

การตรวจติดตาม *Escherichia coli* และ *Listeria monocytogenes* ที่ถูกกระทำด้วยไนซินและ เซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์โดยเทคนิค Atomic force microscopy และ Raman spectroscopy

นางสาวฉัตรนภา อินทนนท์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MONITORING OF NISIN AND CETYLPYRIDINIUM CHLORIDE TREATED *Escherichia coli*
AND *Listeria monocytogenes* USING ATOMIC FORCE MICROSCOPY AND RAMAN
SPECTROSCOPY

Miss Chatnapa Intanont



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 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การตรวจติดตาม *Escherichia coli* และ *Listeria monocytogenes* ที่ถูกกระทำด้วยไนซินและเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์โดยเทคนิค Atomic force microscopy และ Raman spectroscopy

โดย นางสาวฉัตรนภา อินทนนท์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ดร. ญัฐพันธุ์ ศุภกา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร. ญัฐพันธุ์ ศุภกา)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เรืองสำราญ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร. ปิยวิทย์ คุ่มพงษ์)

ฉัตรนภา อินทนนท์ : การตรวจติดตาม *Escherichia coli* และ *Listeria monocytogenes* ที่ถูกกระทำด้วยไนซินและเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์โดยเทคนิค Atomic force microscopy และ Raman spectroscopy (MONITORING OF NISIN AND CETYLPYRIDINIUM CHLORIDE TREATED *Escherichia coli* AND *Listeria monocytogenes* USING ATOMIC FORCE MICROSCOPY AND RAMAN SPECTROSCOPY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. ณัฐพันธุ์ ศุภกา, 113 หน้า.

การทำงานร่วมกันของไนซินและเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (CPC) ในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *L. monocytogenes* ศึกษาได้จากการเปลี่ยนแปลงของผิวเซลล์โดยเทคนิค Atomic force microscopy (AFM) ซึ่งมีความละเอียดสูงอีกทั้งยังสามารถเห็นภาพของแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตได้ และเทคนิค Raman spectroscopy ที่สามารถศึกษาในระดับหมู่ฟังก์ชันและแสดงตำแหน่งของสารออกฤทธิ์ได้ ผลจากการทดลองพบว่าค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุด (Minimum inhibitory concentration, MIC) ของไนซินและ CPC ต่อการออกฤทธิ์ยับยั้ง *L. monocytogenes* คือ 125 IU/มิลลิลิตร และ 0.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การยับยั้ง *E. coli* คือ 30,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 3.175 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลจากการศึกษาการทำงานร่วมกันแสดงให้เห็นว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างการทำงานเชิงเดี่ยวหรือทำงานร่วมกัน อย่างไรก็ตาม ผลจาก AFM แสดงถึงผลการออกฤทธิ์ทำลายเซลล์โดยละเอียดซึ่งแสดงให้เห็นว่าการทำงานร่วมกันของไนซินและ CPC ในการยับยั้ง *E. coli* และ *L. monocytogenes* สามารถส่งผลให้เซลล์เกิดความเสียหายรุนแรงอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับการทำงานเชิงเดี่ยว ในขณะที่ผลจากการศึกษาด้วยเทคนิค Raman spectroscopy พบว่าเกิดการกระเจิงแสงในรูปแบบที่แตกต่างกันโดยไนซิน, CPC และเซลล์ *E. coli* แสดงพีครามานที่ 3090 cm^{-1} , 1652 cm^{-1} และ 2934 cm^{-1} ตามลำดับ นอกจากนี้ผลจากการทำแผนที่รามานแสดงให้เห็นถึงตำแหน่งการทำงานของสารออกฤทธิ์ที่กระจายตัวอยู่ในรูปแบบสุ่มบนผิวเซลล์ทั้งไนซินและ CPC แต่บริเวณรอบเซลล์นั้นพบว่าสารทั้งสองชนิดมีการกระจายตัวที่แยกออกจากกัน จึงสามารถสรุปได้ว่าเทคนิคทั้งสองชนิดนี้มีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารชีวโมเลกุล และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาสารลดนมอาหารที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2558	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5571946223 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: NISIN, CETYLPYRIDINIUM CHLORIDE, BACTERIAL CELL IMAGING, ATOMIC FORCE MICROSCOPY, RAMAN SPECTROSCOPY, RAMAN MAPPING

CHATNAPA INTANONT: MONITORING OF NISIN AND CETYLPYRIDINIUM CHLORIDE TREATED *Escherichia coli* AND *Listeria monocytogenes* USING ATOMIC FORCE MICROSCOPY AND RAMAN SPECTROSCOPY. ADVISOR: ASST. PROF. SUPAT CHAREONPORNWATTANA, Ph.D., CO-ADVISOR: NATTAPUN SUPAKA, Ph.D., 113 pp.

Nisin and cetylpyridinium (CPC) have been used as antimicrobial agents to against wide variety of bacteria for food preservation. The objective of this study was to use Atomic force microscopy (AFM) and Raman spectroscopy to investigate the antimicrobial agents localization and morphological changes that occurred in *L. monocytogenes* and *E. coli* cells treated with nisin and CPC. The minimal inhibitory concentration (MIC) by microtiter plate assay, of nisin and CPC against *L. monocytogenes* was found to be 125 IU/mL and 0.75 µg/mL, respectively. The MIC against *E. coli* was 30,000 IU/mL and 3.175 µg/mL, respectively. Both separately and in combination showed that indifference. However, AFM examination revealed severely injured cells when *L. monocytogenes* and *E. coli* were exposed to a combination of nisin and CPC. The Raman peak signal of CPC (1652 cm^{-1}) and nisin (3090 cm^{-1}) were observed on bacterial cell membrane (2934 cm^{-1}) after *E. coli* cells were exposed to a combination of nisin and CPC. The Raman mapping demonstrated the detailed information of antimicrobial agent composition that were localized and randomly distributed on bacterial cell membrane. In conclusion, AFM and Raman spectrometer were effective tools for investigating antimicrobial activity on bacterial cells and could be useful tools for studying antimicrobial effects of biochemical compound especially for food preservation.

Department: Microbiology Student's Signature

Field of Study: Industrial Microbiology Advisor's Signature

Academic Year: 2015 Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.ณัฐพันธุ์ ศุภกา ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งท่านได้ให้ความรู้ ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆอันเป็นประโยชน์ในการทำงานวิจัยเป็นอย่างยิ่ง อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงานจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณประธานการสอบวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ และ ดร. ปิยวิทย์ คุ้มพงษ์ ที่สละเวลาในการสอบวิทยานิพนธ์ตลอดจนค่าปรึกษาที่มีประโยชน์ยิ่ง ขอขอบพระคุณนาย อลงกต ตริทอง ที่อำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์เครื่องมือสำหรับการทำงานวิจัยตลอดจนคำแนะนำต่างๆที่มีประโยชน์เป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือเพื่อนำมาศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณบิดาและมารดา ตลอดจนครอบครัวและผู้ที่เกี่ยวข้อง ที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนในด้านต่างๆ จนทำให้สำเร็จการศึกษาครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
สารบัญตาราง.....	ต
บทที่ 1 บทนำ.....	17
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	20
2.1 ไนซิน.....	20
2.1.1 โครงสร้างไนซิน.....	21
2.1.2 ประวัติการค้นพบไนซิน.....	21
2.1.3 สมบัติของไนซิน.....	22
2.1.4 ประเภทของไนซิน.....	23
2.1.5 กลไกการทำงานของไนซิน.....	24
2.1.6 การประยุกต์ใช้ไนซินในอุตสาหกรรม.....	25
2.1.7 ปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของไนซิน.....	27
2.1.8 การเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้ไนซิน.....	28
2.2 เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์.....	30
2.2.1 โครงสร้างของเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์.....	31
2.2.2 สมบัติของเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์.....	31
2.2.3 กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์.....	32
2.2.5 การประยุกต์ใช้เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์.....	33

2.2.4	ปัจจัยที่ส่งผลต่อเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์	34
2.3	กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิด Field emission	35
2.3.1	หลักการการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิด Field emission.....	36
2.3.2	ประเภทการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิด Field emission.....	37
2.3.4	การประยุกต์ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิด Field emission	38
2.4	กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม.....	41
2.4.1	หลักการการทำงานของกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม	42
2.4.2	ประเภทการทำงานของกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม	42
2.4.3	การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม	46
2.4.4	การประยุกต์ใช้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม.....	48
2.5	รามานสเปกโทรสโกปี	52
2.5.1	ข้อดีของเทคนิครามานสเปกโทรสโกปี	53
2.5.2	หลักการการทำงานของรามานสเปกโทรสโกปี	53
2.5.3	การถ่ายภาพด้วยรามานสเปกโทรสโกปี	55
2.5.4	การขยายสัญญาณรามาน	56
2.5.5	การประยุกต์ใช้รามานสเปกโทรสโกปี	58
บทที่ 3	อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย	62
3.1	อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	62
3.2	เคมีภัณฑ์.....	62
3.3	จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	63
3.4	วิธีดำเนินงานวิจัย.....	63
3.4.1	เตรียมสารออกฤทธิ์และแบคทีเรียตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย	63

