโวลต์ ในวันที่ 30 และ 60 ของการทดลอง ตามลำดับ (รูปที่ 4.4ข.) ที่อุณหภูมิห้องขนาดอนุภาคจะมีขนาดใหญ่กว่าที่ 4 องศาเซลเซียส เท่ากับ  $670.33 \pm 25.79$  และ  $738.66 \pm 114.65$  นาโนเมตร สำหรับความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว เท่ากับ  $-31.70 \pm 0.36$  และ  $-26.76 \pm 1.25$  มิลลิโวลต์ ในวันที่ 30 และ 60

ของการทดลอง ตามลำดับ (รูปที่ 4.5ข.) ขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว เมื่อบ่มในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ที่ 4 องศาเซลเซียส ในวันที่ 60 ของการทดลอง พบว่า มีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น คือ  $549.13 \pm 85.76$  นาโนเมตร ในขณะที่อนุภาคน้อย อนุภาคใหญ่ขึ้นเท่ากับ  $239.20 \pm 3.73$  นาโนเมตร ส่วนความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว ที่ 4 องศาเซลเซียส จะเพิ่มขึ้นจาก  $-11.20 \pm 0.32$  เป็น  $-21.96 \pm 0.68$  มิลลิโวลต์ และที่อนุภาคน้อยให้ผลคล้ายคลึงกับที่ 4 องศาเซลเซียส คือ ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวเพิ่มสูงขึ้น จาก  $-20.20 \pm 0.90$  เป็น  $-29.73 \pm 1.59$  มิลลิโวลต์ ในวันที่ 30 และ 60 ของการทดลอง (รูปที่ 4.4ค. และรูปที่ 4.5ค.) และเมื่อบ่มในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 ที่ 4 องศาเซลเซียส ขนาดของอนุภาคในวันที่ 30 ของการทดลองจะใหญ่ขึ้นประมาณ 2 เท่าจากวันที่ 0 ของการทดลองซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับทุกภาวะการทดลอง คือ  $101.20 \pm 9.30$  นาโนเมตร ส่วนวันที่ 30 ของการทดลอง พบว่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวลดลงจากวันที่ 0 ของการทดลอง คือ  $-4.5 \pm 1.21$  มิลลิโวลต์ (รูปที่ 4.4ง.) สำหรับที่อนุภาคน้อยนั้นให้ผลการทดลองไปในลักษณะเดียวกันกับ 4 องศาเซลเซียส ขนาดและค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า อนุภาคในวันที่ 30 และ 60 ของการทดลองจะมีขนาดที่ใกล้เคียงกัน คือ  $419.60 \pm 29.35$  และ  $453.70 \pm 46.10$  นาโนเมตร และ  $-22.16 \pm 0.50$  และ  $-25.16 \pm 0.70$  มิลลิโวลต์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.5ง.)



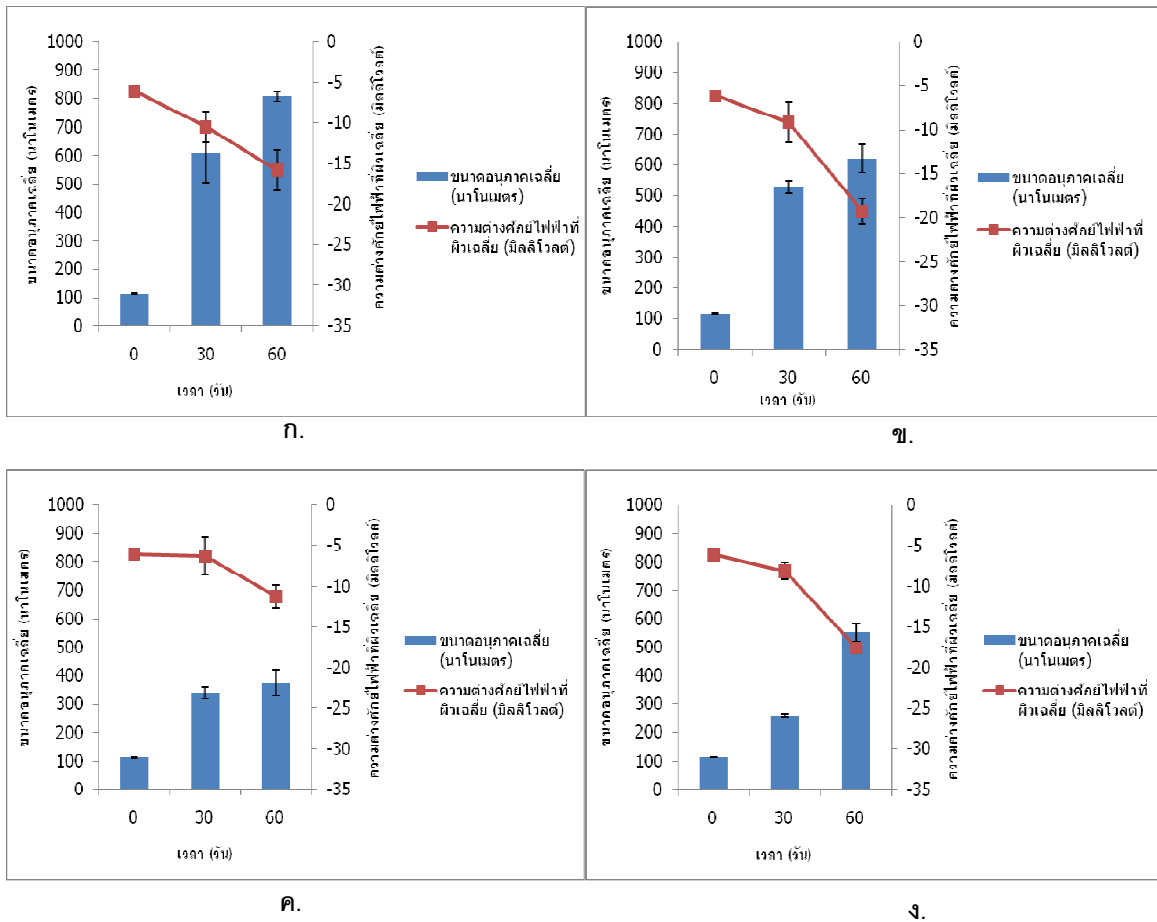
รูปที่ 4.4 ขนาดเฉลี่ยและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคที่ไม่บรรจุน้ำ บ่มที่ภาวะต่างๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส ก. สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ข. สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 ค. สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ง. สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1



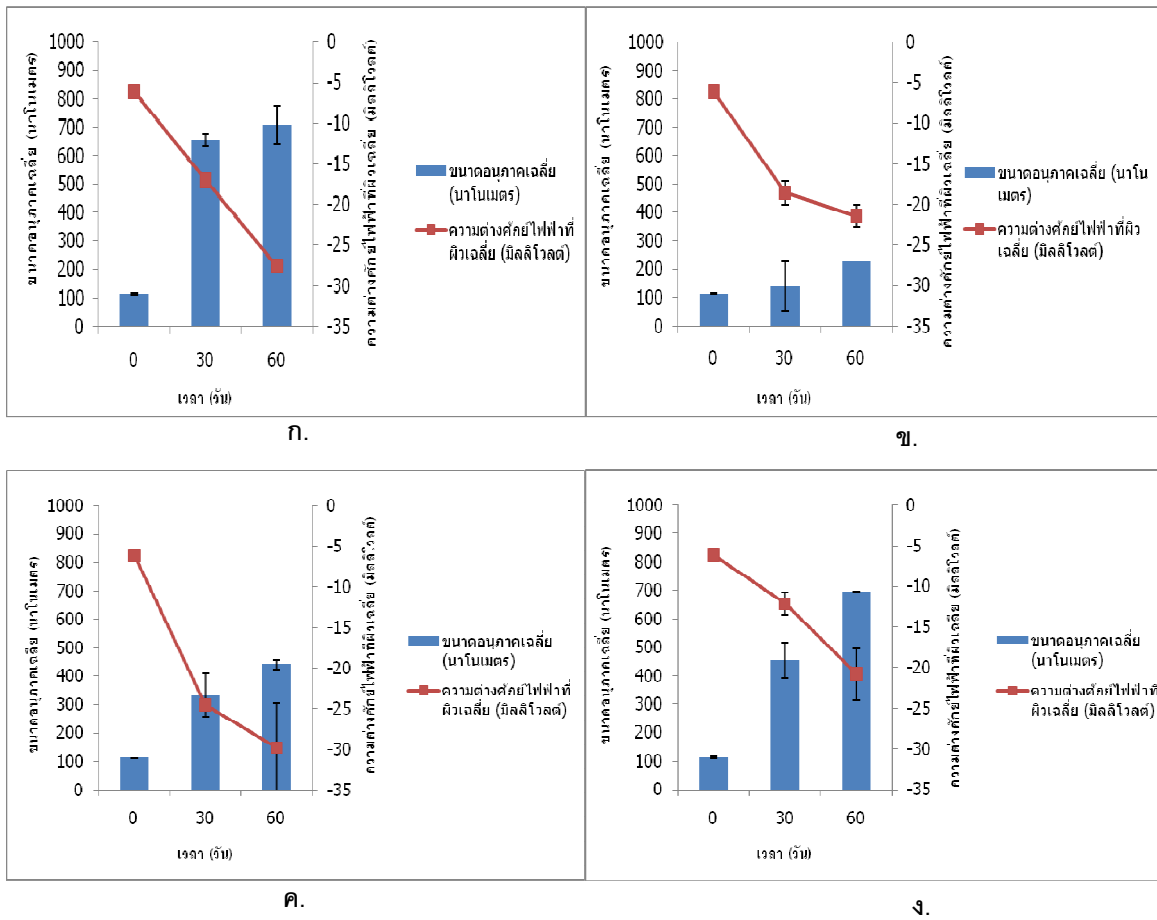
รูปที่ 4.5 ขนาดเฉลี่ยและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคที่ไม่บรรจุสาร ป๋มที่ภาวะต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง  
 ก. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5  
 ข. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 ค. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ง. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1



สำหรับขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุใน ซีน ในวันที่ 0 ของการทดลองขนาดอนุภาค เท่ากับ  $131.45 \pm 3.67$  นาโนเมตร ส่วนความต่าง ศักย์ไฟฟ้าที่ผิว เท่ากับ  $-8.85 \pm 4.79$  มิลลิโวลต์ เมื่อบ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ที่ 4 องศาเซลเซียส พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของขนาด อนุภาคมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับภาวะอื่นๆ คือ  $606.30 \pm 101.92$  และ  $806.63 \pm 16.45$  นาโน เมตร และความต่างศักย์ไฟฟ้า คือ  $-10.48 \pm 1.82$  และ  $-15.82 \pm 2.46$  มิลลิโวลต์ ในวันที่ 30 และ 60 ของการทดลอง (รูปที่ 4.6ก.) ที่อุณหภูมิห้อง ขนาดอนุภาคจะมีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งมีขนาดใหญ่ขึ้น คือ  $654.46 \pm 20.75$  และ  $706.56 \pm 67.45$  นาโนเมตร ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้ามีค่าเพิ่มขึ้น คือ  $-17.03 \pm 0.70$  และ  $-27.56 \pm 0.49$  มิลลิโวลต์ (รูปที่ 4.7ก.) เมื่อบ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โม ลาร์ ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 ที่ 4 องศาเซลเซียส พบว่า ขนาดของอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น คือ  $528.16 \pm 31.79$  และ  $620.00 \pm 17.33$  นาโนเมตร (รูปที่ 4.6ข.) ส่วนที่อุณหภูมิห้องนั้น พบว่า ขนาดของอนุภาคจะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับทุกภาวะ คือ  $139.53 \pm 88.3$  และ  $227.20 \pm 0.95$  นาโนเมตร ในวันที่ 30 และ 60 ของการทดลอง (รูปที่ 4.7ข.) และเมื่อบ่มใน สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ที่ 4 องศา เซลเซียส การเปลี่ยนแปลงขนาดของอนุภาคในวันที่ 30 และ 60 ของการทดลอง มีค่าไม่แตกต่างกัน มากนัก คือ  $340.33 \pm 20.77$  และ  $375.03 \pm 45.62$  นาโนเมตร (รูปที่ 4.6ค.) เมื่อบ่มในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 ที่ 4 องศาเซลเซียสขนาดอนุภาคมีการ เปลี่ยนแปลงน้อยกว่าที่อุณหภูมิห้อง โดยที่ 4 องศาเซลเซียส ขนาดอนุภาค เท่ากับ  $262.03 \pm 5.94$  และ  $552.00 \pm 31.73$  นาโนเมตร ส่วนที่อุณหภูมิห้อง คือ  $453.86 \pm 62.44$  และ  $693.93 \pm 1.93$  นาโน เมตร (รูปที่ 4.6ง. และ 4.7ง.)

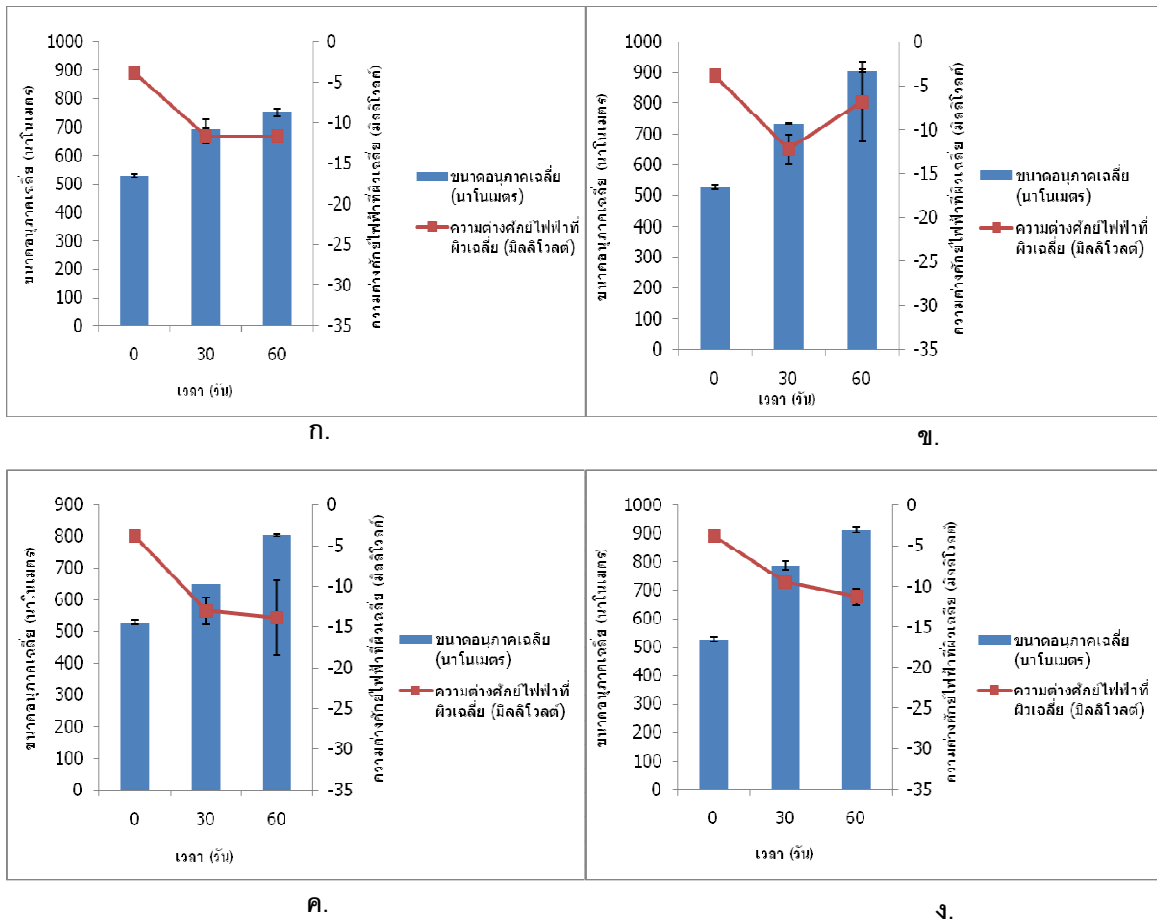


**รูปที่ 4.6** ขนาดเฉลี่ยและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคในซิงค์ บ่มที่ภาวะต่างๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส  
 ก. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 กลีโกลิไซด์เดี่ยวร้อยละ 0.5 ข. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 กลีโกลิไซด์เดี่ยวร้อยละ 1 ค. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 กลีโกลิไซด์เดี่ยวร้อยละ 0.5 ง. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 กลีโกลิไซด์เดี่ยวร้อยละ 1