3.4.2 การหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทำงานของไนซิน เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ และการทำงานร่วมกันของไนซินและเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์	64
3.4.3 ศึกษารูปร่างภายนอกที่เปลี่ยนไปของเซลล์จากการออกฤทธิ์ร่วมกันที่ความเข้มข้นต่างๆภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (FE-SEM).....	65
3.4.4 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายนอกของเซลล์ที่มีชีวิตอย่างละเอียดขณะเซลล์ยังมีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM).....	65
3.4.5 ศึกษาตำแหน่งการทำงานของสารออกฤทธิ์ภายใต้กล้องรามานสเปกโทรมิเตอร์ (Raman spectrometer).....	66
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	67
4.1 การหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทำงานของไนซิน เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ และการทำงานร่วมกันของไนซินและเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์	67
4.2 ผลการศึกษารูปร่างภายนอกที่เปลี่ยนไปของเซลล์จากการออกฤทธิ์ร่วมกันที่ความเข้มข้นต่างๆภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (FE-SEM)	73
4.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายนอกของเซลล์ที่มีชีวิตอย่างละเอียดขณะเซลล์ยังมีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM).....	76
4.4 ผลการศึกษาตำแหน่งการทำงานของสารออกฤทธิ์ภายใต้กล้องรามานสเปกโทรมิเตอร์ (Raman spectrometer)	88
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	91
รายการอ้างอิง	92
ภาคผนวก.....	104
ภาคผนวก ก	104
ภาคผนวก ข	105
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	113

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของไนซิน.....	21
รูปที่ 2.2 ประวัติการค้นพบไนซิน.....	22
รูปที่ 2.3 โครงสร้างปฐมภูมิของไนซิน A ไนซิน Z และ ไนซิน Q.....	23
รูปที่ 2.4 กลไกการทำงานของไนซิน.....	25
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์.....	31
รูปที่ 2.6 กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์.....	32
รูปที่ 2.7 ภาพถ่ายภายนอกของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (FE-SEM) รุ่น versa 3D ของบริษัท FEI.....	36
รูปที่ 2.8 การจำลองหลักการทำงานของเครื่องกำเนิดอิเล็กตรอนแบบ Field emission.....	36
รูปที่ 2.9 ภาพจำลองหลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	37
รูปที่ 2.10 ภาพลวดนาโนที่ผลิตจาก <i>S. oneidensis</i> MR-1 และ <i>P. thermopropionicum</i> เจริญร่วมกับ <i>M. thermoautotrophicus</i> ภายใต้ SEM และ STM.....	38
รูปที่ 2.11 ภาพ FE-SEM ของ Tol 5 ที่เรียงตัวกันเป็นกลุ่มก้อนหลายชั้น ลักษณะการยึดเป็นเส้นตรงของเซลล์กับพื้นผิว และลักษณะการยึดของเซลล์เป็นแบบเส้นที่เกี่ยวพันจากเซลล์ไปยังพื้นผิว.....	39
รูปที่ 2.12 ภาพ FE-SEM ของ <i>S. aureus</i> ถูกยับยั้งด้วยอนุภาคนาโนซิลเวอร์ <i>E. coli</i> และ <i>E. coli</i> ที่ถูกยับยั้งด้วยอนุภาคนาโนซิลเวอร์.....	40
รูปที่ 2.13 ภาพ FE-SEM แสดงเซลล์ <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> และ <i>D. geothermalis</i> ที่ภาวะต่างๆ (ภาวะควบคุม, เติมสาร Ods และ เติมสาร QAS) แถบสเกลขนาด 1 ไมโครเมตร.....	40
รูปที่ 2.14 ภาพถ่ายภายนอกของกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมรุ่น Bio-AFM ของบริษัท JPK Instruments.....	41
รูปที่ 2.15 แสดงภาพจำลองหลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม.....	42
รูปที่ 2.16 แสดงแผนภาพของระบบการสร้างภาพแบบสัมผัสในกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม.....	43

รูปที่ 2.17	แผนภาพของระบบการสร้างภาพแบบไม่สัมผัสในกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม	44
รูปที่ 2.18	แสดงแผนภาพของระบบการสร้างภาพแบบเคาะในกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม.....	44
รูปที่ 2.19	ภาพจำลองผลการวิเคราะห์แรงระหว่างปลายแหลมกับพื้นผิวตัวอย่างด้วยเครื่อง AFM แบบเชิงปริมาณ โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแรงและระยะทาง	45
รูปที่ 2.20	แสดงภาพที่ได้จากระบบการสร้างภาพแบบไม่สัมผัสด้วย AFM ของ SLNs	49
รูปที่ 2.21	แสดงภาพที่ได้จากระบบการสร้างภาพแบบไม่สัมผัสด้วย AFM ของอนุภาคนาโนจาก พอลิยูรีเทนที่ขนาดภาพ 5 ไมโครเมตรบนพื้นผิวไมกาและซิลิกอนที่ชอบน้ำ.....	50
รูปที่ 2.22	แสดงภาพการคลายปมดีเอ็นเอของเอนไซม์ Topo II ในเวลาต่างๆ ด้วย AFM.....	50
รูปที่ 2.23	แสดงภาพที่ได้จากระบบการสร้างภาพแบบไม่สัมผัสด้วย AFM ของอนุภาค SRHA (Suwannee River humic acids) ที่ pH 4.4 ที่ขนาดภาพ 2 ไมโครเมตร.....	51
รูปที่ 2.24	แสดงภาพที่ได้จากระบบการสร้างภาพแบบไม่สัมผัสด้วย AFM ของเซลล์ดั้งเดิม 221	52
รูปที่ 2.25	แสดงภาพเครื่องรามานสเปกโตรมิเตอร์ (Raman spectrometer) รุ่น NTEGRA- spectra บริษัท NT-MDT.....	53
รูปที่ 2.26	แสดงรูปแบบการกระเจิงแสงแบบยืดหยุ่นและไม่ยืดหยุ่นของรามานสเปกโทรสโกปี.....	54
รูปที่ 2.27	แสดงการจำลองหลักการทำงานของเครื่องรามานสเปกโตรมิเตอร์.....	55
รูปที่ 2.28	ภาพถ่ายรามานของ <i>Bacillus subtilis</i> และ <i>Staphylococcus epidermidis</i> และ ยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ด้วยระบบคอนโฟคัลรามาน (Confocal Raman) ใช้ เลเซอร์ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตรโดย.....	58
รูปที่ 2.29	ภาพถ่ายรามานของเซลล์ <i>E. coli</i> O157:H7 และ <i>L. monocytogenes</i>	59
รูปที่ 2.30	ผลจากการใช้เทคนิครามานสเปกโทรสโกปีของไซโทซอลในเซลล์เนื้อเยื่อโดยใช้ ลำแสงเลเซอร์ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร แสดงรามานพิกของสารต่างๆ และแสดง ภาพถ่ายรามานของไซโทโครม (750 cm^{-1}), โปรตีน (1689 cm^{-1}) และ ไขมัน (2855 cm^{-1})	60
รูปที่ 2.31	แสดงภาพถ่ายรามานของรากแครอทตัดขวาง โดยภาพเนื้อเยื่อไซเลมและแคมเบียม มี ช่วงสัญญาณรามานอยู่ในช่วง 2940 cm^{-1} ซึ่งมีรามานพิกของเซลลูโลส (1094 cm^{-1}), เพกทิน (856 cm^{-1}) และลิกนิน (1600 cm^{-1}).....	61

รูปที่ 4.1 การยับยั้ง *L. monocytogenes* ของไนซินที่ความเข้มข้น 62.5-250 IU/มิลลิลิตรใน
ระยะเวลาต่างๆ 67

รูปที่ 4.2 การยับยั้ง *L. monocytogenes* ของ CPC ที่ความเข้มข้น 0.375-12.5 ไมโครกรัม/
มิลลิลิตร ในระยะเวลาต่างๆ 68

รูปที่ 4.3 การยับยั้ง *E. coli* ของไนซินที่ความเข้มข้น 5,000-30,000 IU/มิลลิลิตรในระยะเวลา
ต่างๆ 69

รูปที่ 4.4 การยับยั้ง *E. coli* ของ CPC ที่ความเข้มข้น 0.75-12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใน
ระยะเวลาต่างๆ 69

รูปที่ 4.5 การยับยั้ง *L. monocytogenes* ของ CPC ที่ความเข้มข้น 0.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
กับไนซินที่ ความเข้มข้น 7.8-125 IU/มิลลิลิตร ในระยะเวลาต่างๆ 70

รูปที่ 4.6 การยับยั้ง *E. coli* ของ CPC ที่ความเข้มข้น 3.175 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กับไนซินที่ค
วามเข้มข้น 7,500-30,000 IU/มิลลิลิตร ในระยะเวลาต่างๆ 71

รูปที่ 4.7 ภาพ AFM ที่ได้จากค่าความสูงของเซลล์ *L. monocytogenes* ใน PBS บัฟเฟอร์ที่ถูก
ตรึงบน PLL เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซินที่ความเข้มข้น MIC นาน 6 ชั่วโมง เซลล์ที่ถูกยับยั้ง
ด้วย CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง และเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC ที่
ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง 77

รูปที่ 4.8 ภาพ AFM ที่ได้จากค่า Adhesion ของเซลล์ *L. monocytogenes* ใน PBS บัฟเฟอร์ที่
ถูกตรึงบน PLL เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซินที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง เซลล์ที่ถูก
ยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง และเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC
ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง 78