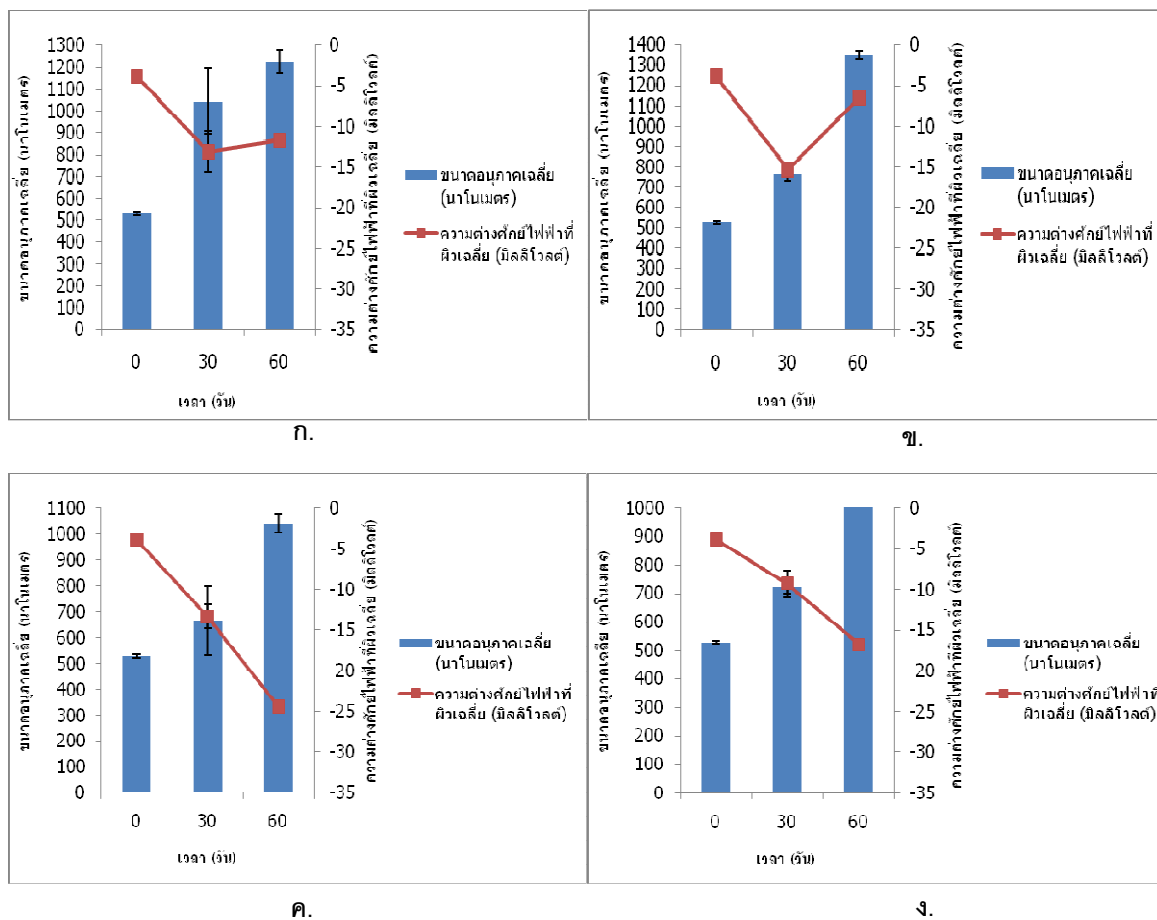


รูปที่ 4.7 ขนาดเฉลี่ยและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคไนซิน ปุ่มที่ภาวะต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง  
 ก. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 กลีโกลิเซอแลคโคโลไรด์ร้อยละ 0.5 ข. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 กลีโกลิเซอแลคโคโลไรด์ร้อยละ 1 ค. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 กลีโกลิเซอแลคโคโลไรด์ร้อยละ 0.5 ง. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 กลีโกลิเซอแลคโคโลไรด์ร้อยละ 1

สำหรับขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุกรดแลคติกในวันที่ 0 ของการทดลองขนาดอนุภาค เท่ากับ  $537.58 \pm 9.40$  นาโนเมตร ส่วนความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว เท่ากับ  $-7.51 \pm 5.01$  มิลลิโวลต์ เมื่อบ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ที่ 4 องศาเซลเซียส ที่ 4 องศาเซลเซียส พบว่าในวันที่ 30 และ 60 ของการทดลอง ขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว มีการเปลี่ยนแปลงไม่แตกต่างกัน คือ  $692.33 \pm 33.13$  และ  $751.93 \pm 13.41$  นาโนเมตร ส่วนค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าจะไม่แตกต่างกัน คือ  $-11.60 \pm 0.95$  และ  $-11.63 \pm 0.45$  มิลลิโวลต์ (รูปที่ 4.8ก.) และที่อุณหภูมิห้องขนาดของอนุภาค จะเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ของการทดลอง คือ  $1,043 \pm 150.51$  และ  $1,226.23 \pm 51.31$  นาโนเมตร และค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวจะมีค่าลดลง คือ  $-13.10 \pm 2.52$  และ  $-11.70 \pm 0.75$  มิลลิโวลต์ (รูปที่ 4.9ก.) สำหรับ บ่มอนุภาคในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์บัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 ที่ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องนั้น ขนาดอนุภาคจะมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย คือ มีขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว พบว่า ที่ 4 องศาเซลเซียส มีค่าลดลง 2 เท่า คือ  $-12.23 \pm 1.95$  และ  $-6.83 \pm 0.41$  มิลลิโวลต์ ส่วนที่ อุณหภูมิห้องมีค่า เท่ากับ  $-15.33 \pm 0.15$  และ  $-6.48 \pm 0.70$  มิลลิโวลต์ ในวันที่ 30 และ 60 ของการทดลอง ตามลำดับ (รูปที่ 4.8ข. และรูปที่ 4.9ข.) บ่มอนุภาคในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์บัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 พบว่าขนาดอนุภาคในวันที่ 60 ของการทดลองจะแตกต่างกัน ระหว่างที่ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง โดยที่ 4 องศาเซลเซียส มีขนาดอนุภาค  $804.16 \pm 4.06$  นาโนเมตร อุณหภูมิห้องมีขนาดอนุภาค  $1,043.03 \pm 36.98$  นาโนเมตร (รูปที่ 4.8ค. และรูปที่ 4.9ค.) บ่มอนุภาคในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์บัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 ขนาดอนุภาคจะมีขนาดใหญ่ขึ้น ที่ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ส่วนค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า จะมีค่าเพิ่มขึ้นทั้ง 2 อุณหภูมิ (รูปที่ 4.8ง. และรูปที่ 4.9ง.)



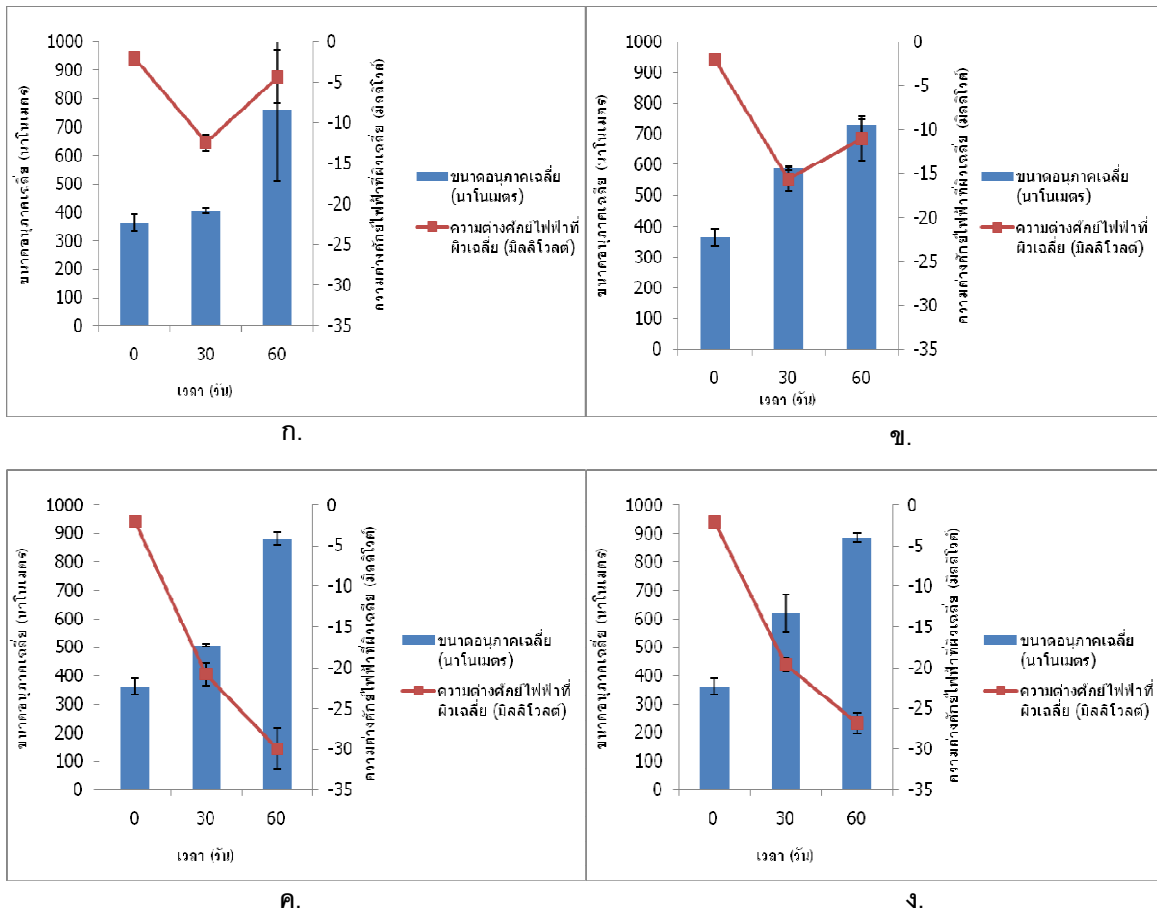
**รูปที่ 4.8** ขนาดเฉลี่ยและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคกรดแลคติก บ่มที่ภาวะต่างๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส ก. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ข. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 ค. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ง. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1



รูปที่ 4.9 ขนาดเฉลี่ยและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคกรดแลคติก บ่มที่ภาวะต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 กลีโกลิไซด์เดียวมกลอไรด์ร้อยละ 0.5 ข. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 กลีโกลิไซด์เดียวมกลอไรด์ร้อยละ 1 ค. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 กลีโกลิไซด์เดียวมกลอไรด์ร้อยละ 0.5 ง. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 กลีโกลิไซด์เดียวมกลอไรด์ร้อยละ 1

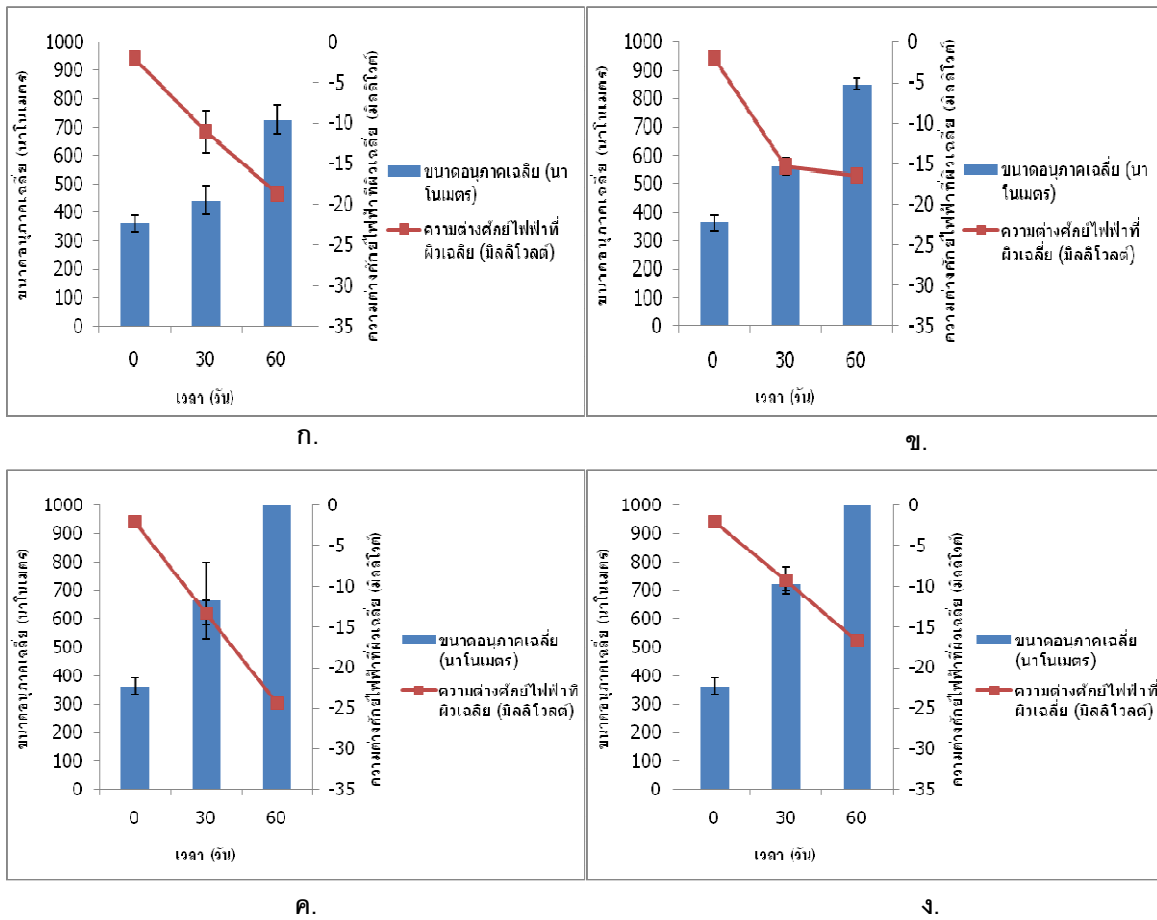
ขนาดอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในซินรวมกับกรดแลคติกในวันที่ 0 ของการทดลองขนาดอนุภาค เท่ากับ  $395.18 \pm 14.53$  นาโนเมตร ส่วนความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว เท่ากับ  $-5.49 \pm 2.54$  มิลลิโวลต์ เมื่อบ่มอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 พบว่า ที่ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง ขนาดของอนุภาคจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเพียงเล็กน้อยในวันที่ 30 ของการทดลอง คือ  $405.83 \pm 9.80$  และ  $443.10 \pm 50.51$  นาโนเมตร (รูปที่ 4.10ก. และรูปที่ 4.11ก.) เมื่อบ่มอนุภาคร่วมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 ให้ผลการทดลองที่คล้ายคลึงกันทั้งที่ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง พบว่ามีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อเทียบกับวันที่ 0 ของการทดลอง ส่วนค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว ที่ 4 องศาเซลเซียส จะพบว่าจะมีค่าลดลง คือ  $-15.63 \pm 1.10$  และ  $-11.01 \pm 2.17$  มิลลิโวลต์ (รูปที่ 4.10ข. และรูปที่ 4.11ข.) และเมื่อบ่มอนุภาคในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 และร้อยละ 1 ที่ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ขนาดและค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิว จะมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับวันที่ 0 ของการทดลอง (รูปที่ 4.10ค. ถึง ง. และรูปที่ 4.11ข. ถึง ง.)

ผลการทดลองทั้งหมดนี้จะเห็นได้ว่า ขนาดอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งทั้ง 4 ชนิด ในทุกภาวะ จะมีขนาดใหญ่ขึ้นส่งผลทำให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวเพิ่มขึ้นนั้น จึงเป็นสาเหตุทำให้อนุภาคจับกลุ่มกันมากขึ้น



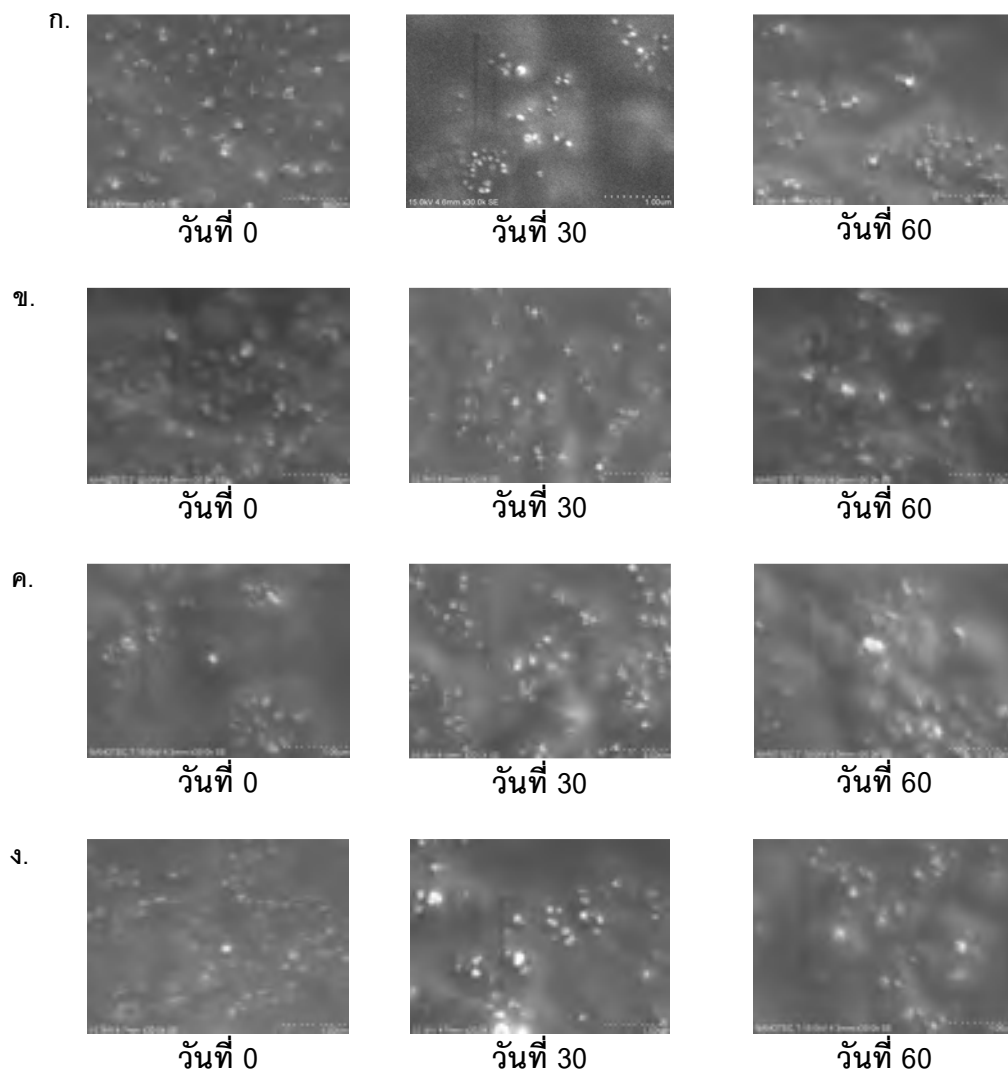
รูปที่ 4.10 ขนาดเฉลี่ยและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคไนซินและกรดแลคติก บ่มที่ภาวะต่างๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส ก. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ข. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 ค. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ง. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1



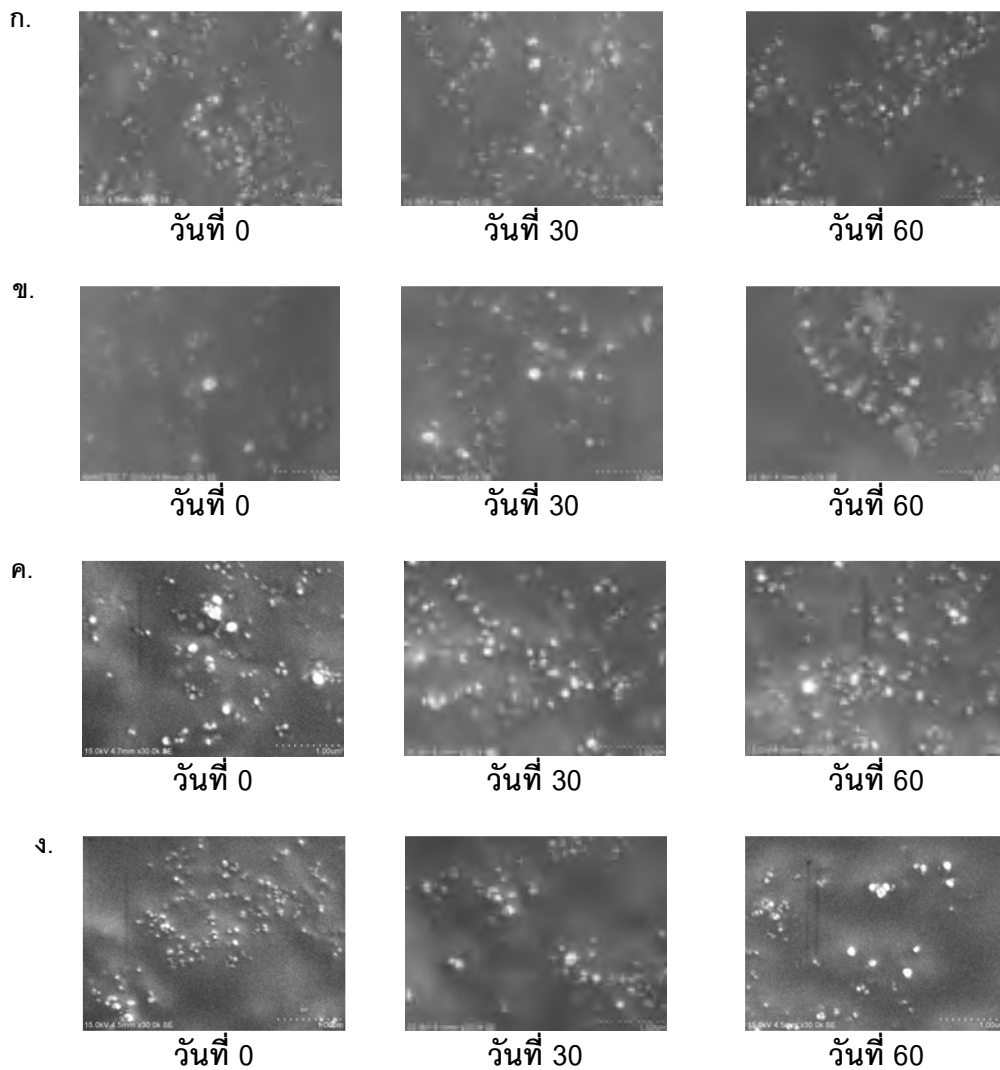


รูปที่ 4.11 ขนาดเฉลี่ยและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคไนซินและกรดแลคติก บ่มที่ภาวะต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง ก. สารละลายฟอสเฟตบัพเฟออร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ข. สารละลายฟอสเฟตบัพเฟออร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 ค. สารละลายฟอสเฟตบัพเฟออร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ง. สารละลายฟอสเฟตบัพเฟออร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1

จากผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่บรรจุสารออกฤทธิ์ ที่บรรจุในซิน กรดแลคติก หรือในซินร่วมกับกรดแลคติก ด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าลักษณะรูปร่างของอนุภาคมีการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคเพียงเล็กน้อย ซึ่งผลการทดลองของอนุภาคทั้ง 4 ชนิด มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกัน คือ มีลักษณะรูปร่างกลมเป็นผลึกไขมัน พื้นผิวเรียบ ซึ่งขนาดของอนุภาคจะมีลักษณะใหญ่ขึ้นเมื่อบ่มถึงวันที่ 60 ของการทดลอง ยกตัวอย่าง เช่น อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในซินร่วมกับกรดแลคติกในภาวะต่างๆ (รูปที่ 4.12 ถึง 4.13)



รูปที่ 4.12 อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในซินร่วมกับกรดแลคติกบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ก. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 กลีโกลิโคเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ข. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 กลีโกลิโคเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 ค. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 กลีโกลิโคเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ง. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 กลีโกลิโคเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1



**รูปที่ 4.13** อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในซินร่วมกับกรดแลคติกบ่ม ที่อุณหภูมิห้อง ก. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ข. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 4 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 ค. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ง. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1

#### 4.4 หาระยะเวลาที่โนซินและกรดแลคติกออกจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุโนซิน กรดแลคติก หรือโนซินร่วมกับกรดแลคติก

นำอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่ได้บรรจุสาร ที่บรรจุโนซิน กรดแลคติก หรือโนซินร่วมกับกรดแลคติก นำมาผสมกับอาหาร PYG จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลองนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งละลายอยู่และสารออกฤทธิ์อิสระละลายอยู่ ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วันในช่วง 14 วันแรก และทุกๆ 7 วันในช่วงหลังจากวันที่ 15 เป็นต้นไป ป้อนเป็นเวลา 3 เดือน ทุกๆ ครั้งของการเก็บตัวอย่างจะเติม *L. monocytogenes* DMST 17303 หรือ *E. coli* ATCC 25922 ซึ่งการทดลองนี้เป็นการหาระยะเวลาที่โนซินและกรดแลคติกถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุโนซิน กรดแลคติก หรือโนซินร่วมกับกรดแลคติกเปรียบเทียบกับการใช้ โนซิน กรดแลคติก หรือโนซินร่วมกับกรดแลคติกอิสระต่อ *L. monocytogenes* DMST 17303 หรือ *E. coli* ATCC 25922 เป็นเวลานาน 93 วัน สำหรับอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 58 วัน สำหรับอุณหภูมิห้อง โดยชุดควบคุม คือ ชุดการทดลองที่ไม่ได้เติมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่บรรจุสารออกฤทธิ์ ที่เติม *L. monocytogenes* DMST 17303 หรือ *E. coli* ATCC 25922

ผลการทดสอบแยกทีวีสิวภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 ที่ 4 องศาเซลเซียส ในวันที่ 5 ของการทดลอง พบว่าโนซินอิสระ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้เป็นอย่างดีมีประสิทธิภาพ โดยสามารถลดปริมาณ *L. monocytogenes* DMST 17303 จนไม่สามารถตรวจพบเชื้อทดสอบได้ แต่โนซินร่วมกับกรดแลคติกอิสระสามารถยับยั้งเชื้อได้ดี คือในวันที่ 15 ของการทดลองสามารถลดปริมาณเชื้อลงได้มากที่สุดประมาณร้อยละ 80 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่กรดแลคติกอิสระนั้น ในช่วงวันที่ 1 ถึง 10 ของการทดลอง พบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อได้ประมาณร้อยละ 60 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับโนซิน และโนซินร่วมกับกรดแลคติกอิสระ กรดแลคติกอิสระมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้น้อยที่สุด สำหรับการทดลองที่ใช้อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุโนซิน กรดแลคติก หรือโนซินร่วมกับกรดแลคติกนั้น ในช่วง 30 วันแรกของการทดลอง พบว่าอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งทั้ง 3 ชนิดจะกีดการเจริญของเชื้อทดสอบ ซึ่งลดปริมาณลงประมาณร้อยละ 40 สำหรับช่วงจากวันที่ 30 ของการทดลองเป็นต้นไป พบว่าอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งทั้ง 3 ชนิดสามารถลดปริมาณเชื้อทดสอบลงประมาณร้อยละ 40 ถึง 60 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยเฉพาะอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุโนซินเพียงอย่างเดียว สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้มากที่สุด คือร้อยละ 80 แสดงให้เห็นว่าโนซินถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งได้อย่างต่อเนื่อง และสะสมเพิ่มมากขึ้นจนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดีกว่าอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุกรดแลคติก และที่บรรจุโนซินร่วมกับกรด

แลคติก ซึ่งค่าความเข้มข้นของไนซินที่น้อยที่สุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้ คือ 1,000 IU ต่อมิลลิลิตร (หยกฤทัย กุลวัฒน์ศาล, 2551) แสดงให้เห็นว่าไนซินอาจจะถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งใกล้เคียงกับค่า MIC สำหรับอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซินร่วมกับ กรดแลคติกจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ประมาณร้อยละ 70 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าไนซินและกรดแลคติกถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอย่างช้าๆ และต่อเนื่อง ดังแสดงในรูปที่ 4.14ก.

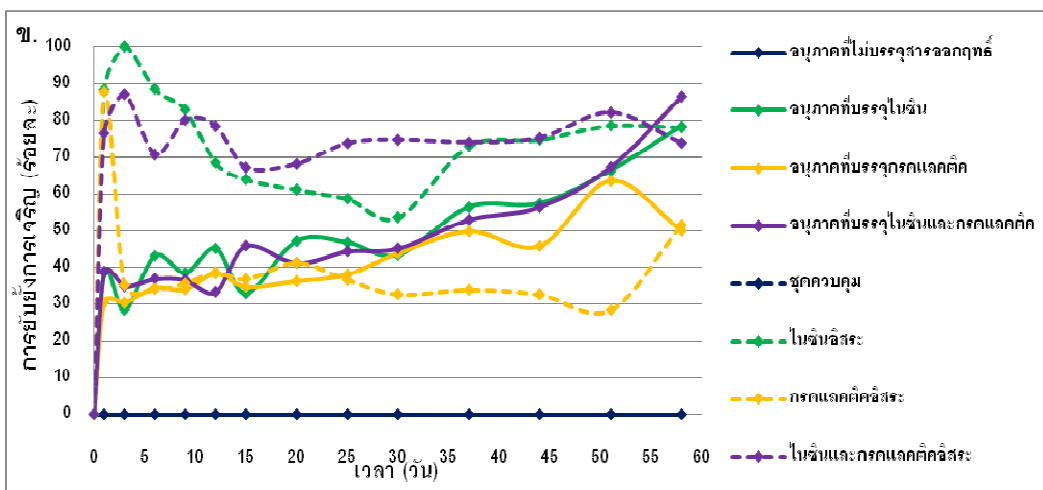
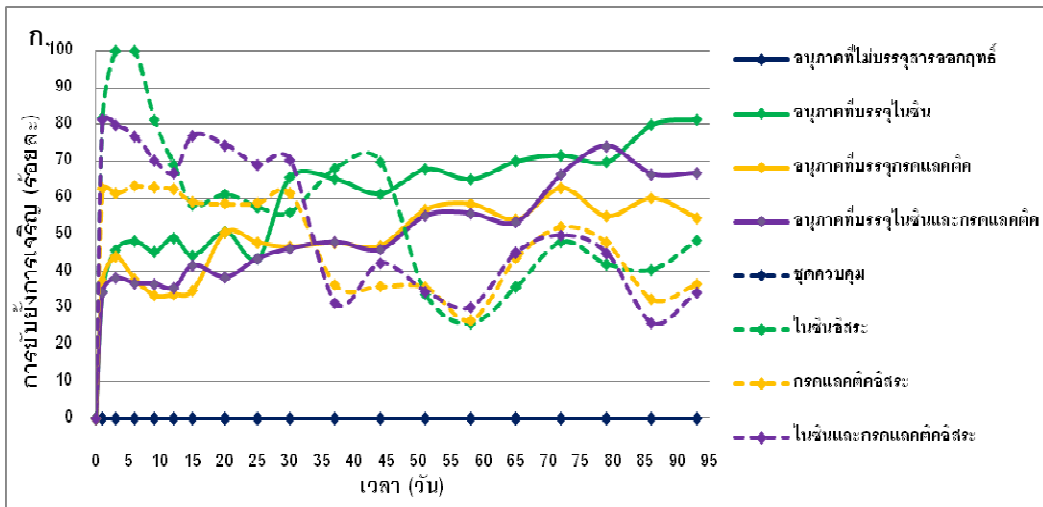
สำหรับแอกทิวิตีชีวภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าในช่วง 1 ถึง 7 วันของการทดลองไนซินอิสระ และไนซินร่วมกับกรดแลคติกในรูปแบบอิสระนั้น จะให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีกว่าการใช้อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซิน กรดแลคติก และไนซินร่วมกับกรดแลคติก ยกเว้นการใช้กรดแลคติกอิสระที่ให้ผลการยับยั้งที่ใกล้เคียงกับอนุภาคนาโนทั้ง 3 ชนิด ในขณะที่อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซิน กรดแลคติก และไนซินร่วมกับกรดแลคติกในช่วง 30 วันแรกของการทดลองจะให้ผลการยับยั้งเชื้อที่ใกล้เคียงกัน คืออนุภาคนาโนทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 ประมาณร้อยละ 40 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่หลังจากวันที่ 30 ของการทดลองเป็นต้นไป จะเห็นได้ว่าสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถคงแอกทิวิตีการยับยั้งเชื้อได้นานตลอดระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง 58 วัน แสดงให้เห็นว่าไนซินและกรดแลคติกถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอย่างช้าๆ และสะสมเพิ่มมากขึ้นจนสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังแสดงในรูปที่ 4.14 ข.

สำหรับผลการทดลองที่ใช้ *E. coli* ATCC 25922 ที่ 4 องศาเซลเซียส พบว่าไนซิน กรดแลคติก หรือไนซินร่วมกับกรดแลคติกอิสระ จะสามารถยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ดีกว่าใช้ในไนซิน กรดแลคติก หรือไนซินร่วมกับกรดแลคติกบรรจุในอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง โดยพบว่าการใช้ ไนซินอิสระจะสามารถยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ได้เพียงเล็กน้อย คือทำให้เชื้อลดปริมาณลงได้ประมาณร้อยละ 30 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่หลังจากวันที่ 30 ของการทดลองเป็นต้นไป ไนซินอิสระจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบลดลง จะเห็นได้ว่าปริมาณเชื้อจะเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 75 ของการทดลอง ในขณะที่การใช้อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซินร่วมกับกรดแลคติก จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพยับยั้งการเชื้อทดสอบได้ดีที่สุดคือสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ตั้งแต่วันที่ 35 ของการทดลองและคงแอกทิวิตีชีวภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ตลอดระยะเวลา 93 วัน ซึ่งไนซินและกรดแลคติกจะถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอย่างต่อเนื่องจนสะสมในปริมาณที่มากที่สุดที่ยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยค่า MIC ของไนซินคือ 1,000 IU ต่อมิลลิลิตร และค่า MIC ของกรดแลคติกคือ 500 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร (หยกฤทัย กุลวัฒน์ศาล, 2551) โดยไนซินและกรดแล

คติอาจจะถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอย่างช้าๆ จนสะสมในปริมาณมากพอที่ใกล้เคียงกับค่า MIC ส่วนอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในซินเพียงอย่างเดียวจะสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เพียงร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งค่า MIC ของไนซินต่อ *E. coli* ATCC 25922 คือ 10,000 IU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูง จึงทำให้สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เพียงบางส่วนเท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 4.15ก.