รูปที่ 4.9 ภาพ AFM ที่ได้จากค่าความชันกราฟของเซลล์ *L. monocytogenes* ใน PBS บัฟเฟอร์
ที่ถูกตรึงบน PLL เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซินที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง เซลล์ที่ถูก
ยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง และเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC
ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง 79

รูปที่ 4.17 กราฟสเปกตรัมรามานของ <i>E. coli</i> (2934 cm^{-1}) ไนซิน (3090 cm^{-1}) และ CPC (1652 cm^{-1}) และภาพแผนที่รามานของ <i>E. coli</i> และ <i>E. coli</i> ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน, CPC และไนซิน-CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง.....	90
รูปที่ ข1 กราฟสเปกตรัมรามานของ <i>E. coli</i> ATCC 25922 โดยใช้เทคนิค SERS ด้วยซิลเวอร์นาโน ที่ 532 นาโนเมตร	105
รูปที่ ข2 กราฟสเปกตรัมรามานของไนซินโดยใช้เทคนิค SERS ด้วยซิลเวอร์นาโน ที่ 532 นาโนเมตร.....	105
รูปที่ ข3 กราฟสเปกตรัมรามานของ CPC โดยใช้เทคนิค SERS ด้วยซิลเวอร์นาโน ที่ 532 นาโนเมตร.....	106



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1	โนซินชนิดต่างๆแบ่งตามโครงสร้างที่แตกต่างกัน	24
ตารางที่ 2.2	การประยุกต์ใช้โนซินเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์	27
ตารางที่ 2.3	การเลือกใช้สารต่างๆในการตรึงแบคทีเรียในของเหลวเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ด้วย AFM	47
ตารางที่ 2.4	แสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง (SLNs) ที่สร้างจาก 2,3 ไดแอลคาโนอิลไซโคลเดกซ์ที่ได้จากการวัดด้วยวิธีต่างๆ.....	48
ตารางที่ 3.1	ความเข้มข้นสุดท้ายของสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ทดลองเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม.....	64
ตารางที่ 4.1	ดัชนี FIC มาตรฐาน และการแปรผลเพื่ออธิบายลักษณะของการทำงานร่วมกันของสาร.....	71
ตารางที่ 4.2	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบและค่าดัชนี FIC ของการทำงานร่วมกันของโนซินและ CPC	72
ตารางที่ 4.3	แสดงรูปร่างภายนอกของเซลล์ <i>L. monocytogenes</i> ที่ถูกยับยั้งด้วย โนซิน, CPC และ โนซิน-CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้อง FE-SEM ที่กำลังขยายต่างๆ	74
ตารางที่ 4.4	แสดงรูปร่างภายนอกของเซลล์ <i>E. coli</i> ที่ถูกยับยั้งด้วย โนซิน,CPC และ โนซิน-CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้อง FE-SEM ที่กำลังขยายต่างๆ.....	75
ตารางที่ ข1	ค่าดูดกลืนแสง (OD ₄₅₀) ของ <i>L. monocytogenes</i> ที่ถูกยับยั้งด้วยโนซิน ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ.....	107
ตารางที่ ข2	ค่าดูดกลืนแสง (OD ₄₅₀) ของ <i>L. monocytogenes</i> ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ.....	108
ตารางที่ ข3	ค่าดูดกลืนแสง (OD ₄₅₀) ของ <i>E. coli</i> ที่ถูกยับยั้งด้วยโนซิน ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ	109

ตารางที่ ข4 ค่าดูดกลืนแสง (OD ₄₅₀) ของ <i>E. coli</i> ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ	110
ตารางที่ ข5 ค่าดูดกลืนแสง (OD ₄₅₀) ของ <i>L. monocytogenes</i> ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้น 0.75 µg/ml และโนซินที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ.....	111
ตารางที่ ข6 ค่าดูดกลืนแสง (OD ₄₅₀) ของ <i>E. coli</i> ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้น 3.175 µg/ml และโนซินที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ.....	112



บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันมีการเพิ่มขึ้นของประชากรโลกอย่างมาก ดังนั้นความต้องการอาหารจึงมีมากขึ้น ด้วยเช่นกัน การผลิตอาหารปริมาณมากในระดับอุตสาหกรรมจึงเป็นการตอบสนองความต้องการของประชากรที่มีมากขึ้น ปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการผลิตไปจนถึงผู้บริโภคจึงเป็นปัญหาสำคัญที่ต้องได้รับการแก้ไข วัตถุประสงค์เสียเป็นสารที่นิยมนำมาใช้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร แต่สารเคมีบางชนิดเป็นพิษต่อร่างกาย หรือเกิดการตกค้าง ก่อให้เกิดโรคต่างๆ ตามมา ผู้บริโภคจึงไม่ให้การเชื่อถือต่อผลิตภัณฑ์ ดังนั้นสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial agents) ซึ่งผลิตจากสิ่งมีชีวิตที่ปลอดภัย ไม่เสี่ยงต่อสารเคมีจึงเป็นที่นิยมกันมากขึ้น โดยเฉพาะในกลุ่มของแลนทิไบโอติก (lantibiotics) ซึ่งเป็น แบคเทอริโอซิน (bacteriocins) ชนิดหนึ่ง เนื่องจากสามารถออกฤทธิ์ในแบคทีเรียแกรมบวกได้ในวงกว้าง สารที่นิยมใช้กันในอุตสาหกรรมและได้รับการยอมรับกว้างขวางจากผู้บริโภคคือ ไนซิน (Asaduzzaman และ Sonomoto, 2009)

ไนซินเป็นเพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 หมู่ ซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 3.5 กิโลดัลตันผลิตมาจากแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ไนซินมีประสิทธิภาพในการฆ่าแบคทีเรียแกรมบวกได้หลากหลายชนิด นอกจากนี้ไนซินสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้อีกด้วย โดยเฉพาะสปอร์จาก *Clostridium* sp. และ *Bacillus* sp. ที่มักปนเปื้อนในอาหารและก่อให้เกิดโรค (Asaduzzaman และ Sonomoto, 2009) ไนซินสามารถละลายน้ำได้ดีในภาวะที่เป็นกรด โดยมีค่าการละลายน้ำที่ 57 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความเสถียรมาก สามารถทนได้ในสารละลายที่เป็นกรดสูงและไม่ถูกทำลายจากแสง UV นอกจากนี้ไนซินยังมีความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงได้ อย่างไรก็ตามไนซินถูกทำลายได้โดยโปรตีโอไลติกเอนไซม์ ซึ่งสมบัติเหล่านี้เหมาะสมแก่การนำไปประยุกต์ใช้เป็นวัตถุกันเสียในอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไม่ว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์จากนม เนื้อสัตว์ อาหารกระป๋อง ไปจนถึงเบียร์และไวน์ เป็นต้น ไนซินสามารถช่วยแก้ปัญหาการปนเปื้อน และไม่ก่อให้เกิดปัญหาหรือข้อจำกัดที่จะนำไปสู่การเพิ่มต้นทุนในการผลิต ปัจจุบันไนซินเป็นแบคเทอริโอซินชนิดเดียวที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารกันอย่างแพร่หลาย โดยได้รับอนุญาตให้ใช้ได้ ในอาหารอย่างน้อย 46 ประเทศ เพื่อกำจัด *Clostridium* sp. ในอาหารจำพวก เนยแข็ง ผลิตภัณฑ์จากนม และอาหารกระป๋อง เริ่มมีการใช้ไนซินเพื่อเป็นวัตถุกันเสียในอาหารเป็นครั้งแรกประมาณปี ค.ศ. 1950 ต่อมาปี ค.ศ. 1969 ไนซินได้รับการอนุมัติให้ใช้ในอาหารโดยตรงจากองค์การอนามัยโลก (WHO) และยังได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) ในปี ค.ศ. 1988 อีกด้วย (Suganthi และคณะ, 2012)

กลไกการกำจัดแบคทีเรียแกรมบวกของไนซินเป็นการทำให้ผนังเซลล์ของเซลล์เป้าหมายเกิดรู โดยผ่านกระบวนการหลายขั้นตอน Wiedemann และคณะ (2001) ได้เสนอไว้ว่ากลไกนั้นเริ่มจากการที่ไนซินจับกับส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตของลิพิด II ในส่วนของปลายอะมิโน (N-terminal) ด้วยแรงไอออนิก หลังจากนั้นปลายคาร์บอกซี (C-terminal) ของไนซินจะแทรกเข้าไปในส่วนของลิพิดในเซลล์เมมเบรนเป็นผลทำให้สารประกอบภายในเซลล์ เช่น กรดอะมิโน โปแทสเซียม สารประกอบจำพวกฟอสเฟต และ ATP ไหลออกมาอย่างรวดเร็ว ทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Bauer และ Dicks, 2005) ในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *Clostridium* sp. ที่มีก่อให้เกิดโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร กระบองซึ่งกำจัดออกได้ยาก เป็นเชื้อที่เจริญได้ในสภาพไร้อากาศและทนต่อความร้อนได้ถึง 121 องศาเซลเซียส (Arauz และคณะ, 2009) เกิดขึ้นโดยไนซินจะเข้าจับกับหมู่ซัลไฟไฮดริล (sulfhydryl groups) ที่หน่วยโปรตีนทำให้เซลล์ไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ แต่อย่างไรก็ตามไนซินยังมีข้อจำกัดสำคัญคือ ไนซินสามารถยับยั้งการเจริญได้เพียงแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้นไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคแก่ผู้บริโภค เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกที่สามารถป้องกันการออกฤทธิ์ของไนซินที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน เป็นผลให้ไนซินไม่สามารถทำงานได้ (Bozaris และ Adams, 1999) จากข้อจำกัดดังกล่าวจึงมีการวิจัยและพัฒนาเพิ่มศักยภาพในการทำงานของไนซินโดยการใช้ไนซินร่วมกับวิธีทางกายภาพอื่นๆ เช่น ความร้อนและความดัน นอกจากนี้ยังมีการใช้สารเพิ่มเติมอื่นจำพวกสารลดแรงตึงผิว สารคีเลต และสารเสริมฤทธิ์ต่างๆ เพื่อให้สามารถออกฤทธิ์กำจัดได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เช่น กรดเอดิซีนไดเอมีน เททราอะซิติก (EDTA) (Kopermsub และคณะ, 2011) และเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (CPC) (Thongbai และคณะ, 2006)

เซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (CPC) เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวกจำพวกสารประกอบแอมโมเนียมจตุรภูมิ มีสมบัติยับยั้งแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* เป็นต้น (Pohlman และคณะ, 2002) โดยสารนี้สามารถดูดซับฟอสเฟตที่เยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียซึ่งมีประจุลบ ส่งผลให้ผนังเซลล์ถูกทำลาย และเซลล์ตายในที่สุด โดยองค์การอาหารและยาในสหรัฐอเมริกา (FDA) ได้ยอมรับในปี ค.ศ. 2004 ให้ CPC เป็นสารต้านการเจริญของแบคทีเรียที่ปลอดภัย อนุญาตให้ใช้บนพื้นผิวของเนื้อสัตว์ได้ในระดับไม่เกิน 0.3 กรัมต่อปอนด์ นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในการพ่นเป็นละอองลงบนฟิล์มหรือใช้ล้างหรือแช่เนื้อ (Dupard และคณะ, 2006)

กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) เป็นกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวอ่านส่องกราด (Scanning Probe Microscopy หรือ SPM) ชนิดหนึ่งที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้วัดค่าโดยตรงจากแรงระหว่างโมเลกุล

ใช้ในการถ่ายภาพวัตถุหรือตรวจสอบลักษณะพื้นผิวที่มีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร และแสดงภาพออกมาเป็น 3 มิติ (Jalili และ Laxminarayana, 2004, Hilal และคณะ, 2006) การทำงานของกล้องนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในวงกว้างแม้กระทั่งบนพื้นผิวที่เป็นฉนวนไฟฟ้า เช่น พอลิเมอร์ สารกึ่งตัวนำ วัสดุ สารทางชีวภาพ หรือสิ่งมีชีวิต เป็นต้น ข้อได้เปรียบของกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมเมื่อเปรียบเทียบกับกล้องจุลทรรศน์ทั่วไปคือ สามารถแสดงผลที่มีความน่าเชื่อถือในระดับนาโนเมตรโดยไม่ต้องเปลี่ยนปลายทิป หรือเปลี่ยนเครื่องมือใดๆ เมื่อต้องการภาพจากตำแหน่งที่ต่างกัน อีกทั้งเมื่อใช้ในการศึกษาเซลล์ ไม่จำเป็นต้องเตรียมตัวอย่างโดยการแทนที่สารในเซลล์ สามารถเห็นภาพของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ (Liu และ Wang, 2011) การวิจัยของ Lonergan และคณะ (2013) ได้ศึกษาการตรึง *E. coli* ด้วยเจลาตินเปรียบเทียบกับ Poly-L-lysine ในบัฟเฟอร์ที่มีแรงไอออนต่างกัน และทำการตรวจสอบภายใต้กล้อง AFM พบว่า *E. coli* บน Poly-L-lysine สามารถเห็นภาพการเปลี่ยนแปลงที่ผิวเซลล์ และเซลล์นั้นยังคงมีชีวิตได้อย่างชัดเจน และเทคนิคนี้มีประสิทธิภาพ ราคาไม่แพง ไม่เสียเวลาอีกด้วย

กล้องรามานสเปกโตรมิเตอร์ (Raman spectrometer) ใช้เทคนิคการจดจำแบบลายพิมพ์ (fingerprint) ในระดับโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพ โดยการเปรียบเทียบสเปกตรัมการกระเจิงแสงแบบรามาน (Raman Light Scattering) ของตัวอย่างที่ทดสอบกับสเปกตรัมของสารมาตรฐานที่ได้บันทึกไว้หรือที่มีอยู่แล้วในฐานข้อมูล ซึ่งจะทำให้สามารถระบุหาประเภทของสารตัวอย่างได้ทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ดังนั้นจึงใช้ตรวจสอบสารได้ทุกประเภทไม่ว่าจะเป็นของแข็ง ของเหลว และ แก๊ส โดยสามารถวัดตัวอย่างผ่านแก้วและพลาสติกใสได้จึงสามารถประยุกต์ใช้ได้ทั้งในทางชีววิทยา ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์แบคทีเรียได้ (Ashton และคณะ, 2011) มีการวิจัยของ Krafft และคณะ (2005) ศึกษาอนุออร์แกนอลและเวสิเคิลของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อปอด พบว่าสามารถระบุตำแหน่งส่วนที่เป็นกรดนิวคลีอิก โปรตีน ไขมัน และคอเลสเตอรอลได้

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาตำแหน่งการทำงานของสารออกฤทธิ์และการเปลี่ยนแปลงสัญญาณวิทยาของเซลล์ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบเมื่อถูกกระทำด้วย ไนซินและเมื่อเกิดการทำงานร่วมกันของไนซินและเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ซึ่งเป็นสารที่สามารถออกฤทธิ์ในแบคทีเรียแกรมลบด้วยเทคนิค Atomic force microscopy ซึ่งมีความละเอียดสูงอีกทั้งยังสามารถเห็นภาพของแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตได้ และเทคนิค Raman spectroscopy ที่สามารถศึกษาในระดับหมู่ฟังก์ชันสามารถเห็นตำแหน่งของสารออกฤทธิ์ได้

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

ปัจจุบันอัตราการเพิ่มขึ้นของประชากรโลกมีสูงขึ้น การผลิตอาหารให้ได้ปริมาณมากในระดับอุตสาหกรรมเพื่อเพียงพอต่อความต้องการของประชากรที่มีมากขึ้นจึงเป็นสิ่งสำคัญ ปัญหาการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการผลิตไปจนถึงการขนส่งสู่ผู้บริโภคเป็นปัญหาที่ต้องได้รับการแก้ไขโดยวิธีการถนอมอาหารซึ่งมีหลากหลายกรรมวิธีเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหารไว้ให้นานขึ้น เช่น การใช้ความร้อน การใช้ความเย็น การทำให้แห้ง เป็นต้น การใช้วัตถุกันเสียเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการยับยั้งจุลินทรีย์ แต่สารเคมีที่ใช้นั้นบางชนิดเป็นพิษต่อร่างกาย เกิดสารตกค้าง และก่อให้เกิดโรคต่างๆ ตามมา ผู้บริโภคจึงไม่ให้ความเชื่อถือต่อผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ดังนั้นสารที่ได้จากธรรมชาติที่ได้มีการศึกษาวิจัยและได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยจึงเป็นที่นิยมกันมากขึ้น โดยเฉพาะในกลุ่มของแลนติไบโอติก (lantibiotics) ซึ่งเป็นแบคทีริโอซิน (bacteriocins) ชนิดหนึ่ง เนื่องจากไม่มีความจำเพาะมากเกินไป สามารถออกฤทธิ์ได้กว้างพอสมควร โดยชนิดที่นิยมในอุตสาหกรรมและได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายจากผู้บริโภคคือ ไนซิน (Asaduzzaman และ Sonomoto, 2009)

2.1 ไนซิน

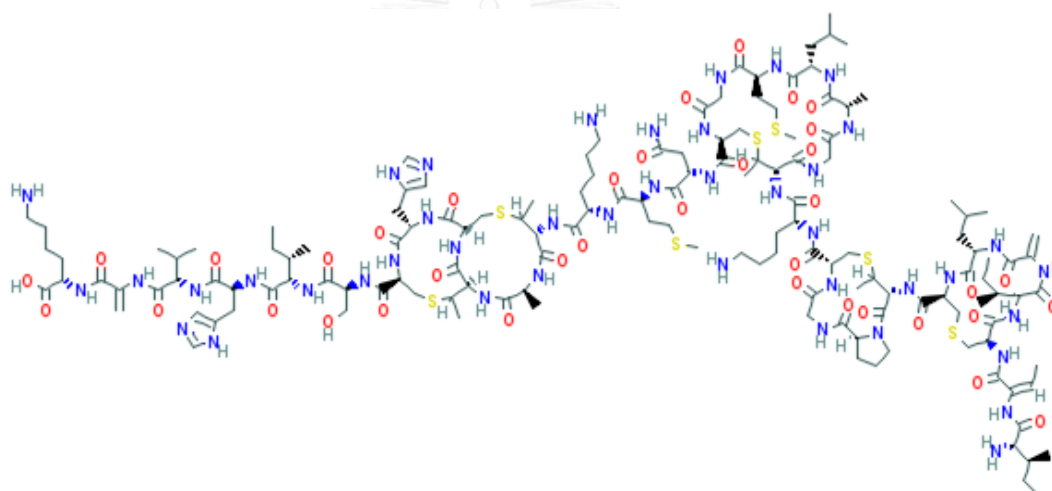
ไนซินเป็นเพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 หมู่ ซึ่งมีมวลโมเลกุล ประมาณ 3.4 กิโลดัลตัน (Willey และ Van Der Donk, 2007) (รูปที่ 2.1) ผลิตมาจากแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ไนซินมีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้หลากหลายชนิด และถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีริโอซินชนิดแลนติไบโอติกที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากไนซินเป็นแลนติไบโอติกชนิดแรกที่ถูกค้นพบจึงเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย อีกทั้งยังได้รับการยอมรับว่าสามารถใช้เป็นวัตถุกันเสียในอุตสาหกรรมอาหารมาอย่างยาวนาน (Arauz และคณะ, 2009)

แบคทีเรียที่ผลิตไนซินคือ *L. lactis* subsp. *lactis* ซึ่งเป็นแลคติกแอซิดแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1873 โดย Joseph Lister ใช้เป็นส่วนผสมในการหมักนมเพื่อผลิตเป็นอาหารหมักชนิดต่างๆ เช่น เนยและชีส แบคทีเรียชนิดนี้มีกระบวนการหมักแบบ Homofermentive ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลคติกจากการหมักน้ำตาลแลคโทส สามารถผลิตไนซินได้ในปริมาณมากเหมาะแก่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ *L. lactis* subsp. *lactis* เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ตามธรรมชาติ มีความปลอดภัย ไม่ก่อโรค ได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่

ปลอดภัย (Generally recognized as safe bacteria; GRAS status) ดังนั้นไนซินซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียชนิดนี้จึงปลอดภัยเช่นกัน (Arauz และคณะ, 2009)

2.1.1 โครงสร้างไนซิน

ไนซินประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 34 หมู่ มีพันธะไธโออีเทอร์ (thio-ether bonds) 5 ตำแหน่ง ซึ่งมีไอโซลูซีนที่ปลายอะมิโน (N-terminal) และไลซีนที่ปลายคาร์บอกซี (C-terminal) (Hoover, 1993) จากลำดับกรดอะมิโนนั้นทำให้ไนซินมีสมบัติเป็นทั้งโมเลกุลที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ (amphiphilic) ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เป็นกลุ่มของกรดอะมิโนที่ปลายอะมิโน และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) เป็นกลุ่มของกรดอะมิโน 4 หมู่ที่ปลายคาร์บอกซี (Liu และ Hansen, 1993) ไนซินมีมวลโมเลกุลประมาณ 3.4 กิโลดัลตัน สามารถพบได้ทั้งในรูปโมโนเมอร์ ไดเมอร์ และเทตราเมอร์ (Jung, 1991)

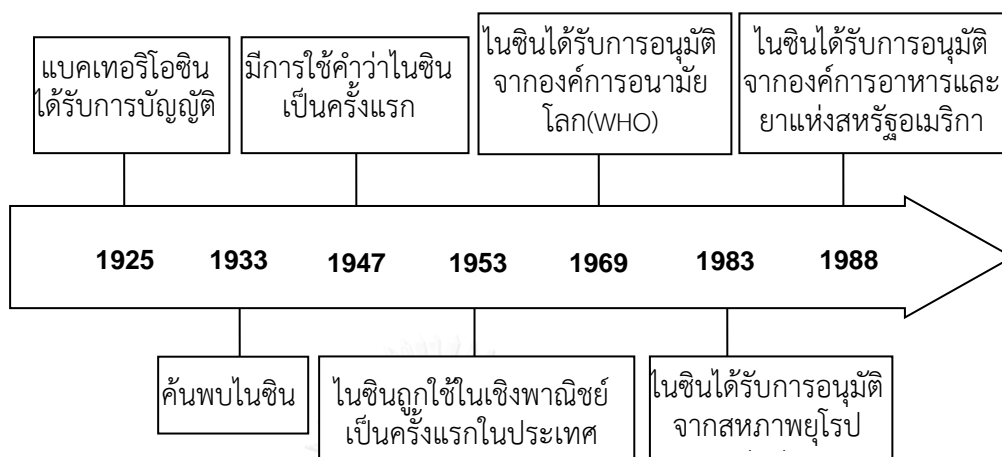


รูปที่ 2.1 โครงสร้างของไนซิน (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16219761>)

2.1.2 ประวัติการค้นพบไนซิน

ในอดีตความสนใจเกี่ยวกับไนซินเริ่มจากการค้นพบแบคทีเรียโอซินในอังกฤษในปี ค.ศ.1925 ต่อมาในปี ค.ศ.1933 มีการค้นพบว่าหัวเชื้อที่เติมลงไปในนมเพื่อผลิตเนยแข็งนั้นเกิดกรดล่ำซ่า เนื่องจากมีการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างกรด จึงได้แยกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งนั้นออกมา พบว่าสารนั้นเป็นโปรตีนซึ่งเป็นแบคทีเรียโอซินชนิดหนึ่ง ในเวลาต่อมามีการศึกษาด้านเซรุ่มวิทยา ในปี ค.ศ.1947 ได้จัดจำแนกกลุ่มโปรตีนและตั้งชื่อโปรตีนนี้ว่า “ไนซิน” ในปัจจุบันไนซินเป็นแบคทีเรียโอซินชนิดเดียวที่ใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร โดยได้รับอนุญาตให้ใช้ได้ ในอาหารอย่างน้อย 46 ประเทศ เพื่อกำจัด *Clostridium* sp. ในอาหารจำพวก เนยแข็ง ผลิตภัณฑ์จากนม และอาหารกระป๋อง โดยเริ่มมีการใช้ไนซินเพื่อเป็นวัตถุกันเสียในอาหารเป็นครั้งแรกประมาณปี

ค.ศ. 1953 ต่อมาในปี ค.ศ. 1969 ได้รับการอนุมัติจากองค์การอนามัยโลก (WHO) และในปี ค.ศ. 1988 ยังได้รับการยอมรับให้ใช้ในจีนในอุตสาหกรรมอาหารจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) อีกด้วย (Cotter และคณะ, 2005) ดังรูปที่ 2.2



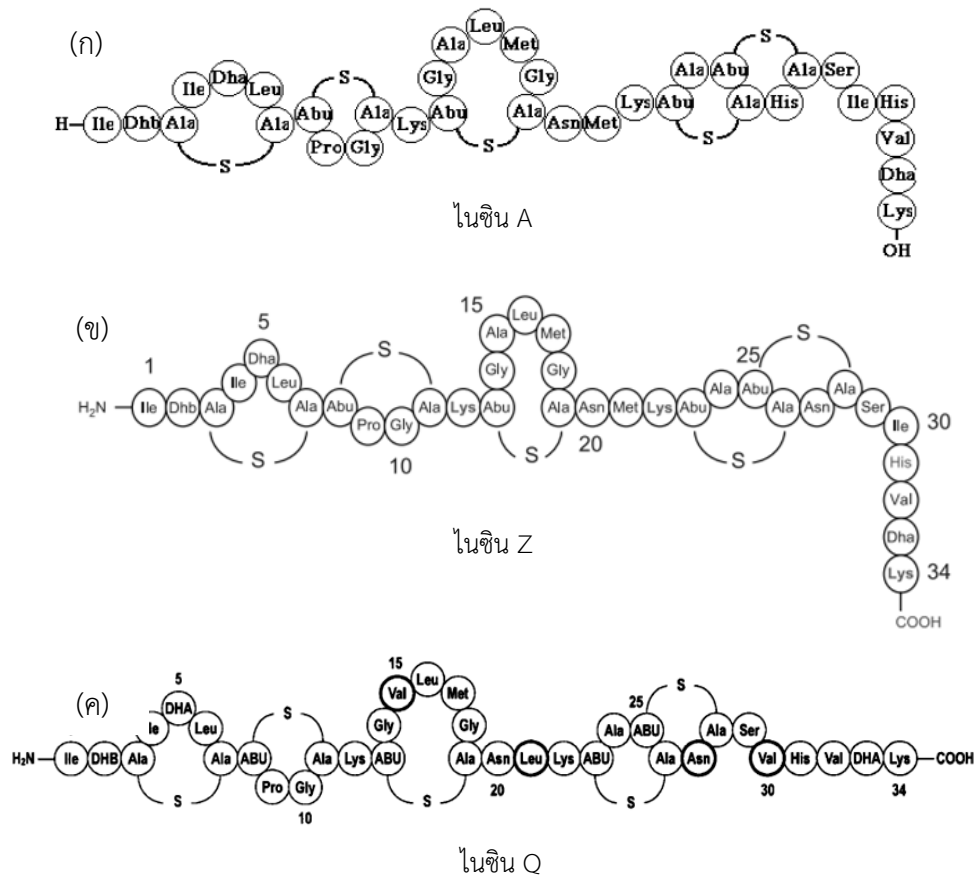
รูปที่ 2.2 ประวัติการค้นพบไนซิน (Cotter และคณะ, 2005)