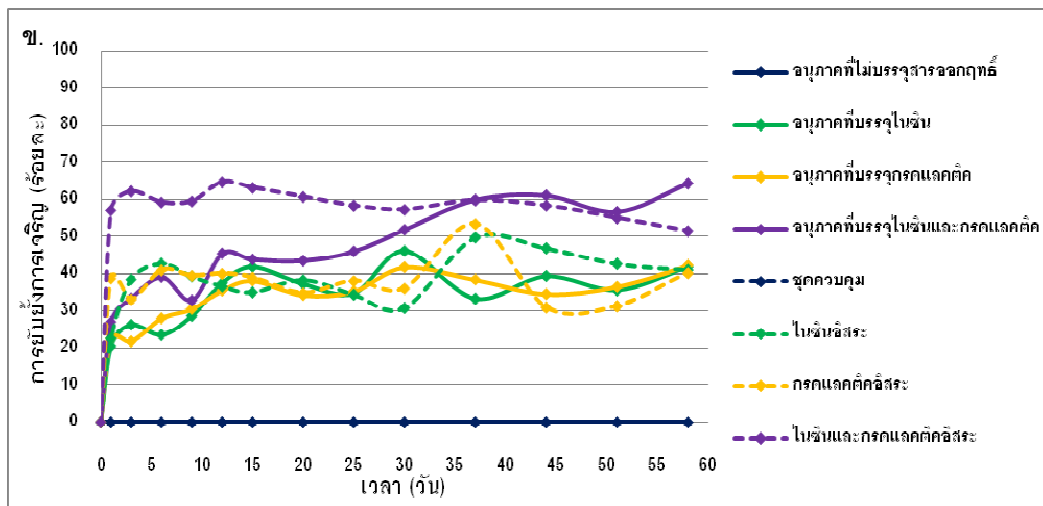
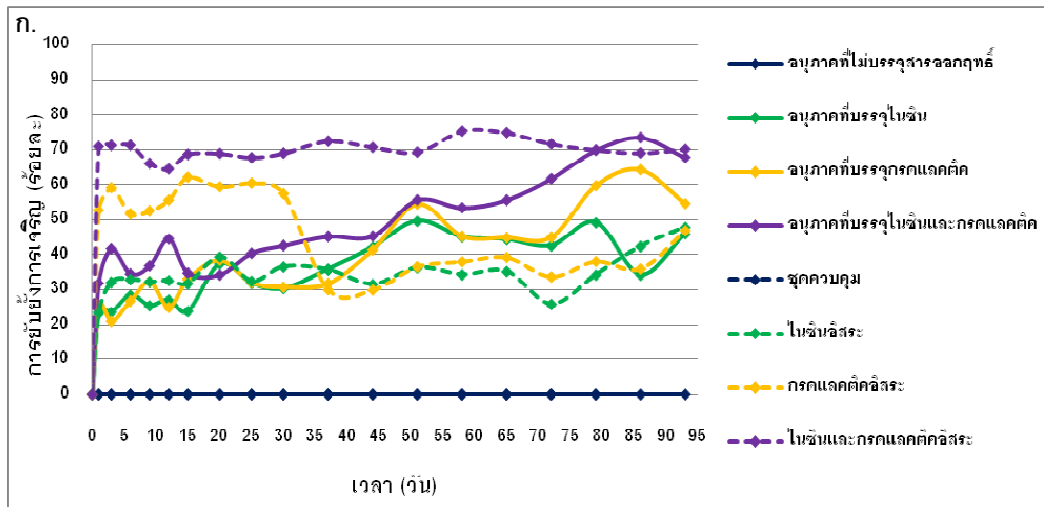
สำหรับแอกทิวิตีชีวภาพในการยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ที่อุณหภูมิห้องนั้น พบว่าการใช้กรดแลคติก และไนซินร่วมกับกรดแลคติกในรูปแบบอิสระ ให้ผลการยับยั้งเชื้อได้ไม่ดัดนักเมื่อเทียบกับการทดลองที่ 4 องศาเซลเซียส และไนซินร่วมกับกรดแลคติกอิสระก็ยังคงมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับไนซิน และกรดแลคติกอิสระ คือสามารถลดปริมาณเชื้อทดสอบได้มากประมาณร้อยละ 60 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ตั้งแต่วันที่ 1 ของการทดลอง และสามารถคงแอกทิวิตีการยับยั้งเชื้อได้นานตลอดระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง 93 วัน เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่หลังจากวันที่ 30 เป็นต้นไป พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุในซินร่วมกับกรดแลคติกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยในช่วงวันที่ 1 ถึง 15 ของการทดลอง จะเกิดการเจริญของเชื้อทดสอบ ส่วนวันที่ 15 ถึง 30 ของการทดลองเชื้อทดสอบจะมีการลดปริมาณอย่างช้าๆ และต่อเนื่อง และในช่วงส่วนวันที่ 30 ถึง 60 ของการทดลอง พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ประมาณร้อยละ 60 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แสดงให้เห็นไนซินและกรดแลคติกถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง จนสะสมมากขึ้นและใกล้เคียงกับค่า MIC จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ดังแสดงในรูปที่ 4.15ข.

สำหรับเมื่อพิจารณาแอกทิวิตีชีวภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุในซิน พบว่าสามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้ดีกว่า *E. coli* ATCC 25922 ทั้งใน 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ที่ 4 องศาเซลเซียส ส่วนอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุกรดแลคติก พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ทั้งใน 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง สำหรับอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในซินร่วมกับกรดแลคติก พบว่า สามารถยับยั้งทั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 และ *E. coli* ATCC 25922 ได้ดี และสามารถคงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีกว่าการใช้ในรูปแบบอิสระ โดยเฉพาะหลังจากวันที่ 30 ของการทดลองเป็นต้นไป พบว่าอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุทั้ง 3 ชนิดจะให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีขึ้น คือทำให้เชื้อมีปริมาณค่อยๆ ลดลง นั้นแสดงให้เห็นถึงไนซินและกรดแลคติกถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคอย่างช้าๆ และอย่างต่อเนื่อง จนสะสมในปริมาณใกล้เคียงกับค่า MIC จึงทำให้สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 4.14 ระยะเวลาที่ไนซีนและกรดแลคติกถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุสารออกฤทธิ์เทียบกับสารออกฤทธิ์อิสระ ทดสอบกับ *L. monocytogenes* DMST 17303 ก. ที่ 4 องศาเซลเซียส และ ข. ที่อุณหภูมิห้อง





รูปที่ 4.15 ระยะเวลาที่ไวนิลและกรดแลคติกออกจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุสารออกฤทธิ์เทียบกับสารออกฤทธิ์อิสระ ทดสอบกับ *E. coli* ATCC 25922 ก. ที่ 4 องศาเซลเซียส และ ข. ที่อุณหภูมิห้อง

#### 4.5 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุใน โนซิน กรดแลคติก หรือโนซินร่วมกับกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ PYG

นำอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุโนซิน กรดแลคติก โนซินร่วมกับกรดแลคติก โนซินอิสระ กรดแลคติกอิสระ และกรดแลคติกร่วมกับกรดแลคติกอิสระผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PYG เติม *L. monocytogenes* DMST 17303 หรือ *E. coli* ATCC 25922 ในอาหาร PYG จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลองปลอดเชื้อ หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 ป่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และชุดที่ 2 ป่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 60 วัน

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 หรือ *E. coli* ATCC 25922 ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่บรรจุสารออกฤทธิ์ ที่บรรจุโนซิน กรดแลคติก หรือโนซินร่วมกับกรดแลคติก เปรียบเทียบกับการใช้โนซิน กรดแลคติก หรือโนซินร่วมกับกรดแลคติกอิสระ เป็นเวลา 60 วัน ที่ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ซึ่งชุดควบคุม คือ ชุดการทดลองที่ไม่ได้เติมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่บรรจุสารออกฤทธิ์ ที่เติม *L. monocytogenes* DMST 17303 หรือ *E. coli* ATCC 25922

พบว่าแอกทิวิตีชีวภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 ในวันที่ 1 ถึง 7 วันของการทดลองที่ 4 องศาเซลเซียส ของโนซิน และโนซินร่วมกับกรดแลคติกอิสระ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้เป็นอย่างดีรวดเร็ว คือ ไม่สามารถตรวจพบเชื้อทดสอบได้ และสามารถยับยั้งเชื้อได้นานถึง 15 วันของการทดลอง เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ส่วนกรดแลคติกอิสระและอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุกรดแลคติกนั้น สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เพียงเล็กน้อย ประมาณ 2 ถึง 4 logCFU ต่อมิลลิลิตรเมื่อเทียบกับชุดควบคุม สำหรับการทดสอบที่ใช้อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุโนซิน และโนซินร่วมกับ กรดแลคติก พบว่า ในระยะเวลา 1 ถึง 45 วันของการทดลองนั้นสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้โดยเชื้อจะลดปริมาณลงอย่างช้าๆ ประมาณ 4 logCFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุมแต่วันที่ 45 ถึง 55 วันของการทดลอง พบว่าอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุโนซิน และโนซินร่วมกับกรดแลคติกสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ โดยปริมาณเชื้อทดสอบจะค่อยๆ ลดจำนวนลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ ในวันที่ 56 ถึง 60 วันของการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.16ก.

สำหรับแอกทิวิตีชีวภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 ที่อุณหภูมิห้องนั้น พบว่า โนซิน และโนซินร่วมกับกรดแลคติกอิสระสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เป็นอย่างดี โดยลดปริมาณ *L. monocytogenes* DMST 17303 จนไม่สามารถตรวจพบได้ภายในวันที่ 3 และ 7 ของการทดลองตามลำดับ จากนั้นเชื้อทดสอบจะเพิ่มปริมาณขึ้นประมาณ 4 logCFU ต่อมิลลิลิตร จนถึงวันที่

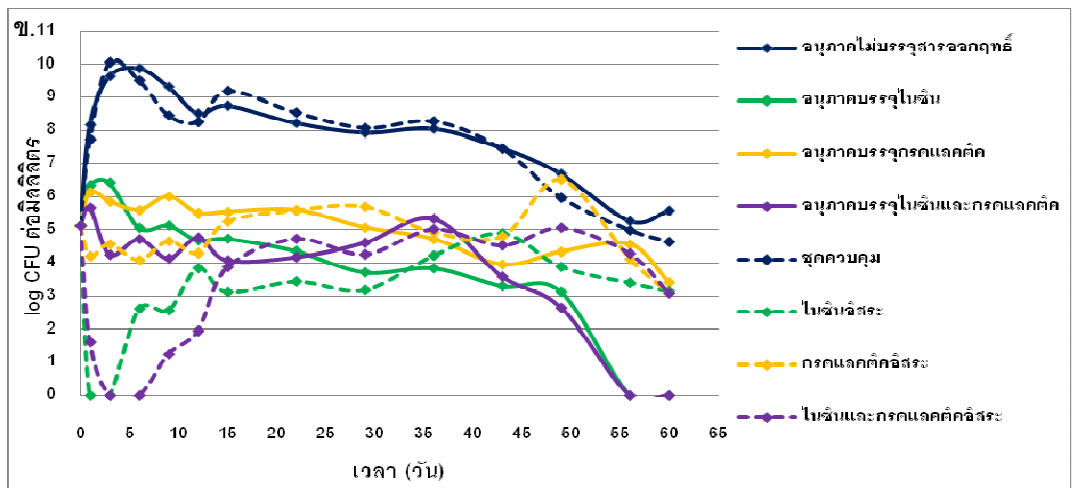
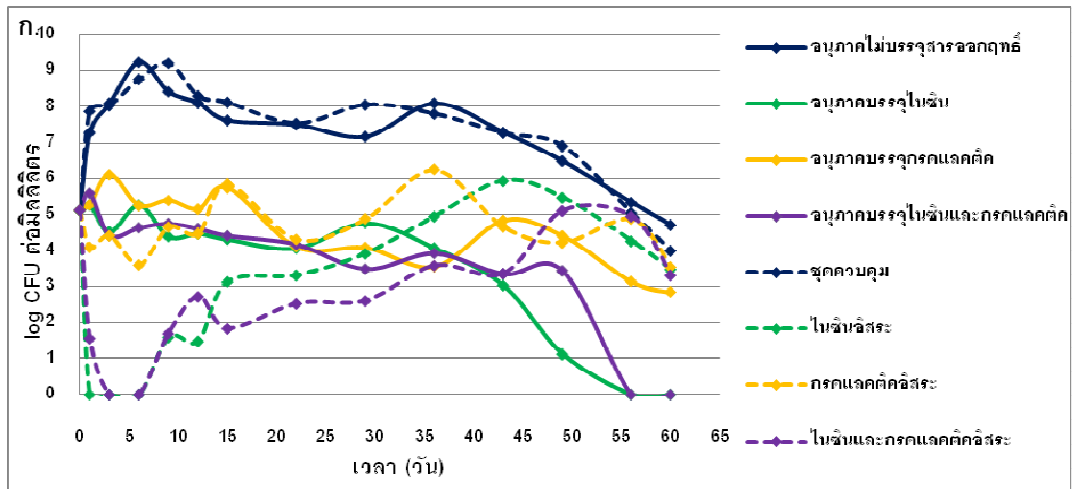
60 วันของการทดลอง และกรดแลคติกอิสเระและอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุกรดแลคติกจะให้ผลการทดสอบคล้ายกับที่ 4 องศาเซลเซียส คือ สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เพียงเล็กน้อย ส่วนการทดสอบที่ใช้อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซิน และไนซินร่วมกับกรดแลคติกนั้น พบว่าในช่วงวันที่ 1 ถึง 15 วันของการทดลองไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ดีเท่ากับไนซิน และไนซินร่วมกับกรดแลคติกอิสเระได้ แต่หลังจากวันที่ 15 วันของการทดลองเป็นต้นไปเชื้อทดสอบจะค่อยๆ ลดปริมาณลงประมาณ 5 logCFU ต่อมิลลิลิตร และลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ ในวันที่ 56 ถึง 60 ของการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.16ข.

สำหรับแอกทิวิตีชีวภาพในการยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ที่ 4 องศาเซลเซียสนั้น พบว่าไนซิน กรดแลคติกอิสเระ และไนซินร่วมกับกรดแลคติกอิสเระ สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีในวันที่ 1 ถึง 3 วันของการทดลอง โดยเชื้อมีชีวิตรอดประมาณ 4 logCFU ต่อมิลลิลิตร สำหรับไนซิน และกรดแลคติกอิสเระ และประมาณ 2.5 logCFU ต่อมิลลิลิตร สำหรับไนซินร่วมกับกรดแลคติก และคงแอกทิวิตีชีวภาพในการยับยั้งได้ถึงวันที่ 15 ของการทดลอง แต่จะยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า *E. coli* ATCC 25922 จากนั้นเชื้อทดสอบจะเพิ่มปริมาณขึ้นจนถึงวันที่ 50 ของการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้ไนซินอิสเระเพียงหรือกรดแลคติกอิสเระจะไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ได้ เมื่อใช้ไนซินร่วมกับกรดแลคติกจะสามารถลดปริมาณเชื้อทดสอบได้ดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับไนซิน และกรดแลคติกอิสเระ สำหรับอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซิน กรดแลคติก และไนซินร่วมกับกรดแลคติก พบว่า ในช่วงแรกของการทดลองจะสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับในรูปอิสเระ ส่วนช่วงหลังของการทดลองเชื้อทดสอบจะลดปริมาณลงประมาณ 5 logCFU ต่อมิลลิลิตร แต่อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซินร่วมกับกรดแลคติก ในช่วงหลังของการทดลองสามารถยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถคงแอกทิวิตีชีวภาพในการยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ได้ตลอดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.17ก.

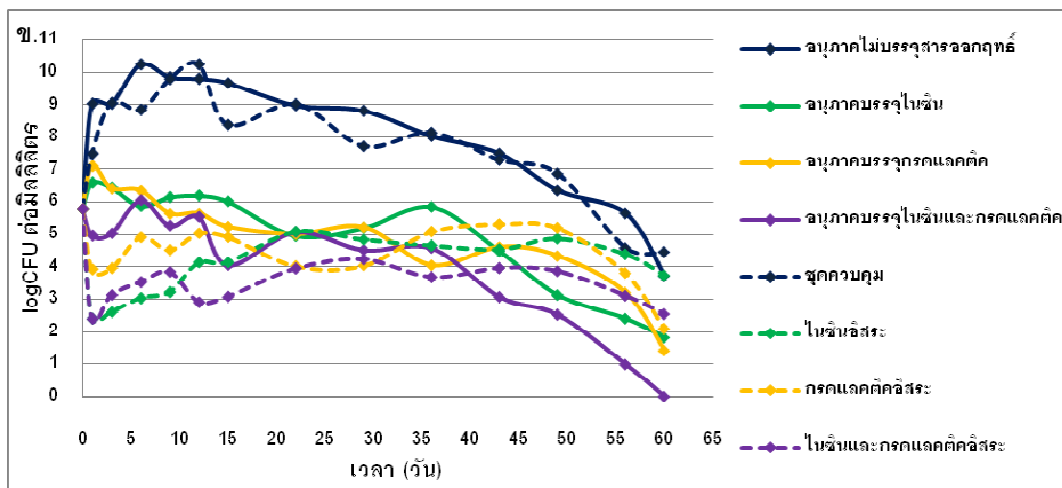
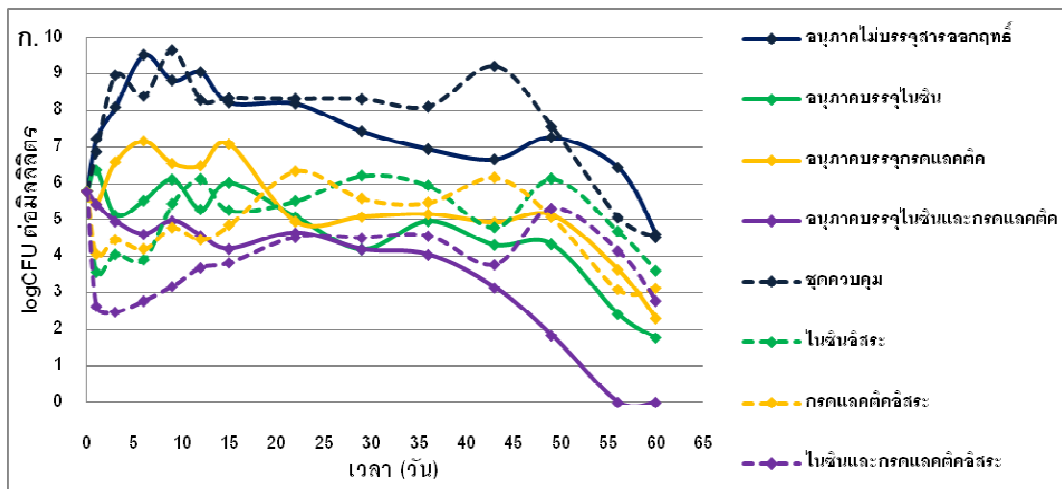
ส่วนแอกทิวิตีชีวภาพในการยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ที่อุณหภูมิห้องนั้น ผลการทดลองจะคล้ายกับแอกทิวิตีชีวภาพ ที่ 4 องศาเซลเซียส คือ ไนซิน กรดแลคติกอิสเระ และไนซินร่วมกับกรดแลคติกอิสเระ จะยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีในช่วงวันที่ 1 ถึง 5 ของการทดสอบ หลังจากวันที่ 5 ของการทดลองเป็นต้นไป เชื้อทดสอบจะค่อยๆ เพิ่มปริมาณขึ้นจนถึงวันที่ 60 ของการทดลอง ส่วนอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซิน และไนซินร่วมกับกรดแลคติกนั้น พบว่า ในช่วงวันที่ 1 ถึง 35 วันของการทดลองจะสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับในรูปอิสเระ ส่วนหลังจากวันที่

35 วันของการทดลอง พบว่า เชื้อทดสอบค่อยๆ ลดจำนวนลง จนไม่สามารถตรวจพบได้ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ดังแสดงในรูปที่ 4.17 ข.

จากผลการทดลองจะพบว่า แอคโนบิโอสแตตินในการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 2 ชนิดของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุในซินร่วมกับกรดแลคติก พบว่า จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 และ *E. coli* ATCC 25922 ได้ดี ทั้งที่ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง และสามารถคงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดี ในขณะที่กรดแลคติกอิสระ อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุกรดแลคติกนั้น สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในซิน พบว่า สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้ดีกว่า *E. coli* ATCC 25922 ทั้งใน 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 4.16 การยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุสารออกฤทธิ์ เทียบกับสารออกฤทธิ์อิสระ ก. ที่ 4 องศาเซลเซียส และ ข. ที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 4.17 การยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุสารออกฤทธิ์เทียบกับสารออกฤทธิ์อิสระ ก. ที่ 4 องศาเซลเซียส และ ข. ที่อุณหภูมิห้อง

#### 4.6 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในซิน กรดแลคติก หรือในซินร่วมกับกรดแลคติกในนม UHT ชนิดจืดหรือนมพร้อมมันเนย

นำอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในซิน กรดแลคติก ในซินร่วมกับกรดแลคติก ในซินอิสระ กรดแลคติกอิสระ และกรดแลคติกร่วมกับกรดแลคติกอิสระ ผสมกับนม UHT จากนั้นเติม *L. monocytogenes* DMST 17303 หรือ *E. coli* ATCC 25922 ในนม UHT และแบ่งใส่หลอดทดลองปลอดเชื้อ หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 ป่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และชุดที่ 2 ป่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 60 วัน

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 หรือ *E. coli* ATCC 25922 ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่บรรจุสาร ในซิน กรดแลคติก หรือในซินร่วมกับกรดแลคติก เปรียบเทียบกับการใช้ในซิน กรดแลคติก หรือในซินร่วมกับกรดแลคติกอิสระ เป็นเวลา 60 วัน ที่ 4 องศาเซลเซียส ในนม UHT ชนิดจืด หรือพร้อมมันเนย ซึ่งชุดควบคุม คือ นม UHT ชนิดจืด หรือพร้อมมันเนยที่เติม *L. monocytogenes* DMST 17303 หรือ *E. coli* ATCC 25922

ผลการทดสอบ พบว่าแอกทิวิตีชีวภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 วันที่ 1 ถึง 7 ของการทดลองในนม UHT ชนิดจืด ของในซิน และในซินร่วมกับกรดแลคติกอิสระ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้เป็นอย่างดี จนไม่สามารถตรวจนับได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุม จากนั้นจะพบว่าเชื้อทดสอบจะเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็ว และต่อเนื่องจากจนถึงวันที่ 50 ของการทดลอง สำหรับอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุกรดแลคติกนั้น สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เพียงเล็กน้อย ประมาณ 2 ถึง 3 logCFU ต่อมิลลิลิตร ส่วนอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในซิน และในซินร่วมกับกรดแลคติก พบว่า ในระยะเวลา 1 ถึง 40 วันของการทดลองนั้น สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้โดยเชื้อจะลดปริมาณลงอย่างช้าๆ แต่วันที่ 45 ถึง 55 วันของการทดลองพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ โดยปริมาณเชื้อทดสอบจะค่อยๆ ลดจำนวนลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ ในวันที่ 56 ถึง 60 วันของการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.18ก.

ส่วนแอกทิวิตีชีวภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 ในนม UHT ชนิดพร้อมมันเนยจะให้ผลการทดลองในลักษณะเดียวกับการทดลองในนม UHT ชนิดจืด คือในช่วงแรกของการทดลองนั้น ในซิน และในซินร่วมกับกรดแลคติกอิสระ สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีกว่าอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในซิน และในซินร่วมกับกรดแลคติก แต่เมื่อช่วงหลังของการทดลองพบว่าอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในซินร่วมกับกรดแลคติก สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้อย่างมีประสิทธิภาพดังแสดงในรูปที่ 4.19ก.

สำหรับผลการทดสอบ พบว่าเอกทิวติชีวภาพในการยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ในนม UHT ชนิดจืด จะให้ผลการทดลองคล้ายในการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ PYG คือ ไนซิน และไนซินร่วมกับกรดแลคติกอิสระ สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีแต่ประสิทธิภาพการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 จะดีกว่า กล่าวคือ ในวันที่ 1 ของการทดลอง สามารถลดปริมาณเชื้อลงประมาณ 4.0 และ 5.5 log CFU ต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนในการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 จะเห็นได้ว่าสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบจนไม่สามารถตรวจนับได้ หลังจากวันที่ 1 ของการทดลองเป็นต้นไป เชื้อทดสอบจะเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 50 ของการทดลอง สำหรับกรดแลคติกอิสระ พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีกว่าไนซินอิสระ สามารถลดปริมาณเชื้อได้ตลอดระยะเวลาของการทดลอง ได้ประมาณ 4 ถึง 5 log CFU ต่อ มิลลิลิตร ส่วนอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซิน กรดแลคติก และไนซินร่วมกับกรดแลคติก พบว่า ในช่วงแรกของการทดลอง สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เพียงเล็กน้อย ส่วนช่วงวันที่ 45 ถึง 60 ของการทดลอง พบว่าเชื้อทดสอบลดปริมาณลง จนไม่สามารถตรวจพบได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.18ข.

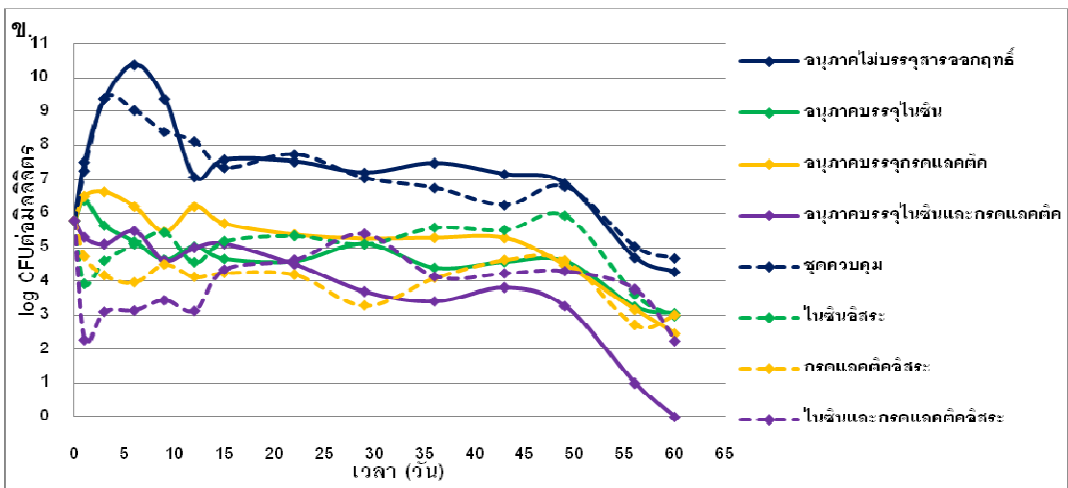
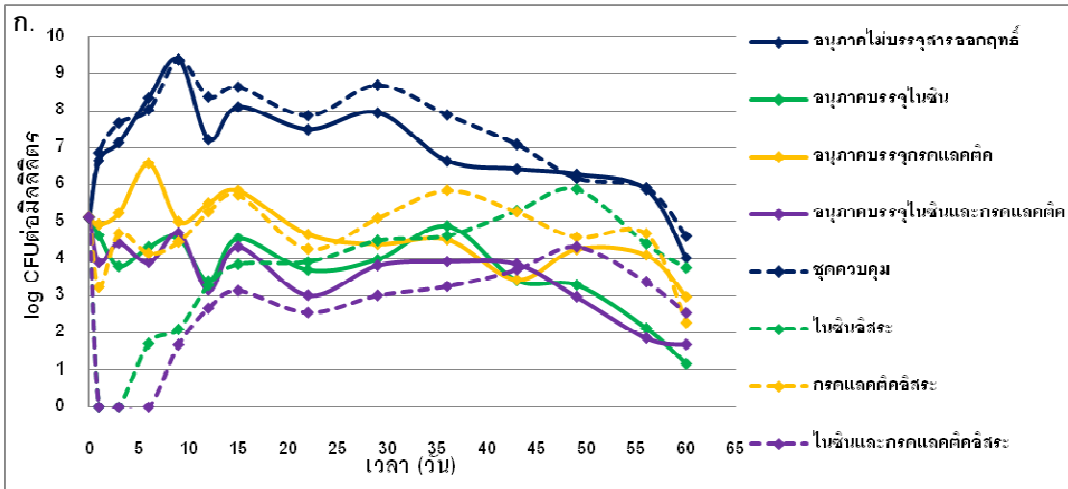
สำหรับเอกทิวติชีวภาพในการยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ในนม UHT ชนิดพว่องมันเนยจะ ให้ผลการทดลองคล้ายกับการทดลองในนม UHT ชนิดจืด พบว่าไนซิน และกรดแลคติก ในระยะเวลาทั้งหมดของการทดลองพบว่า สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เพียงเล็กน้อย ลดลงประมาณ 2 ถึง 3 log CFU ต่อ มิลลิลิตร ในขณะที่ไนซินร่วมกับกรดแลคติกอิสระ สามารถยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ได้ดี ในช่วงวันที่ 1 ถึง 3 วันแรกของการทดลอง สามารถลดปริมาณเชื้อทดสอบได้ถึง 5 log CFU ต่อ มิลลิลิตร และหลังจากวันที่ 3 ของการทดลองเป็นต้นไป เชื้อทดสอบจะเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 50 ของการทดลอง ส่วนอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซิน และไนซินร่วมกับกรดแลคติก พบว่าในช่วง 1 ถึง 5 วันแรกของการทดลอง เชื้อทดสอบจะลดปริมาณลงอย่างช้าๆ แต่เมื่อหลังจากวันที่ 15 ของการทดลอง พบว่าเชื้อทดสอบจะเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะวันที่ 20 ของการทดลอง ปริมาณของ *E. coli* ATCC 25922 ที่นับได้ คือ 4 ถึง 6 log CFU ต่อ มิลลิลิตร และหลังจากวันที่ 50 ของการทดลองสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ ขึ้นดังแสดงในรูปที่ 4.19ข.

สำหรับเอกทิวติชีวภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 และ *E. coli* ATCC 25922 ในนม UHT ชนิดจืด และพว่องมันเนย ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนซินร่วมกับกรดแลคติก พบว่า จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 และ *E. coli* ATCC 25922 ได้ดี โดยเฉพาะ *E. coli* ATCC 25922 ทั้งในนมจืด และนมพว่องมันเนย ในขณะที่อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุกรดแลคติกนั้น สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนอนุภาค

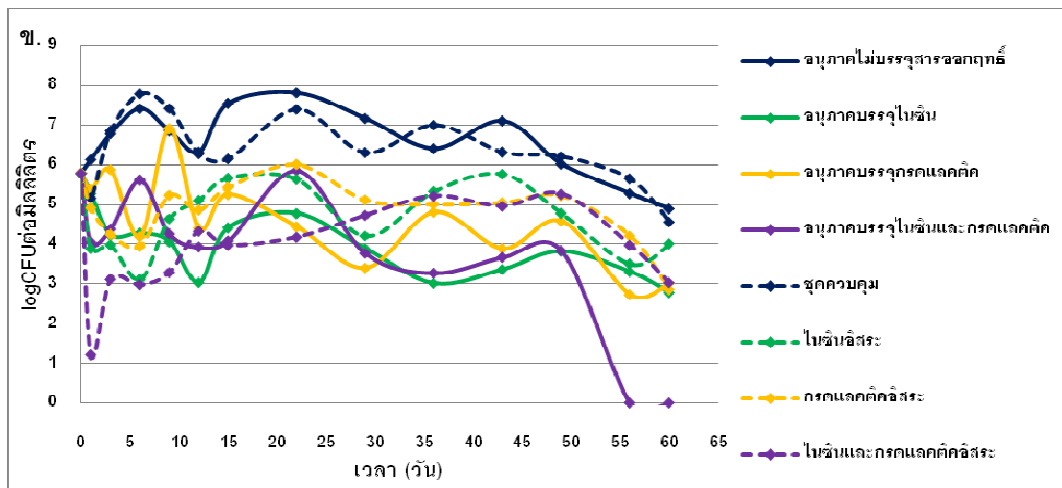
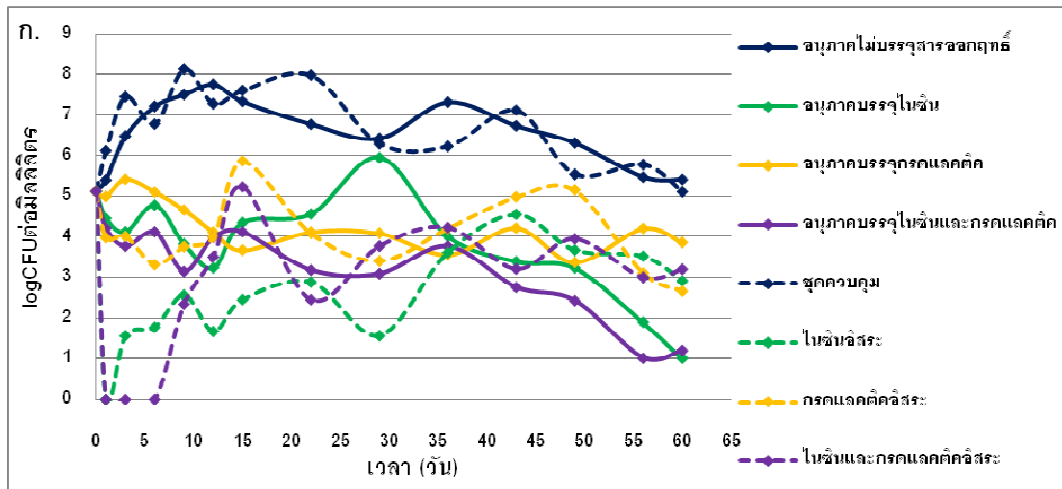


นาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุไนติน พบว่า สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้ดีกว่า *E. coli* ATCC 25922 ในนมทั้ง 2 ชนิด

สำหรับการทดลองอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่บรรจุสาร ไม่สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 หรือ *E. coli* ATCC 25922 ที่ 4 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิห้อง ได้ แสดงให้เห็นว่าไขมันแข็งชนิดอิมิเตอร์ 900 ที่เป็นส่วนประกอบหลักของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง ไม่ผลต่อเอกทิวิตีชีวภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 2 ชนิด



รูปที่ 4.18 การยับยั้ง ก. *L. monocytogenes* DMST 17303 และ ข. *E. coli* ATCC 25922 ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุสารออกฤทธิ์เทียบกับสารออกฤทธิ์อิสระในนม UHT ชนิดจืด



รูปที่ 4.19 การยับยั้ง ก. *L. monocytogenes* DMST 17303 และ ข. *E. coli* ATCC 25922 ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุสารออกฤทธิ์เทียบกับสารออกฤทธิ์อิสระในนม UHT ชนิดพร้อมมันเนย

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

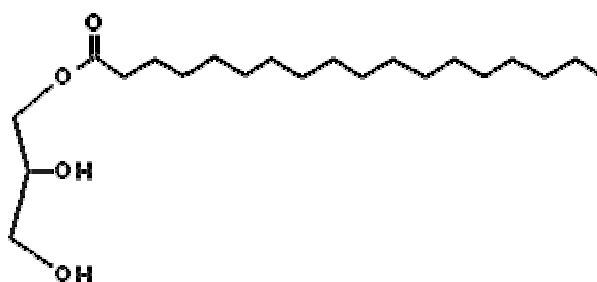
ไนซินเป็นวัตถุกันเสียชีวภาพที่ได้รับความนิยมอย่างมาก เนื่องจากเป็นสารที่มีฤทธิ์เหมือนสารปฏิชีวนะ ผลิตมาจากธรรมชาติ และได้รับอนุญาตให้ใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหาร ซึ่งได้รับรองว่ามีความปลอดภัย และอนุญาตให้ใช้เติมในอาหารเพื่อถนอมอาหาร จากองค์การอนามัยโลก (WHO) และองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (US FDA) ในปัจจุบันไนซินได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งมากกว่า 50 ประเทศทั่วโลกให้การยอมรับ (Federal Register, 1988)

แต่อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีการเติมไนซินลงในอาหารหลายประเภทเพื่อใช้เป็นวัตถุกันเสีย แต่ไนซินมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่จำกัด กล่าวคือ ไนซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น ทำให้การเติมไนซินลงในอาหารไม่สามารถแก้ปัญหาการปนเปื้อนแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียสำคัญที่มีการปนเปื้อนในอุตสาหกรรมอาหารหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมเนื้อแช่แข็ง และอุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง (Helander และ Mattila, 2000) และไนซินสามารถทำอันตรกิริยากับเอนไซม์และองค์ประกอบต่างๆ ของอาหารทำให้สูญเสียแอกทิวิตีในการยับยั้งแบคทีเรีย (Antonio และคณะ, 2007) ดังนั้นงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการนำอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งมาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มความเสถียรของไนซินร่วมกับการใช้กรดแลคติกที่สามารถเสริมฤทธิ์ทางชีวภาพ ให้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ และเพิ่มแอกทิวิตีชีวภาพของไนซินและกรดแลคติกที่บรรจุในอนุภาค เทียบกับไนซินและกรดแลคติกอิสระเพื่อให้แอกทิวิตีชีวภาพของไนซินคงอยู่ได้นานในอาหาร