2.1.3 สมบัติของไนซิน

ไนซินสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ในวงกว้าง รวมไปถึงสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้อีกด้วย โดยเฉพาะสปอร์จาก *Clostridium* sp. และ *Bacillus* sp. ที่มักปนเปื้อนในอาหารและก่อให้เกิดโรค สามารถละลายน้ำได้ดีในภาวะกรด โดยมีค่าการละลายน้ำที่ 57 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความเสถียรมาก สามารถทนได้ในสารละลายที่เป็นกรดสูงในค่าความเป็นกรดเบสต่ำสุดที่ 2 มีความเสถียรมากที่สุดเมื่อค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 3 อีกทั้งยังคงสภาพถึงแม้สภาพแวดล้อมมีค่าความเป็นกรดเบสจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ไนซินยังสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ (37-75 องศาเซลเซียส) (Liu และ Hansen, 1993) อีกทั้งสามารถคงประสิทธิภาพในการทำงานถึงแม้จะผ่านการออโตคลฟ (121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที) และสูญเสียประสิทธิภาพการทำงานเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรเซชัน ไนซินถูกทำลายได้โดยโปรติโอไลติกเอนไซม์ แต่ไม่ถูกทำลายจากแสง UV ซึ่งสมบัติเหล่านี้ทำให้ไนซินเหมาะสมแก่การนำไปประยุกต์ใช้เป็นวัตถุกันเสียในอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไม่ว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์จากนม เนื้อสัตว์ อาหารกระป๋อง ไปจนถึงเบียร์และไวน์ เป็นต้น ซึ่งไนซินสามารถช่วยแก้ปัญหาการปนเปื้อน และไม่ก่อให้เกิดปัญหาหรือข้อจำกัดที่จะนำไปสู่การเพิ่มต้นทุนในการผลิต (Arauz และคณะ, 2009) อย่างไรก็ตามการสูญเสียประสิทธิภาพการทำงานของไนซินสามารถเกิดขึ้นได้ด้วยปัจจัยหลายชนิด เช่นค่าความเป็นกรดเบสสูง อุณหภูมิในการเก็บสูง และระยะเวลาในการเก็บยาวนาน เป็นต้น

2.1.4 ประเภทของโนซิน

โนซินสามารถแบ่งออกเป็นชนิดต่างๆโดยอาศัยโครงสร้างของโนซิน กลุ่มที่มีความสำคัญได้แก่ โนซิน A, โนซิน Z และโนซิน Q โดยโนซิน A มีกรดอะมิโน 34 โมเลกุลที่ประกอบไปด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 5 ตำแหน่ง ดังแสดงในรูปที่ 2.3ก ส่วนโนซิน Z แตกต่างจากโนซิน A ที่ตำแหน่งที่ 27 โดยมีการแทนที่ฮิสติดีนด้วยแอสพาราจินดังรูปที่ 2.3ข และโนซิน Q มีกรดอะมิโน 4 หมู่ที่แตกต่างจากโนซิน A ดังแสดงในรูปที่ 2.3ค โดยโนซินแต่ละชนิดถูกผลิตจากแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ดังที่แสดงในตารางที่ 2.1 โนซิน A และโนซิน Z มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียในวงกว้างและใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร (De Vuyst และ Vandamme, 1994)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างปฐมภูมิของโนซิน A (Tai และคณะ, 2008) (ก) โนซิน Z (Seelig, 2004) (ข) และ โนซิน Q (Zendo และคณะ, 2003) (ค)

ตารางที่ 2.1 ไนซินชนิดต่างๆแบ่งตามโครงสร้างที่แตกต่างกัน (Suganthi และคณะ, 2012)

ประเภท	มวลโมเลกุล (ดัลตัน)	สายพันธุ์ที่ผลิต
ไนซิน A	3353	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
ไนซิน Z	3330	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
ไนซิน Q	3327	<i>L. lactis</i> 61-14

2.1.5 กลไกการทำงานของไนซิน

1) กลไกการยับยั้งการสร้างสปอร์

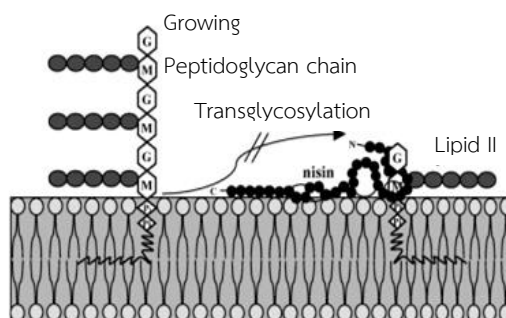
ไนซินมีความสามารถในการยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ โดยไนซินเข้าจับกับหมู่ซัลฟ์ไฮดริลที่หน่วยโปรตีนที่อยู่ในส่วนประกอบของเยื่อหุ้มสปอร์ซึ่งอยู่ในระยะการงอกของสปอร์ทำให้ไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ (De Vuyst และ Vandamme, 1994) แบคทีเรียที่มักก่อให้เกิดโรคที่ปนเปื้อนในอาหารกระป๋องที่กำจัดออกได้ยากคือ *Clostridium* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาพไร้อากาศและทนความร้อนได้ถึง 121 องศาเซลเซียส Arauz และคณะ (2009) ได้ศึกษาพบว่า *Clostridium* PA3679 มีความไวต่อไนซินมากขึ้นเมื่อผ่านอุณหภูมิที่สูงขึ้น ดังนั้นไนซินจึงเป็นวัตถุกันเสียที่เหมาะสมเนื่องจากไนซินสามารถทนต่ออุณหภูมิที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ 121 องศาเซลเซียส และยังคงมีประสิทธิผลการทำงาน ซึ่งเป็นสมบัติสำคัญที่ไนซินนิยมนำมาใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหารที่ผ่านกระบวนการความร้อน

2) กลไกการยับยั้งการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย

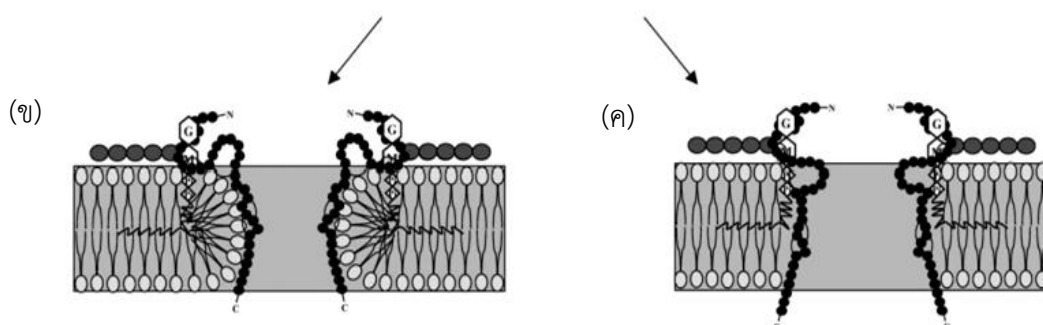
ในกระบวนการฆ่าแบคทีเรียแกรมบวกนั้น คือการทำให้ผนังเซลล์ของเซลล์เป้าหมายเกิดเป็นรูโดยผ่านกระบวนการหลายขั้นตอนซึ่ง Wiedemann และคณะ (2001) ได้เสนอว่ากลไกเริ่มจากการที่ไนซินจับกับส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตของลิวปีด II ในส่วนของปลายอะมิโน หลังจากนั้นปลายคาร์บอกซี ของไนซินจะแทรกเข้าไปในส่วนของลิวปีดในเซลล์เมมเบรนดังรูปที่ 2.4ก เป็นผลทำให้สารประกอบภายในเซลล์เช่น กรดอะมิโน โปแทสเซียม สารประกอบจำพวกฟอสเฟต และ ATP ไหลออกมาอย่างรวดเร็ว ทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Bauer และ Dicks, 2005, Asaduzzaman และ Sonomoto, 2009)

การเกิดรูเมมเบรนนั้นมีการอธิบาย 2 รูปแบบที่ต่างกัน Wedge ได้เสนอว่ารูเกิดขึ้นจากการที่ ไนซินจับผิวของลิพิด II จากนั้นเกิดการเคลื่อนตัวแยกเมมเบรนออกจากกันกลายเป็นรู ดังรูปที่ 2.4ข และ Barrel-Stave เสนอแนวคิดที่ว่าไนซินแทรกตัวลึกลงไปไบเลเยอร์ของเมมเบรน โดยจับกับสาย เอซิล (acyl chain) ทำให้เกิดรูดังรูปที่ 2.4ค (Hoffmann และคณะ, 2001)

(ก) รูปแบบการจับกันของไนซินและลิพิด II บนเซลล์เมมเบรนแบคทีเรีย



รูปแบบการจับกันของไนซินและลิพิด II บนเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย



รูปที่ 2.4 กลไกการทำงานของไนซิน (Hoffmann และคณะ, 2001)

2.1.6 การประยุกต์ใช้นิซินในอุตสาหกรรม

มีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของไนซินในการยับยั้งแบคทีเรียหลากหลายชนิดมาอย่างต่อเนื่องดังที่แสดงในตารางที่ 2.2 จึงมีการนำไนซินไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารหลากหลายชนิดเช่น (Suganthi และคณะ, 2012)

1) ผลิตภัณฑ์จากนม

ปัจจุบันมีการใช้นิซินในผลิตภัณฑ์จากนมอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะในเนยแข็ง ซึ่งไนซินสามารถคงประสิทธิภาพเมื่ออยู่ในนมที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน และสามารถการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในขณะที่ *Lactococcus* ยังคงเจริญเติบโตได้ (Maisnear-Patin และคณะ, 1992)

2) เนื้อวัว

การใช้ไนซินร่วมกับการลดปริมาณไนโตรตีในเนื้อวัวช่วยยืดระยะเวลาการเก็บรักษาได้ นอกจากนี้ยังมีการใช้ไนซินร่วมกับ Butylatedhydroxyanisole (BHA) ในไส้กรอกเนื้อเพื่อยับยั้ง *Listeria* อีกด้วย (Sureshkumar และคณะ, 2010)

3) ปลา

มีการใช้ไนซินในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *C. botulinum* ในเนื้อปลาค็อด ปลาแฮร์ริ่ง และปลาทูน่าแลร์มควัน ที่แช่เย็นในอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสและยังมีการศึกษาพบว่าไนซินธรรมชาติและไนซินบริสุทธิ์มีประสิทธิภาพเป็นวัตถุกันเสียได้เหมือนกันในการใช้ยืดอายุการเก็บรักษาปลาได้นานถึง 31 วัน (Taylor และ Somers, 1987)

4) การหมักเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์

ไนซินถูกใช้ในกระบวนการกลั่นแอลกอฮอล์ทั้งที่ใช้ในเครื่องดื่มและในอุตสาหกรรมโดยผสมลงในถังหมักเพื่อกำจัดแบคทีเรียปนเปื้อนอื่น ส่งผลให้ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดี มีผลผลิตแอลกอฮอล์มากขึ้น อีกทั้งยังช่วยลดการใช้กระบวนการฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อน ทำให้ผลิตภัณฑ์เก็บรักษาได้นาน (Chihib และคณะ, 1999)

การยอมรับให้นำไนซินมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มอย่างแพร่หลายนี้เนื่องจากไนซินมีข้อดีที่เหมาะสม 3 ประการคือ

1) ไนซินเป็นแบคทีเรียโอซินซึ่งจัดเป็นสารที่ผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียที่สมบัติคล้ายสารปฏิชีวนะ แต่ไม่ได้ถูกจัดเป็นสารปฏิชีวนะที่ใช้เพื่อการรักษาโรคทางการแพทย์ซึ่งห้ามใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มเนื่องจากไนซินมีข้อแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ ในเรื่องของสมบัติการยับยั้งแบคทีเรีย กล่าวคือไนซินจะมีขอบเขตการยับยั้งเพียงกลุ่มสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงเท่านั้น (Cleveland และคณะ, 2001)

2) ไนซินมีความปลอดภัยต่อการบริโภค เนื่องจากไนซินเป็นเพปไทด์ที่ซึ่งถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วโดยโปรตีเอสในทางเดินอาหารของมนุษย์ (Jung, 1991)

3) แบคทีเรียแลคติกที่ผลิตไนซินที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนั้นมีความปลอดภัยเนื่องจากแบคทีเรียแลคติกและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแบคทีเรียแลคติก มีการบริโภคกันมาอย่างยาวนาน และไม่ก่อให้เกิดอันตราย หรือเป็นพิษแก่มนุษย์ นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกยังจัดอยู่ในบัญชีรายชื่อสารซึ่งเป็นที่ยอมรับว่าปลอดภัย (Generally recognized as safe; GRAS)

ตารางที่ 2.2 การประยุกต์ใช้ไนซินเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Suganthi และคณะ, 2012)

ผลการศึกษา	อ้างอิง
การใช้ไนซินในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของ <i>Clostridium</i> และ <i>Bacillus</i>	(Roberts และ Hoover, 1996)
การใช้ไนซินในการยับยั้งการเจริญของ <i>E. coli</i> และ <i>L. innocua</i>	(Ponce และคณะ, 1998)
การใช้ไนซินเพื่อยับยั้งสปอร์และแบคทีเรียที่ใช้อากาศชนิด Mesophilic ในเนยแข็ง	(Capellas และคณะ, 2000)
การใช้ไนซินเพื่อเพิ่มความไวในการยับยั้ง <i>E.coli</i> ที่ทนต่อความดัน	(Garcia-Graells และคณะ, 2000)
การใช้ไนซินเพื่อเพิ่มปริมาณการยับยั้งจุลินทรีย์และฆ่าเชื้อได้ในวงกว้าง (<i>E.coli</i> และ <i>S.aureus</i>)	(Masschalck และคณะ, 2001)
การใช้ไนซินเพื่อยับยั้งสปอร์และการอยู่รอดของ <i>B. cereus</i> ในเนยแข็ง	(Lopez-Pedemonte และคณะ, 2003)
การใช้ไนซินเพื่อเพิ่มการยับยั้งการเจริญของเชื้อในนม	(Black และคณะ, 2005)
การใช้ไนซินเพื่อยับยั้งการเจริญของ <i>L. monocytogenes</i> scott A ในเนยแข็งร่วมกับการเติมเชื้อสายพันธุ์ที่ผลิตไนซินในไข่ไก่	(Arques และคณะ, 2005)

2.1.7 ปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของไนซิน

แม้ว่าไนซินเป็นที่ยอมรับและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรม ยังคงมีปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของไนซินในการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในอุตสาหกรรมหลากหลายปัจจัย เช่น (Millette และคณะ, 2004)

- 1) โครงสร้างของอาหาร ส่งผลต่อปริมาณพื้นที่ผิวสัมผัสของไนซินต่อจุลินทรีย์
- 2) ส่วนประกอบในอาหาร เช่น สารอาหาร ส่วนผสม เกลือ เอนไซม์ และสารเติมแต่ง เป็นต้น ซึ่งส่วนประกอบนี้อาจเข้าจับกับไนซิน เกิดการตกตะกอนหรือทำลายโครงสร้างของไนซิน ส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของไนซิน
- 3) สภาพการเป็นบัฟเฟอร์ในอาหารโดยไนซินเป็นโปรตีนซึ่งสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในภาวะความเป็นกรดเบสต่ำและลดประสิทธิภาพลงเมื่อความเป็นกรดเบสสูงขึ้นอาหารจึงควรมีเป็นบัฟเฟอร์ที่มีค่ากรดเบสต่ำ
- 4) สมบัติทางกายภาพของอาหาร เช่น ค่าความเป็นกรดเบส อุณหภูมิ แอกทิวิตีของน้ำ (a_w) ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณออกซิเจน และศักย์รีดอกซ์ (redox potential) เป็นต้น ซึ่งส่งผลต่อความเสถียรของไนซินและประสิทธิภาพการทำงานของไนซินด้วย
- 5) ปริมาณความเข้มข้นของจุลินทรีย์ถ้ามีปริมาณความเข้มข้นมากเกินไป ไนซินไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งหมด ส่งผลให้จุลินทรีย์ที่เหลือนั้นเจริญกลับมาจนมีปริมาณมากพอจะก่อให้เกิดโรค

ปัจจัยเหล่านี้ส่งผลให้เกิดการดูดซับหรือบดบัง ทำให้ไนซินไม่สามารถซึมผ่านอาหารเพื่อไปสัมผัสกับจุลินทรีย์ที่ต้องการกำจัด หรือทำให้ไนซินอยู่ในสภาพที่ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ ปัจจุบันมีการศึกษาวิธีการแก้ปัญหาด้วยวิธีการควบคุมการปลดปล่อยไนซินและปกป้องไนซินจากการรบกวนจากสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีการตรึงไนซินด้วยวิธีต่างๆ เช่น Immobilization, Entrapment หรือ Encapsulation (Suganthi และคณะ, 2012)

นอกจากนี้ ไนซินยังมีข้อจำกัดในการทำงานเมื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากไนซินเป็นแคเทอรีโอซินที่ออกฤทธิ์อย่างมีประสิทธิภาพสูงในแบคทีเรียแกรมบวก แต่ในแบคทีเรียแกรมลบบมีผนังเซลล์ชั้นนอกประกอบไปด้วยไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) ซึ่งขัดขวางไม่ให้นิซินสามารถสัมผัสกับเมมเบรนที่อยู่ภายในได้ ดังนั้นไนซินจึงไม่สามารถออกฤทธิ์กำจัดแบคทีเรียแกรมลบได้ (Hoffmann และคณะ, 2001)

2.1.8 การเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้ไนซิน

เนื่องจากข้อจำกัดในการทำงานเมื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งเกิดจากการการสกัดกั้นการทำงานไว้ด้วยผนังเซลล์ชั้นนอก ภายหลังจึงมีการวิจัยและพัฒนาเพิ่มศักยภาพในการทำงานของไนซินโดยการใช้ไนซินร่วมกับวิธีทางกายภาพอื่นๆ เช่น ความร้อนและความดัน

นอกจากนี้ยังมีการใช้สารเพิ่มเติมอื่นจำพวกสารลดแรงตึงผิวสารคีเลต และสารเสริมต่างๆเพื่อให้สามารถออกฤทธิ์กำจัดได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ สารที่นิยมใช้ เช่น

- 1) กรดเอทิลีนไดเอมีนเตตราอะซีติก (ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) สามารถจับแมกเนเซียมและแคลเซียมไอออน ส่งผลให้ LPS เกิดความไม่เสถียร ดังนั้นไนซินจึงสามารถเข้าสู่ชั้นเมมเบรนได้ (Millette และคณะ, 2004)
- 2) แลคโทเฟอร์ริน เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ สามารถจับกับประจุบวก ช่วยลดประจุของภาวะแวดล้อมของแบคทีเรีย ทำให้ LPS เสียสภาพจึงเป็นการเปิดโอกาสให้ไนซินผ่านเข้าไปยังบริเวณที่สามารถทำงานได้ในเซลล์ เป็นผลให้ไนซินออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ (Gálvez และคณะ, 2007)
- 3) กรดแลคติก เกิดจากการสังเคราะห์โดยแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดแลคติกสามารถยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมที่จำเป็นต่อการดำรงชีพ กรดแลคติกที่อยู่ในรูปไม่แตกตัวจะซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย จากนั้นจะแตกตัวเป็นไอออนภายในเซลล์ทำให้ปริมาณประจุภายในเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้ LPS เยื่อหุ้มเซลล์ และ เพปทิโดไกลแคน เสียเสถียรภาพ เป็นผลให้ไนซินออกฤทธิ์ที่บริเวณเป้าหมายยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ (Gálvez และคณะ, 2007)
- 4) เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ (cetylpyridinium chloride; CPC) ซึ่งเป็นสารที่มีประจุบวกทำให้สามารถจับกับฟอสเฟตซึ่งมีประจุลบทำให้ LPS เสียสภาพ ส่งผลให้ไนซินสามารถผ่านเข้าสู่บริเวณที่สามารถทำงานได้ ส่งผลให้ไนซินออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ (Gálvez และคณะ, 2007)

Fang และ Tsai (2003) ทำการศึกษาสารต่างๆที่เพิ่มประสิทธิภาพของไนซินในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ผลการทดลองพบว่า การใช้ไนซินร่วมกับสารอื่นเช่น EDTA กรดอะซีติก และโปแทสเซียมซอร์เบต ที่ถูกตรึงอยู่บนแคลเซียมแอลจีเนต สามารถลดการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ได้อย่างมีนัยสำคัญ

Thongbai และคณะ (2005) ใช้เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์และไนซินร่วมกับการใช้ค่าความเป็นกรดเบสและอุณหภูมิที่แตกต่างกันในการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* Typhimurium โดยเปรียบเทียบรูปร่างลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) โดยพบว่าเซลล์มีรูปร่างลักษณะผิดปกติ ผนังเซลล์ชั้นนอกขาดหาย ส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด

Garde และคณะ (2014) ศึกษาการทำงานของรูเทอรินและไนซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกทีในการยับยั้งการเจริญของ *Clostridium perfringens* ทั้งเซลล์และสปอร์ ซึ่งผลการทดลองพบว่ารูเทอรินและไนซินมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเซลล์และสปอร์เท่ากับ 2.03–16.25 มิลลิโมลาร์ และ 0.78–12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งทั้งเซลล์และสปอร์ของ *C. perfringens*

Shin และคณะ (2015) ศึกษาประสิทธิภาพในการทำงานของไนซินต่อการยับยั้งแบคทีเรียหลายชนิดที่ผลิตไบโอฟิล์มในช่องปาก พบว่าที่ความเข้มข้น 2.5-50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไนซินสามารถรบกวนการผลิตไบโอฟิล์มได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้มีปริมาณและความหนาของไบโอฟิล์มลดลง อีกทั้งยังไม่ส่งผลต่อเซลล์มนุษย์ถึงแม้จะได้รับไนซินที่มีความเข้มข้นสูง (>200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

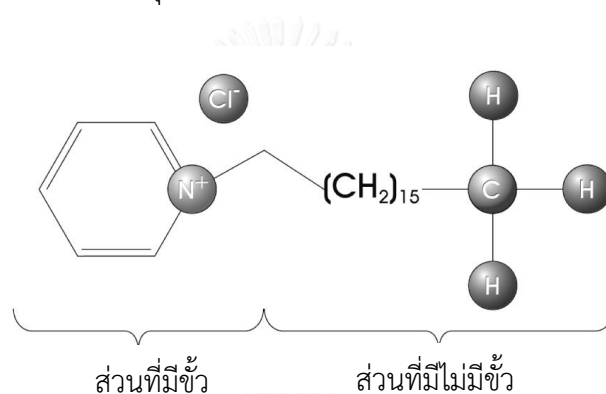
Meira และคณะ (2016) พัฒนาฟิล์มนาโนคอมโพสิตเพื่อใช้ในการยืดอายุการรักษารักษาอาหาร โดยศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของไนซินที่บนเคลือบฟิล์มนาโนคอมโพสิตเพื่อยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* บนพื้นผิวเนยแข็ง ผลการทดลองพบว่าหลังจาก 4 วัน ไนซินสามารถลดการเจริญของ *L. monocytogenes* ที่ปริมาณไนซิน 2 กรัม และสามารถยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ที่ปริมาณไนซิน 6 กรัมแสดงให้เห็นว่าไนซินสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการยืดอายุการเก็บรักษาอาหารในการใช้ร่วมกับฟิล์มนาโนคอมโพสิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.2 เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์

เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ (cetylpyridinium chloride; CPC) เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ มีการนำมาใช้งานกันอย่างแพร่หลายในเครื่องอุปโภคทั่วไปเช่น น้ำยาทำความสะอาดและน้ำยาฆ่าเชื้อโรค โดยเฉพาะในด้านการรักษาความสะอาดในช่องปาก เช่น ยาสีฟัน, ยาบ้วนปาก, ยาอมแก้เจ็บคอและสเปรย์ฉีดในลำคอ เนื่องจากเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ตัวอย่างเช่น *E. coli*, *Salmonella* sp., *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* เป็นต้น (Pohlman และคณะ, 2002) อีกทั้งยังสามารถกำจัด plaque ที่สะสมตามร่องฟันและพื้นผิวฟัน รวมไปถึงยับยั้งการเจริญของไวรัสและยีสต์ได้อีกด้วย ซึ่งได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) ว่ามีประสิทธิภาพในการช่วยรักษาสุขอนามัยในช่องปากอย่างกว้างขวาง (Jimenez-Villarreal และคณะ, 2003, Bosilevac และคณะ, 2004)

2.2.1 โครงสร้างของเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์

เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์เป็นสารประกอบเกลือแอมโมเนียมจตุรภูมิ (quaternary ammonium compound; QAC) ซึ่งสามารถจัดได้อยู่ในกลุ่มของเกลือแอมโมเนียมเฮเทอโรแอโรมาติก (heteroaromatic ammonium salt) มีชื่อทางเคมีว่า 1-เฮกซะเดซิลไพริดีเนียมคลอไรด์ มีสูตรทางเคมีคือ $C_{21}H_{38}NCl$ มีน้ำหนักโมเลกุล 339.98 เนื่องจากมีหมู่แอลคิลหนึ่งสาย ส่วนที่เหลือเป็นแอโรมาติก จึงกล่าวได้ว่ามีไนโตรเจนจตุรภูมิ (quaternary nitrogen) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของแอโรมาติกเหมือนไพริดีน (pyridine) ดังรูปที่ 2.5 โครงสร้างของเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ส่งผลให้มีความสามารถละลายในน้ำได้ดี แต่ไม่ละลายในอะซิโตน กรดอะซิติก หรือเอทานอล ปราศจากสี มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวก (cation surfactant) (Al-Musallam และคณะ, 2006)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์

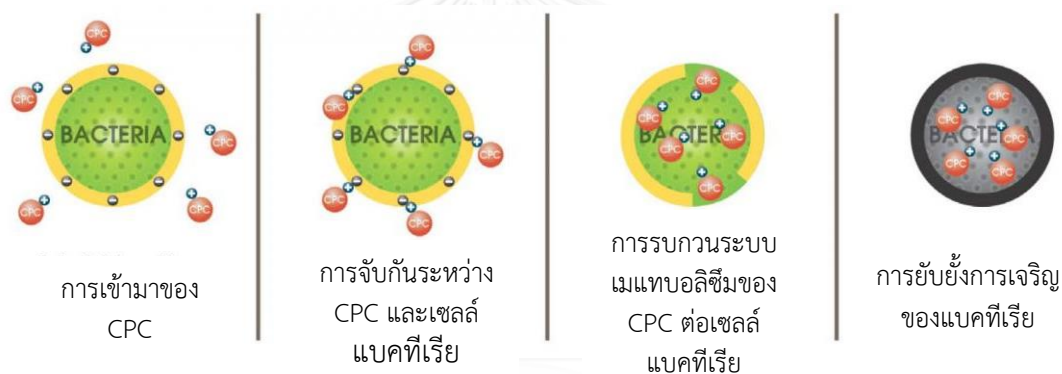
(ดัดแปลงจาก <http://www.perioexpertise.com/en/cetylpyridinium-chloride-cpc>)

2.2.2 สมบัติของเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์

เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ในวงกว้าง ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของไวรัสและยีสต์ได้อีกด้วย นอกจากนี้เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์จะเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพแล้ว ข้อดีของสารนี้คือมีความคงตัวสูงในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง และสามารถทนต่อน้ำกระด้างได้ ซึ่งส่งผลให้เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ยังคงมีประสิทธิภาพดีในการป้องกันการยึดเกาะของแบคทีเรีย (Breen และคณะ, 1997) นอกจากนี้การนำเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์มาใช้ในอุตสาหกรรม เช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ปีกแปรรูป และเนื้อวัว เป็นต้น ไม่