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้สารเสริมฤทธิ์ทำงานร่วมกับไนซิน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของไนซินให้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ และแก้ข้อจำกัดดังกล่าว โดยทำการทดสอบเพื่อหาสารออกฤทธิ์ที่สามารถทำลายเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบได้มาทำงานร่วมกับไนซิน โดยคาดว่าเมื่อเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบถูกกำจัดออกจะเป็นการเปิดโอกาสให้ไนซินเข้าถึงบริเวณเป้าหมาย และสามารถทำงานได้ในเซลล์ ทำให้ไนซินสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ (Kalchayanand และคณะ, 1992) โดยสารออกฤทธิ์ที่ถูกเลือกนำมาใช้ในการทดสอบร่วมกับ ไนซิน คือ กรดแลคติก

(Gogus และคณะ, 2006) เนื่องจากกรดแลคติก มีรายงานการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานร่วมกับไนซิน ว่าสามารถเสริมฤทธิ์การทำงานของ ไนซินได้บางส่วน (หยกฤทัย กุลวัฒนศาล, 2551)

และงานวิจัยนี้ได้เลือกเทคโนโลยีการเตรียมอนุภาคนาโนแบบอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง (Solid lipid nanoparticles) เนื่องจากอนุภาคชนิดนี้มีความคงตัวสูง สามารถกักเก็บสารออกฤทธิ์ได้ปริมาณมาก มีการควบคุมการปลดปล่อยสารออกจากอนุภาคได้ดี และเตรียมแบบขยายส่วนได้ง่าย นอกจากนี้วัตถุดิบที่นำมาใช้ในการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งคือ อิมิเตอร์ และพอลิออกซาเมอร์ เป็นสารที่มีความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภคเนื่องจากถูกย่อยสลายได้ดีในร่างกายมนุษย์ และไม่มีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในขั้นตอนการเตรียมอนุภาค ทำให้อนุภาคนี้น่าจะมีความเหมาะสมที่จะนำมาให้ในงานวิจัยนี้ เพราะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารที่ต้องคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้บริโภคได้เป็นอย่างดี (Pardeike และคณะ, 2009)



#### รูปที่ 5.1 โครงสร้างโมเลกุลของไขมันแข็งชนิดอิมิเตอร์ 900 หรือกลีเซอรอลโมโนสเตียเรต

ขั้นตอนแรกของงานวิจัย คือ การขึ้นรูปอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งชนิดอิมิเตอร์ 900 โดยการ ใช้เครื่องฮอโมจีไนเซอร์ที่ความดันสูง 1,500 บาร์ 3 รอบ (เพื่อให้อนุภาคที่เตรียมได้มีขนาดเล็ก) โดยใช้ พอลิออกซาเมอร์ 188 ร้อยละ 5.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิว และโซเดียมดีออกซีโคเลต ร้อยละ 0.125 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม ตามลำดับ สารผสมจะถูกอัดด้วยแรงดันสูง ให้เคลื่อนที่ผ่านช่องเปิดของเครื่องฮอโมจีไนเซอร์ ซึ่งอนุภาคที่เตรียมได้จากวิธีดังกล่าวจะมีขนาด และค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวที่ใกล้เคียงกันในแต่ละอนุภาค โดยพบว่าอนุภาคที่เตรียมได้ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ อนุภาคนาโนไขมันแข็งที่ไม่มีการบรรจุสารออกฤทธิ์ อนุภาคนาโนที่บรรจุไนซิน อนุภาคนาโนที่

บรรจุกรดแลคติก และอนุภาคนาโนที่บรรจุในซินร่วมกับกรดแลคติกจะมีขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ยเท่ากับ  $52.27 \pm 0.43$ ,  $113.80 \pm 1.63$ ,  $528.53 \pm 7.19$  และ  $362.86 \pm 28.05$  นาโนเมตร ตามลำดับ โดยมีค่า PDI ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งทั้ง 4 แบบมีค่าเท่ากับ 0.30, 0.23, 0.49 และ 0.01 ตามลำดับ (PDI < 0.5) สำหรับค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งทั้ง 4 ชนิดจะมีค่า เท่ากับ  $-15.56 \pm 0.81$ ,  $-6.12 \pm 0.11$ ,  $-3.83 \pm 0.30$  และ  $-2.07 \pm 0.02$  มิลลิโวลต์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.3) ซึ่งจะเห็นได้ว่าขนาดของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุกรดแลคติกจะมีขนาดใหญ่ที่สุด เนื่องจากเครื่องนาโนไซเซอร์ที่ใช้ในการวัดขนาดอนุภาคจะเป็นการวัดขนาดโดยเป็นค่าเฉลี่ยจากหลายๆ อนุภาค สำหรับค่า PDI ที่ได้จากวัดขนาดของอนุภาค แสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุกรดแลคติกที่เตรียมได้มีหลายขนาด และเมื่อพิจารณาจากลักษณะภายนอกของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุกรดแลคติกมีหลายขนาด และอาจจะเกิดการจับกลุ่มกัน จึงทำให้อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุกรดแลคติกมีขนาดใหญ่ที่สุด มีรายงานว่าการใช้เครื่องสอโมจี้ในเซอร์ที่ระดับความดันที่สูงกว่า 1,500 บาร์ ในกระบวนการเตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งเพื่อบรรจุทามอกซิเฟน พบว่าอนุภาคที่เตรียมได้นั้นมีขนาดใหญ่ เนื่องจากความดันที่สูงอาจจะทำลายความเสถียรของสารลดแรงตึงผิวที่หุ้มอยู่รอบนอกของอนุภาคส่งผลให้เกิดการรวมตัวกันจนมีขนาดใหญ่ (Reddy และคณะ, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าอนุภาคที่เตรียมได้ จะมีลักษณะรูปร่างใกล้เคียงกัน คือมีรูปร่างคล้ายเม็ดเลือด (platelet shaped) เป็นผลึกไขมัน ผิวเรียบ ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นผลมาจากการใช้ไขมันแข็งในการเตรียมอนุภาค

ประสิทธิภาพในการบรรจุสารออกฤทธิ์ลงในอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารออกฤทธิ์ในไขมันที่ห่อหุ้ม พบว่าการบรรจุในซิน ลงในอนุภาคจะมีประสิทธิภาพดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกรบรรจุกรดแลคติก โดยอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่เตรียมได้นั้น มีประสิทธิภาพการบรรจุในซินได้ร้อยละ 66.20 ของปริมาณในซินเริ่มต้นที่ใช้ในการบรรจุ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าประสิทธิภาพการบรรจุในซินได้ร้อยละ 73.6 (พินิตพล พรหมบุตร, 2550) และร้อยละ 67.86 ของปริมาณในซินเริ่มต้นที่ใช้ในการบรรจุ (หยกฤทัย กุลวัฒน์ศาล, 2551) ซึ่งประสิทธิภาพในการบรรจุในซินนั้นมีค่าใกล้เคียงกัน ในขณะที่อนุภาคที่ทำการบรรจุกรดแลคติกมีประสิทธิภาพการบรรจุกรดแลคติกได้เพียงร้อยละ 58.62 ของปริมาณกรดแลคติกเริ่มต้นที่ใช้ในการบรรจุ ส่วนอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในซินร่วมกับกรดแลคติกก็ได้ผลในลักษณะเดียวกัน คือ อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในซินร่วมกับกรดแลคติก มีประสิทธิภาพในการบรรจุในซินสูงกว่าการบรรจุกรดแลคติก โดยสามารถบรรจุในซิน และกรดแลคติกได้ร้อยละ 65.86

และ 59.57 ของปริมาณสารเริ่มต้นที่ใช้ในการบรรจุในอนุภาคนาโน ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) ซึ่งผลการทดลองที่ได้ข้างต้น อาจเป็นผลเนื่องมาจากว่าประสิทธิภาพในการบรรจุสารออกฤทธิ์ลงในอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งนั้นจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารออกฤทธิ์ในไขมันที่ถูกหลอมเหลว ทำให้ในซินซึ่งเป็นเพปไทด์ที่มีทั้งส่วนที่มีขั้ว และไม่มีขั้วภายในโมเลกุล สามารถละลายได้ดีกว่ากรดแลคติกซึ่งเป็นสารที่มีสมบัติละลายน้ำได้ดีนั้นคือมีขั้วสูงเพียงอย่างเดียว ส่งผลให้ในซินมีประสิทธิภาพในการบรรจุในอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งได้ดีกว่ากรดแลคติก อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ได้เลือกใช้ปริมาณไขมันแข็งอิมิเตอร์ 900 เพียงร้อยละ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เท่านั้น ในขณะที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิวในปริมาณมากถึงร้อยละ 5 ทำให้มีสัดส่วนของปริมาณไขมันแข็งต่อปริมาณสารลดแรงตึงผิวค่อนข้างต่ำ จึงอาจส่งผลให้ในซินและกรดแลคติกบางส่วนไม่ได้ถูกบรรจุลงในอนุภาค แต่จะแยกตัวอยู่ในชั้นน้ำหรือเกาะอยู่บริเวณสารลดแรงตึงผิวที่ล้อมรอบอนุภาค ส่งผลให้ประสิทธิภาพการบรรจุสารต่ำลง ดังนั้นหากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพการบรรจุในซิน และกรดแลคติก อาจทำได้โดยการทดลองปรับปริมาณสัดส่วนของไขมันแข็งกับสารลดแรงตึงผิวเพื่อหาค่าสัดส่วนที่เหมาะสม โดยเพิ่มปริมาณของไขมันแข็งอิมิเตอร์ 900 ให้มากขึ้น ซึ่งอาจจะสามารถทำให้ในซินและกรดแลคติกละลายในไขมันแข็งได้มากขึ้น ส่งผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการบรรจุสารในอนุภาคให้เพิ่มสูงขึ้นได้ ดังตัวอย่างการวิจัย การเพิ่มปริมาณร้อยละของไขมันแข็งไดนาเซน (dynasan) เซทิลพาลมิเตต (cetyl palmitate) และคอมพริทอล (compritol) ในการบรรจุอีโตมีเดต (etomidate) ลงในอนุภาคนาโนจะทำให้ค่าประสิทธิภาพการบรรจุเพิ่มสูงขึ้น (Schwarz และ Mehnert, 1999)

ศึกษาผลของ pH ความเข้มข้นของเกลือ และอุณหภูมิต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความคงตัวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่บรรจุสารออกฤทธิ์ ที่บรรจุในซิน กรดแลคติก หรือในซินร่วมกับกรดแลคติก พบว่า การเก็บอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งทั้ง 4 ชนิดในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ ที่มี pH ความเข้มข้นของเกลือ และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน พบว่า อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่ไม่บรรจุสารออกฤทธิ์ ที่บรรจุในซิน กรดแลคติก หรือในซินร่วมกับกรดแลคติก ในทุกค่า pH ความเข้มข้นเกลือ และอุณหภูมิ อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งทั้ง 4 ชนิด จะมีขนาดใหญ่ขึ้น และมีค่าประจุที่ผิวอนุภาคเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ของการทดลอง ยิ่งบ่มเป็นระยะเวลาสั้นขึ้น อนุภาคนาโนมีขนาดใหญ่ขึ้นส่งผลทำให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ผิวเพิ่มขึ้นนั้น จะทำให้เกิดแรงผลักระหว่างอนุภาคลดลง จึงเป็นสาเหตุทำให้อนุภาคจับกลุ่มกันมากขึ้น Reddy และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิและแสงต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง เมื่อเก็บอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน พบว่าขนาดของ

อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งมีขนาดใหญ่ขึ้นจากวันแรกที่เตรียมอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง คือ 235 นาโนเมตรเป็น 539 นาโนเมตร ส่วนเมื่อเก็บอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน พบว่าอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งมีขนาดใหญ่ขึ้นจาก 235 นาโนเมตรเป็น 304 นาโนเมตร สำหรับผลของแสง พบว่า อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งมีขนาดใหญ่ขึ้นจาก 235 นาโนเมตรเป็น 1,235 นาโนเมตร ส่วนเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิไขมันแข็งมีขนาดใหญ่ขึ้น คือ 235 นาโนเมตรเป็น 382 นาโนเมตร ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งได้รับพลังงานจากภายนอกเข้ามา ทำให้ได้รับพลังงานจลน์สูงขึ้น จึงมีการวิ่งชนกันมากขึ้น ทำให้มีการรวมตัวของอนุภาค และยังมีผลต่อชั้นสารลดแรงตึงผิวของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง จึงทำให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าเพิ่มสูงขึ้น

ผลของการศึกษาระยะเวลาที่โนซินและกรดแลคติกถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง ซึ่งจากผลการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 และ *E. coli* ATCC 25922 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุโนซิน กรดแลคติก และโนซินร่วมกับกรดแลคติก พบว่าเชื้อทดสอบทั้ง 2 ชนิดจะเริ่มถูกยับยั้งประมาณร้อยละ 40 ในวันที่ 30 ของการทดลองเป็นต้นไป จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งสามารถควบคุมการปลดปล่อยโนซิน และกรดแลคติกออกจากอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งได้อย่างต่อเนื่อง และสะสมในปริมาณที่มากพอ โดยมีค่าใกล้เคียงกับค่า MIC และสามารถคงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ สำหรับการทดลองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้องนั้น พบว่าการใช้อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุสารออกฤทธิ์ ทั้งบรรจุโนซิน กรดแลคติก และโนซินร่วมกับกรดแลคติกในการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 และ *E. coli* ATCC 25922 ในช่วงวันที่ 1 ถึง 30 วันของการทดลองนั้นไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 2 ชนิด ได้ดีเท่ากับการใช้สารออกฤทธิ์ในรูปแบบอิสระ ส่วนการใช้โนซินอิสระพบว่าให้ผลการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้ดีกว่า *E. coli* ATCC 25922 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ที่ผลการทดลองเป็นเช่นนี้เนื่องจากฤทธิ์ทางชีวภาพของโนซินไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีเท่ากับแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนการยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ต้องใช้โนซินที่ความเข้มข้นสูง แต่เมื่อใช้โนซินความเข้มข้นต่ำจะสามารถยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ได้แบบไม่จำเพาะ (Delves และคณะ, 2005)

สำหรับผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 และ *E. coli* ATCC 25922 ในอาหาร PYG ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่าในช่วงวันที่ 1 ถึง 25 วัน ของการทดลอง อนุภาคนาโนบรรจุสารออกฤทธิ์ทั้ง 3 แบบ จะให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ใกล้เคียงกัน คือจะ



ทำให้ปริมาณเชื้อลดลงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถลดปริมาณ *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้ประมาณ 3.5 log CFU ต่อมิลลิลิตรและลดปริมาณเชื้อทดสอบที่อุณหภูมิห้องลงได้ประมาณ 3.0 log CFU ต่อมิลลิลิตรหลังจากวันที่ 30 ถึง 95 วันของการทดลอง จะเห็นว่าอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุสารออกฤทธิ์จะให้ผลการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 โดยสามารถลดปริมาณเชื้อทดสอบเพิ่มขึ้นได้ประมาณ 5.0 ถึง 7.0 log CFU ต่อมิลลิลิตรเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่อุณหภูมิห้องให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบหลังจากวันที่ 30 ถึง 58 วันของการทดลอง ลดปริมาณเชื้อได้ประมาณ 4.0 ถึง 7.0 log CFU ต่อมิลลิลิตรสำหรับผลการทดลองการยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ที่ 4 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิห้อง การใช้สารออกฤทธิ์รูปแบบอิสระ จะให้ผลการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าในระยะแรกของการทดลอง โดยโนซินร่วมกับกรดแลคติกอิสระก็ยังคงมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด คือสามารถลดปริมาณเชื้อทดสอบได้ประมาณ 6.0 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตั้งแต่วันที่ 1 ของการทดลอง และสามารถคงแอกทิวิตีการยับยั้งเชื้อได้นานตลอดระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่หลังจากวันที่ 30 เป็นต้นไป พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของกรดแลคติกอิสระจะลดลง ส่วนการใช้อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุโนซินร่วมกับกรดแลคติกกลับมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และทำให้ปริมาณเชื้อลดลงได้มากกว่าโนซินร่วมกับกรดแลคติกในรูปแบบอิสระ จากการทดลองจะเห็นได้ว่า อุณหภูมิมีส่วนในการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 2 ชนิด คือ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 ได้ ทั้งที่ผลการทดลองที่ 25 องศาเซลเซียส ที่ใช้อนุภาคนาโนชนิดเดียวกันไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ เนื่องจากการใช้อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 6.5 องศาเซลเซียส นั้นจะสามารถเสริมฤทธิ์ทางชีวภาพของโนซินในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ โดยอุณหภูมิต่ำกล่าว จะสามารถเหนี่ยวนำให้ลักษณะของเยื่อหุ้มชั้นนอกเสียสภาพได้ ทำให้โนซินเข้าสู่บริเวณเป้าหมายได้ (Bozianis และ Adams, 2000; Elliason และ Tatini, 1999) ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ หยกกัญญา กุลวัฒน์ศาล (2551) ศึกษาผลการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 และ *E. coli* ATCC 25922 ของทั้งแบบไม่บรรจุสารออกฤทธิ์บรรจุโนซิน บรรจุเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ และบรรจุโนซินร่วมกับเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ พบว่าการใช้อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุสารออกฤทธิ์ทั้งแบบบรรจุโนซิน บรรจุเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ หรือบรรจุโนซินร่วมกับเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ ในการยับยั้งการเจริญ *L. monocytogenes* นั้น ในการทดลองที่อุณหภูมิ 4 พบว่าสารออกฤทธิ์อิสระสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนอนุภาคนาโนทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพหลังจากวันที่ 20 ของการทดลองเป็นต้นไป ส่วนผลการยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 พบว่าให้ผลการยับยั้งในลักษณะ

เดียวกันกับ *L. monocytogenes* DMST 17303 แต่ในซินอิสระสามารถยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

สำหรับผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 และ *E. coli* ATCC 25922 ในน้ำมันนม UHT ชนิดจืด และนมพ่องมันเนย ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุในซิน กรดแลคติก หรือในซินร่วมกับกรดแลคติก เปรียบเทียบกับ ในซิน กรดแลคติก หรือในซินร่วมกับกรดแลคติกอิสระ เป็นเวลา 60 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า สารออกฤทธิ์ในซินอิสระ สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้อย่างมีประสิทธิภาพในช่วง 7 วันแรกของการทดลอง จากนั้นเชื้อมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสารออกฤทธิ์มีปริมาณไม่มากพอที่จะยับยั้งเชื้อทดสอบ ที่เพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว ผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mantovani และ Russell (2000) ศึกษาการยับยั้ง *Streptococcus bovis* JB1 โดยใช้ ในซินอิสระ ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ทดสอบเป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่าในช่วง 1 ถึง 2 ชั่วโมงแรก ในซินอิสระ สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ร้อยละ 99 และหลังจากชั่วโมงที่ 2 เป็นต้นไปพบว่า *Streptococcus bovis* JB1 เพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากร้อยละ 1 ของเชื้อที่เหลือนั้นเกิดการติดต่อในซิน จึงเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง และพบว่าการใช้ในซินอิสระ สามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้ดีกว่าการยับยั้งใน *E. coli* ATCC 25922 ทั้งนี้เนื่องจากฤทธิ์ทางชีวภาพของในซินไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีเท่ากับแบคทีเรียแกรมบวก และจากผลการทดสอบเมื่อใช้กรดแลคติกอิสระ ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ พบว่า สามารถยับยั้งได้ทั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 และ *E. coli* ATCC 25922 ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมลบ ในขณะที่เมื่อมีการใช้ในซินร่วมกับกรดแลคติก จะสามารถยับยั้งทั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 และ *E. coli* ATCC 25922 ได้ดีขึ้น และยาวนานกว่าการใช้ในซิน หรือกรดแลคติกเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้เนื่องจากการใช้กรดแลคติก จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งของในซินต่อ *E. coli* ATCC 25922 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้มากขึ้น และสามารถเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งของในซินต่อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้อย่างมีประสิทธิภาพและยาวนานมากขึ้น แสดงให้เห็นว่า การใช้ในซินเป็นสารออกฤทธิ์เพียงชนิดเดียวนั้น จะไม่สามารถลดปริมาณแบคทีเรียแกรมลบที่ปนเปื้อนในอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพได้ จากผลการทดสอบอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งชนิดบรรจุในซินร่วมกับกรดแลคติก พบว่าหลังจากวันที่ 45 ถึง 60 วันของการทดลองสามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 และ *E. coli* ATCC 25922 ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งในการทดลองนี้จะพบว่าในนม UHT ชนิดจืดมีปริมาณของเชื้อทดสอบ

ทั้ง 2 ชนิดสูงในนมพ่องมันเนย เนื่องจากในนม UHT ชนิดจืดมีสารอาหาร เช่น ไขมัน และโปรตีนสูงกว่าในนม UHT ชนิดพ่องมันเนย (Malheiros และคณะ, 2010) และยังพบว่าการทดลองการยับยั้งเชื้อทดสอบในนม UHT ชนิดจืดและชนิดพ่องมันเนย ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในซินกรดแลคติก หรือโนซินร่วมกับกรดแลคติก พบว่า สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 และ *E. coli* ATCC 25922 ได้ อย่างมีประสิทธิภาพ แสดงให้เห็นว่าปริมาณไขมัน ไม่มีผลต่อการทำงานของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งทั้ง 3 ชนิด ส่วนโนซินอิสระสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 2 ชนิดได้เพียงเล็กน้อย เนื่องจากปริมาณไขมันในนมจืดมีผลต่อแอกทิวิตีของโนซิน คือ ไขมันสามารถจับกับโนซิน ส่งผลให้โนซินสูญเสียแอกทิวิตีทางชีวภาพต่อเชื้อทดสอบทั้ง 2 ชนิด (Inga และคณะ, 2003) ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ

Malheiros และคณะ (2010) ศึกษาการยับยั้ง *L. monocytogenes* ในจืดหรือนมพ่องมันเนย ที่อุณหภูมิตู้เย็นประมาณ 6-8 องศาเซลเซียส ด้วยอนุภาคไลโปโซมบรรจุโนซิน 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับโนซินอิสระ 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทำการทดลอง 14 วัน พบว่าในนมจืดโนซินอิสระ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* ได้เพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ส่วนโนซินอิสระ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพตลอดการทดลอง ส่วนอนุภาคนาโนไลโปโซมบรรจุโนซิน 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในช่วง 5 วันแรกของการทดลอง สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เพียงเล็กน้อย แต่หลังจากวันที่ 5 ของการทดลองเป็นต้นไป จะสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนในนมพ่องมันเนย พบว่าอนุภาคไลโปโซมบรรจุโนซิน และโนซินอิสระ สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตั้งแต่วันที่ 5 ของการทดลองเป็นต้นไป

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การนำนาโนเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้ร่วมกับสารออกฤทธิ์ชีวภาพ โดยการสร้างอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่มีสารออกฤทธิ์ทั้ง 3 ชนิด คือ อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุโนซิน กรดแลคติก และโนซินร่วมกับกรดแลคติก เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพให้กับสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพ และยาวนานมากขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองจะสังเกตพบว่า ในช่วงแรกของการทดลอง เชื้อทดสอบมีการเพิ่มจำนวนขึ้น เนื่องจากการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ของอนุภาคนาโนนั้น ยังไม่มากพอที่จะสามารถยับยั้งเชื้อที่มีปริมาณมากได้ จากการทดลองก็ยังคงพบว่า อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งทั้ง 3 ชนิด มีแนวโน้มในการยับยั้งเชื้อได้นานขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับสารออกฤทธิ์อิสระ ถ้าหากมีการเพิ่มระยะเวลาในการทดลอง

การนำไปประยุกต์ใช้ อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุไนซินร่วมกับกรดแลคติกสามารถนำไปใช้ในการยืดอายุของผลิตภัณฑ์อาหารได้ทุกชนิด เช่น นม ชีส อาหารกระป๋อง เป็นต้น โดยสามารถช่วยเสริมฤทธิ์การทำงานได้ดีขึ้นในการเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (Nykanen และคณะ, 1998) ที่มักก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนในอาหาร รวมทั้งผลของการประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนที่ส่งผลให้มีการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ที่ละน้อย ทำให้สารดังกล่าวสามารถออกฤทธิ์ได้ในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น ไม่สูญเสียแอกทิวิตีทางชีวภาพไป เนื่องจากการจับของไนซินกับโปรตีน และการถูกทำลายโดยเอนไซม์ที่มีอยู่ในอาหาร หากใช้ในรูปแบบไนซินอิสระ นอกจากนี้ เนื่องจากส่วนประกอบต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมอนุภาคนาโนนั้น ล้วนแล้วแต่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยทั้งไขมันแข็งอิมิวเตอร์ 900 และพอลิออกซาเมอร์ 188 ต่างได้รับการรับรองให้เป็นสารที่มีความปลอดภัย ให้สามารถใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารได้ ซึ่งทั้งนี้ต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพการคงแอกทิวิตีชีวภาพของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งบรรจุไนซินร่วมกับกรดแลคติกในอาหารต่อไป เพื่อเป็นการยืนยันว่าอนุภาคนาโนดังกล่าวนี้สามารถนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหารได้จริง และสามารถนำผลที่ได้ไปประยุกต์โดยการหาสารออกฤทธิ์อื่นๆ ที่มีสมบัติใกล้เคียงกับกรดแลคติก หรือมีสมบัติที่ดี และเหมาะสมกว่าในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ โดยนำมาใช้ร่วมกับไนซินที่บรรจุในอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งเพื่อเสริมฤทธิ์ และขยายระยะเวลาการทำงานของไนซินในการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารได้ดียิ่งขึ้นต่อไปในอนาคต

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- นวพร ล้าเลิศสกุล. 2549. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์พิทักษ์การพิมพ์
- พินิจพล พรหมบุตร. 2550. การสร้างอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่บรรจุในซินเพื่อคงแอกทิวิตียับยั้ง  
จุลินทรีย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- หยกฤทัย กุลวัฒนศาล. 2551. การเตรียมโนซินในรูปอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ  
ของการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุมนธา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์  
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
- สุมาลี เหลืองสกุล. 2541. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชัยเจริญ.

### ภาษาอังกฤษ

- Aasen, I. M., Markussen, S., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L., and Naterstad, K. 2003. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. Int J Food Microbiol. 87: 35-43.
- Allgaier, H., Jung, G., Werner, G. G., Schneider, U., and Zahner, H. 1986. Epidermin: sequencing of a heterodettetracyclic 21-peptide amide antibiotic. Eur. J. Biochem. 160: 9-22.
- Allison, G. E., Fremaux, C., and Klaenhammer, T. R. 1994. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of 2 peptides encoded within the lactacin F operon. J. Bacteriol. 176: 2235-41.
- Altena, K., Guder, A., Cramer, C., and Bierbaum, G. 2000. Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2565-71.

- Anderssen, E. L., Diep, D. B., Nes, I.F., Eijsink, V. G. H., and Nissen-Meijer, J. 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: 2 new 2-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. Appl. Environ. Microbiol. 6: 2269-72.
- Antonio, G., Hikmate, A., Rosario, L. L., and Nabil, B. O. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. Int. J. Food. Microbiol. 120: 51-70
- Aymerich, T., Holo, H., Håvarstein, L. S., Hugas, M., Garriga, M., and Nes, I.F. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1676-82.
- Benecha, R. O., Laridia, R, Kheadra, E. E., Vuilleumarda, J. C., and Lacroixa F. C. 2003. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. Int. J. Dairy. 13: 325–336.
- Brewer, R., Adams, M. R., and Park, S. F. 2002. Enhanced inactivation of *Listeria monocytogenes* by nisin in the presence of ethanol. Lett Appl Microbiol. 34: 18-21.
- Boziaris, I. S., Humpheson, L., and Adams, M. R. 1998. Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella Enteritidis* PT4. Int. J. Food. Microbiol. 43:7-13.
- Boziaris, I. S., and Adams, M. R. 2000. Transient sensitivity to nisin in cold-shocked gram negative. Lett. Appl. microbiol. 31:233-237.
- Budu-Amoako, E., Ablett, R. F., Harris, J., and Delves-Broughton, J. 1999. Combined effect of nisin and moderate heat on destruction of *Listeria monocytogenes* in cold-pack lobster meat. J. Food. Prot. 62:46-50.
- Buncic, S., Fitzgerald C. M., Bell R. G., and Hudson J. A. 1995. Individual and combined listericidal effects of sodium lactate, potassium sorbate, nisin and curing salts at refrigeration temperature. J Food Safety 15:247-64.
- Chen, H., and Hoover, D. G. 2003. Bacteriocins and their food applications. Comprehensive Rev. Food. Sci. Food. safe. 2: 82-100.

- Chikindas, M. L., and Montville, T. J. 2002. Perspectives for application of bacteriocins as food preservatives. In: Juneja, VK, Sofos, JN, editors. Control of foodborne microorganisms. New York: Marcel Dekker, Inc. pp 303-21.
- Choi, H. J., and Park, Y. H. 2000. Selective control of *lactobacilli* in kimchi with nisin. Lett. Appl. Microbiol. 30: 173-177.
- Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F., and Hernandez, P. E. 2001. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. Food Sci. Tech. Int. 7: 281–305.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., and Chikindas, M. L. 2001. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. Int. J. Food Microbiol. 71:1-20.
- Cutter, C. N., and Siragusa, G. 1995. Population reductions of Gram negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. J. Food Prot. 58: 977-83.
- Cutter, C. N., Willett, J. L., and Siragusa, G. R. 2001. Improved antimicrobial activity of nisin-incorporated polymer films by formulation change and addition of food grade chelator. Lett Appl Microbiol. 33: 325-328.
- Davies, E. A., Bevis, H. E., and Delves, B. J. 1997. The use of the bacteriocin, nisin as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 24: 343-346.
- Davies, E. A., Milne, C. F., Bevis, H. E., Potter, R. W., Harris, J. M., Williams, G.C., Thomas, L. V. and Delves, B. J., 1999. Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed bologna-type sausage. J. Food Prot. 62: 1004–1010.
- Delves, B. J. 1993. The use of EDTA to enhance the efficacy of nisin towards gram-negative bacteria. Int. Biodet. Biodeg. 32: 87-97.
- Delves, B. J. 2005. Nisin as a Food Preservative. Food Australia 12: 525-527.
- De Vuyst, L., and Vandamme, E. J. 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. In De Vuyst, L., and Vandamme, E. J. (eds.), Bacteriocins of lactic acid bacteria , pp. 152-199. United Kingdom: Chapman & Hall, The Alden Press.

- Dongsun, J., Bodyfelt, W. F., and Daechel, A. M. 1991. Influence of Fat and in Inhibiting *Listeria monocytogenes* Emulsifiers on the Efficacy of Nisin in Fluid Milk. Department of Food Science and Technology and Western Dairy Foods Research & Center Oregon State University Corvallis 97331.
- Driessen, A. J. M., van den Hooven, H. W., Kuiper, W., van de Kamp, M., Sahl, H-G., Konings, R. N. H., and Konings, W. N. 1995. Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. Biochemistry. 34: 1606-1614.
- Elezi, O., Kourkoutas, Y., Koutinas, A. A., Kanellaki, M., Bezirtzoglou, E., Batnett, Y. A. and Nigam, P. 2003. Food additive lactic acid production by immobilized cells of *Lactobacillus brevis* on delignified cellulosic material. J. Agric. Food Chem. 51 : 5285-5289
- FDA (U.S. Food & Drug Administration)/Federal Register. 1988. Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. 21 CFR Part 184, Fed Reg. 53:11247-51.
- Ferchichi, M., Frère, J., Mabrouk, K., and Manai, M. 2001. Lactococcin MMFII, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII, isolated from a Tunisian dairy product. FEMS. Microbiol. Lett. 205:49-55.
- Ferreira, M. A., and Lund, B. M. 1996. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese. Lett. Appl. Microbiol. 22: 433-438.
- Flores, S. H., Braga, A. L. D. M., and Alegre, R. M. 2003. A modified method for the turbidimetric assay of nisin. Braz. arch. biol. technol. 46: 479-481.
- Gill, A. O., and Holley, R. A. 2003. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 degrees C. Int J Food Microbiol. 80: 251-259.
- Gogus, U., Bozoglu, F., and Yurdugul, S. 2006. Comparative effects of lactic acid, nisin, coating combined and alone applications on some postmortem quality criteria of refrigerated *Sardina pilchardus*. J. of Food Quality 29: 658-671.



- Hastings, J. W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K. L., Vederas, J. C., and Stiles, M. E. 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. J. Bacteriol. 173: 7491-500.
- Hawley, H. B. 1957. Nisin in food technology. Food manuf. 32-370
- Hechard, Y., Derijard, B., Letellier, F., and Cenatiempo, Y. 1992. Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti- *Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. J. Gen. Microbiol. 138: 2725-31.
- Helander, I. M., and Mattila S. T. 2000. Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. Int. J. Food Microbiol. 60 : 153–161.
- Holck, A. L., Axelsson, L., Birkeland, S., Aukrust, T., and Blom, H. 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. J. Gen. Microbiol. 138:2715-20.
- Hoover, D. and Steenson, L. 1993. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. New York: Academic Press.
- Hurst, A., and Hoover, D. G. 1993. Nisin. In Davidson, P.M., and Branen, A.L. (eds.), Antimicrobials in foods, pp 369-407: New York: Marcel Dekker, Press.
- Hurst, A. 1981. Nisin. Adv. Appl. Microbiol. 27:85-123.
- Inga, M. A., and others. 2003. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. Int. J. Food Microbiol. 8:35– 43.
- Jeevaratnam, K., Jamuna, M. and Bawa, A. S. 2005. Biological preservation of food-bacteriocin of lactic acid bacteria. J. Biotech. 4: 446-456
- Jimenez-Diaz, R., and others. 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of 2 peptides. Appl. Environ. Microbiol. 61: 4459-63.
- Kalchayanand, N., Hanlin, M. B., and Ray, B. 1992. Sublethal injury makes gram-negative and resistant gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin ach and nisin. Lett. Appl. Microbiol. 15:239-243.

- Kellner, R., Jung, G., Horner, T., Zahner, H., Schnell, N., Entian, K. D. and Götz, F. 1988. Gallidermin: a new lanthionine-containing polypeptide antibiotic. Eur. J. Biochem. 177: 53-9.
- Laridi, R., Kheadr, E. E., Benech, R. O. Vuillemand, J. C. Lacroix, C., and Fliss, I. 2002. Liposome encapsulated nisin Z: optimization stability and release during milk fermentation. Int. Dairy. J. 13: 325-336.
- Leer, R. J., Van der Vossen, J. M. B. M., Van Giezen, M., Van Noort, J. M., and Pouwels, P. H. 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Microbiol. 141:1629-35.
- Letchford, K., and Burt, H. 2007. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. Eur. J. Pharm. Biopharm. 65: 259–269.
- Liu, W., and Hansen, J. N. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2551-2558.
- Malheiros, P. S., Daroit, D. J., Silveira N. P. and Brandeli, A. 2010. Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. Food. Microbiol. 27: 175-178
- Mansour, M., and Millière, J. B. 2001. An inhibitory synergistic effect of a nisin-monolaurin combination on *Bacillus* spp. vegetative cells in milk. Food. Microbiol. 18:87-94.
- Mantovani, H. C. and Russell, J. B. 2000. Nisin resistance of *Streptococcus bovis*. App. and Environ. Microbiol. 67:808-813
- McEntire, J. C., Montville, T. J., and Chikindas, M. L. 2003. Synergy between nisin and select lactates against *Listeria monocytogenes* is due to the metal cations. J Food Prot. 66: 1631-1636.
- Metivier, A., and others. 1998. Divercin V41, a new bacteriocin with 2 disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization. Microbiol. 144: 2837-44.

- Mortvedt, C. I., Nissen-Meyer, J., Sletten, K., and Nes, I. F. 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. Appl. Environ. Microbiol. 57:1829-34.
- Motlagh, A. M., Bhunia, A. K., Szostek, F., Hansen, T. R., Johnson, M. G., and Ray, B. 1992. Nucleotide and amino acid sequence of pap-gene (pediocin AcH production) in *Pediococcus acidilactici* H. Lett. Appl. Microbiol. 15: 45-8.
- Muller, H. R., Runge, S. A., Ravelli, V., Thunemann, A. F., Mehnert, W., and Souto, E. B. 2007. Cyclosporine loaded solid lipid nanoparticles (SLN) Drug-lipid physicochemical interaction and characterization of drug incorporation. Eur. J. Pharm. Biopharm. 68: 535-544.
- Murdock, C. A., Cleveland, J., Matthews, K. R., and Chikindas, M. L. 2007. The synergistic effect of nisin and lactoferrin of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. Lett. Appl. microbiol. 44:225-261.
- Nes, I. F., and Holo, H. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. Biopolymers. 55:50-61.
- Nissen-Meyer, J., Holo, H., Håvarstein, L. S., Sletten, K., and Nes, I. F. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of 2 peptides J. Bacteriol. 174: 5686-92.
- Nissen-Meyer, J., Larsen, G. A., Sletten, K., Daeschel, M., and Nes, I. F. 1993a. Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of 2 peptides. J. Gen. Microbiol. 139:1973-8.
- Nissen-Meyer, J., Havarstein, L. S., Holo, H., Sletten, K., and Nes, I. F. 1993b. Association of the lactococcal immunity factor with the cell membrane: purification and characterization of the immunity factor. J. Gen. Microbiol. 139:1503-9.
- Nykanen, A., Vesanen, S., and Kallio, H. 1998. Synergistic antimicrobial effect of nisin whey permeate and lactic acid on microbes isolated from fish. Lett Appl Microbiol. 27: 345-348.
- Oscariz, J. C., and Pisabarro, A. G. 2001. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. Int. Microbiol. 4:13-19.

- Pardeike, J., Hommoss, A., and Muller, H. R. 2009. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. Int. J. Pharm. 366: 170-184
- Periago, P. M., and Moezelaar, R. 2001. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. Int. J. Food. Microbiol. 68:141-8.
- Phillips, C. A. 1999. The effect of citric acid, lactic acid, sodium citrate and sodium lactate, alone and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri*. Lett. in Appl. Microbiol. 29: 424-428
- Piard, J. C., Muriana, P. M., Desmazeaud, P. J., and Klaenhammer, T. R. 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. Appl. Environ. Microbiol. 58: 279-84.
- Pongtharangkul, T., and Demirci, A. 2004. Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification. Appl. Microbiol. Biotechnol., 65: 268-72.
- Ray, B. 1992. Nisin of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* as a food preservative. In B. Ray, M. Daeschel (eds). Food Biopreservatives of Microbiol Origin. 207-264 .
- Reddy, L. H., Vivek, K., Bakshi, N., and Murthy, R. S. R. 2006. Tamoxifen citrate loaded solid lipid nanoparticles (SLNs): preparation, characterization, in vitro drug release, and pharmacokinetic evaluation. Pharm. Dev. Tech. 11: 167-177
- Rose, N. L., Sporns, P., and McMullen, L. M. 1999. Detection of bacteriocins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Appl. Environ. Microbiol., 65: 2238-2242.
- Sahl, H. G., and Bierbaum, G. 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 52:41-79.
- Salmaso, S., Elavassore, N., Bertucco, A, A., and Caliceti, P. 2004. Nisin-loaded poly-L-lactide nano-particles produced by CO<sub>2</sub> anti-solvent precipitation for sustained antimicrobial activity. Int. J. Pharm. 287: 163-173.

- Schwarz, C., and Mehnert, W., 1999. Solid lipid nanoparticle (SLN) for controlled drug delivery II. Drug incorporation and physicochemical characterization. J. Microencapsulation. 16:205-213.
- Shirazinejad, A. R., Noryati, I., Rosma, A. and Darah, I. 2010. Inhibitory effect of lactic acid and nisin on bacterial spoilage of chilled shrimp. World Academy of Science Engineering and Technology. 65: 163-167.
- Stevens, K. A., Sheldon, B. W., Klapes, N. A., and Klaenhammer, T. R. 1991. Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other Gram-negative bacteria. Appl. and Environmental Microbiol. 57: 3613–3615.
- Thomas, L. V., Davies, E. A., Delves-Broughton, J., and Wimpenny, J. W. 1998. Synergist effect of sucrose fatty acid esters on nisin inhibition of gram-positive bacteria. J. Appl. Microbiol. 85:1013-22.
- Thongbaia, B., Gasalucka, P., and Waites, W.M. 2006. Morphological changes of temperature- and pH-stressed Salmonella following exposure to cetylpyridinium chloride and nisin. Food Science and Technology. 39 :1180–1188.
- Tichaczek, P.S., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Vogel, R.F., and Hammes, W.P. 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. Syst. Appl. Microbiol. 15: 460-8.
- Van Belkum, M. J., Hayema, B. J., Geis, A., Kok, J., and Venema, G. 1991. Organization and nucleotide sequences of 2 lactococcal bacteriocin operons. Appl. Environ. Microbiol. 57:492-8.
- Vaughan, E. E., Daly, C., and Fitzgerald, G. F. 1992. Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. J. Appl. Bacteriol. 73:299-308.
- Wanding, L. R., Sheldon, B. W., and Foegeding, P. M. 1999. Nisin in milk sensitizes *Bacillus* spores to heat and prevents recovery of survivors. J. Food protect. 62 : 492-498.
- Wiedemann, E., and others. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. J. Biol. Chem. 3: 1772-1779.

- Wolfgang, M., and Karsten, M. 2001. Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. Advanced Drug Delivery Rev. 47:165–196.
- Worobo, R. W., VanBelkum, M. J., Sailer, M., Roy, K. L., Vederas, J. C., and Stiles, M. E. 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. J. Bacteriol. 177: 3143-9.
- Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K. 2003. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67: 1616-1619.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

## สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

## 1. สูตรอาหาร PYG (Peptone Yeast extract Glucose) (Murdock และคณะ, 2007)

เพปโตน (Bacto Peptone)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.25	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับ pH เริ่มต้น 7.0 ینگมาเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 2. สูตรอาหารแข็ง PYG (Peptone Yeast extract Glucose agar) (Murdock และคณะ, 2007)

เพปโตน (Bacto Peptone)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.25	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	10.0	กรัม
วุ้นผง (agar)	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับ pH เริ่มต้น 7.0 ینگมาเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



## ภาคผนวก ข

## สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 4.0 ที่มีไฮเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5

ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร ประกอบด้วย

กรดฟอสฟอริก ( $H_3PO_4$ )	0.16	มิลลิลิตร
ไฮเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $NaH_2PO_4$ )	14.0	กรัม
ไฮเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ปรับ pH เท่ากับ 4.0 ด้วยสารละลายไฮดรอกไซด์		

2. สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 4.0 ที่มีไฮเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1.0

ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร ประกอบด้วย

กรดฟอสฟอริก ( $H_3PO_4$ )	0.16	มิลลิลิตร
ไฮเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $NaH_2PO_4$ )	14.0	กรัม
ไฮเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10.0	กรัม
ปรับ pH เท่ากับ 4.0 ด้วยสารละลายไฮดรอกไซด์		

3. สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 7.0 ที่มีไฮเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5

ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร ประกอบด้วย

ไฮเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $NaH_2PO_4$ )	5.49	กรัม
ไดไฮเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $Na_2HPO_4$ )	8.55	กรัม
ไฮเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ปรับ pH เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายไฮดรอกไซด์		

4. สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 7.0 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1.0

ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร ประกอบด้วย

โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	5.49	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	8.55	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ )	10.0	กรัม

ปรับ pH เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

5. สารละลายกรดไตรฟลูโอโรอะซิติกร้อยละ 0.05 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในน้ำ

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

กรดไตรฟลูโอโรอะซิติก (Trifluoroacetic acid)	0.5	มิลลิลิตร
น้ำปลออดประจุ (Double Distillation of Deionized Water)	999.5	มิลลิลิตร

นำไปกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซิเตต ขนาดความกว้างรู 0.45

ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร

6. สารละลายกรดไตรฟลูโอโรอะซิติกร้อยละ 0.05 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในอะซิโตรไนไตรล์

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

กรดไตรฟลูโอโรอะซิติก (Trifluoroacetic acid)	0.5	มิลลิลิตร
อะซิโตรไนไตรล์ (Acetonitrile)	999.5	มิลลิลิตร

นำไปกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซิเตต ขนาดความกว้างรู 0.45

ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร

7. สารละลายกรดแลคติกร้อยละ 90 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในน้ำ

เตรียมเป็น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรดแลคติก (Lactic acid)	5.9	มิลลิลิตร
น้ำปลออดประจุ (Double Distillation of Deionized Water)	44.1	มิลลิลิตร

นำไปกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซิเตต ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมโครเมตร

เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร

## ภาคผนวก ค

### การวิเคราะห์ปริมาณไนซินและกรดแลคติกด้วย HPLC

วิเคราะห์ปริมาณไนซินด้วยเครื่องแยกสารโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงแบบรีเวิร์สเฟส (Reverse phase HPLC)

โดยมี คอลัมน์เป็นตัวยึดเกาะ: C-18

ตัวชะคอลัมน์ตัวที่หนึ่ง (สารละลาย A) : กรดไตรฟลูโอโรอะซิติก (TFA) ร้อยละ 0.05  
(ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งละลายในน้ำ

ตัวชะคอลัมน์ตัวที่สอง (สารละลาย B) : กรดไตรฟลูโอโรอะซิติก (TFA) ร้อยละ 0.05  
(ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งละลายในอะซิโตไนไตรล์

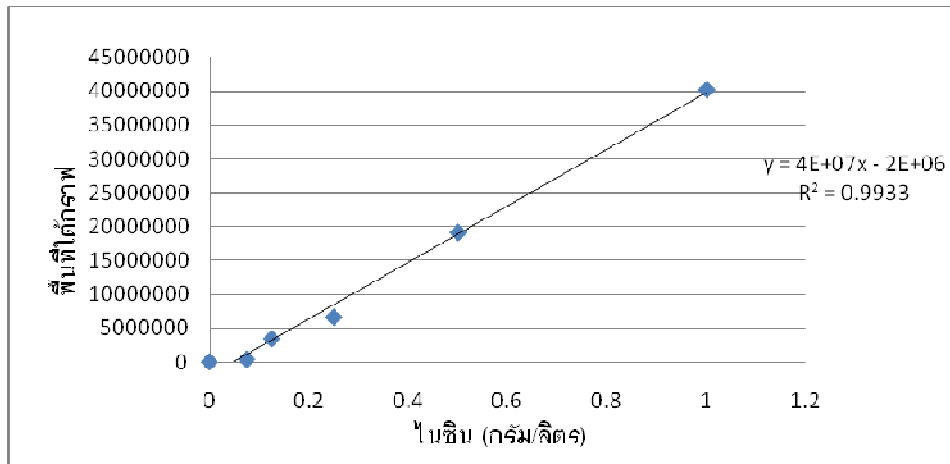
นำสารละลาย A และสารละลาย B ไปกำจัดแก๊สออกจากของเหลว (degas) ด้วยระบบกำจัดแก๊สในตัวเครื่อง HPLC ก่อนนำมาใช้

ในช่วง 5 นาทีแรกของการวิเคราะห์ ทำการชะคอลัมน์ด้วยสารละลาย A และ สารละลาย B ในปริมาณเท่ากับร้อยละ 20 และ ร้อยละ 80 ตามลำดับ จากนั้นที่เวลา 5-20 นาที ค่อยๆปรับให้ความเข้มข้นของสารละลาย A เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 20 ไปจนถึงร้อยละ 80 และสารละลาย B ค่อยๆ ลดลงจากร้อยละ 80 ไปจนถึงร้อยละ 20 โดยใช้อัตราไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที วิเคราะห์ปริมาณไนซิน และ เซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 220 และ 258 นาโนเมตรตามลำดับ ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยโครมาโตแกรมแสดงค่าเวลาที่คงอยู่ (retention time;  $R_t$ )

## ภาคผนวก ง

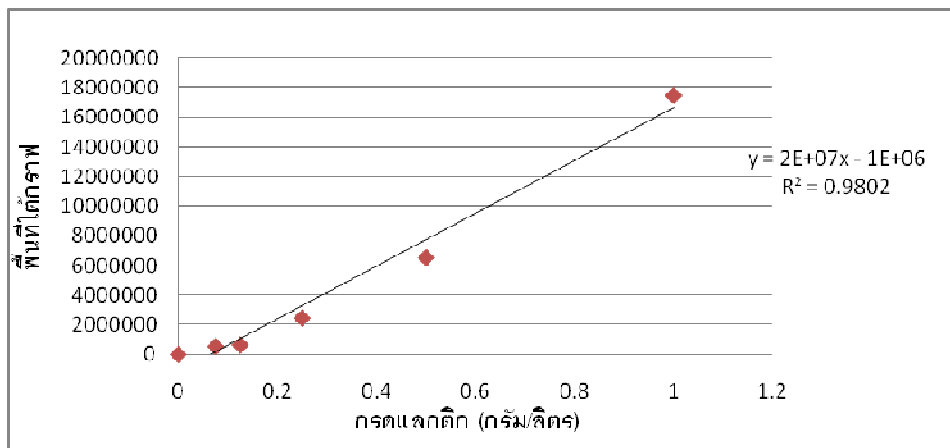
## กราฟมาตรฐาน

## 1. กราฟมาตรฐานไนซิน



รูปที่ 6.1 กราฟมาตรฐานของไนซินความเข้มข้น 0-1 กรัมต่อลิตร

## 2. กราฟมาตรฐานกรดแลคติก



รูปที่ 6.2 กราฟมาตรฐานของกรดแลคติกความเข้มข้น 0-1 กรัมต่อลิตร

## ภาคผนวก จ

## วิธีการคำนวณ

ตารางที่ 6.1 การคำนวณค่าต่างๆ

ชุดการทดลอง	ปริมาณสารที่ต้องการทดสอบ (มิลลิลิตร)					
	ไนซิน (กรัม)	กรดแลคติก (มิลลิลิตร)	อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอิม วิตอร์ 900			
			ไม่มีการ บรรจุ	บรรจุ ไนซิน	บรรจุ กรดแลคติก	บรรจุไนซิน และ กรดแลคติก
ชุดควบคุม	-	-	-	-	-	-
ชุดการทดลองไนซิน อิสระ	ไนซิน 1 mg = 1,168 IU 1,000 IU = <u>1,168</u> 1,000 = 0.856 mg 0.856 g	-	-	-	-	-
ชุดการทดลอง กรดแลคติกอิสระ	-	จากกรดแลคติก 10,000 mg/L เตรียมเป็น 500 µg/L = 50 µl	-	-	-	-
ชุดการทดลองไนซิน และ กรดแลคติกอิสระ	ไนซิน 1 mg = 1,168 IU 1,000 IU = <u>1,168</u> 1,000 = 0.856 mg 0.856 g	จากกรดแลคติก 10,000 mg/L เตรียมเป็น 500 µg/L = 50 µl	-	-	-	-

ตารางที่ 6.1 การคำนวณค่าต่างๆ (ต่อ)

ชุดการทดลอง	ปริมาณสารที่ต้องการทดสอบ (ไมโครลิตร)					
	ไนซิน (กรัม)	กรดแลคติก (มิลลิลิตร)	อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งอิมิเตอร์ 900			
			ไม่มีการ บรรจุ	บรรจุไนซิน	บรรจุ กรดแลคติก	บรรจุไนซิน และ กรดแลคติก
ชุดควบคุมลบ	-	-	เตรียมร้อยละ 5 ของ ปริมาตร ทั้งหมด = 25 ml	-	-	-
ชุดการทดลอง อนุภาคนาโนบรรจุไน ซิน	-	-	-	อนุภาคนาโน 500 ml มีไนซิน 2,920,000 IU ถ้าไนซิน 1,000 IU 0.169 ml = 169 µl	-	-
ชุดการทดลอง อนุภาคนาโนบรรจุ กรดแลคติก	-	-	-	-	จากกรดแลคติก 10,000 mg/L เตรียมเป็น 500 µg/L = 50 µl	-
ชุดการทดลอง อนุภาคนาโนบรรจุ ไนซิน ร่วมกับกรด แลคติก	-	-	-	-	-	อนุภาคนาโน 500 ml มีไนซิน 1,950,560 IU 1,000 IU = 2.56 ml มีกรดแลคติก 41.8 µl ใช้ทั้งสิ้น =21.09 µl

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพิมลพร ศรีราช เกิดเมื่อวันที่ 11 ตุลาคม พ.ศ.2527 ที่จังหวัดร้อยเอ็ด สำเร็จปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2550 และเข้ารับการศึกษต่อในระดับปริญญาโทบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551

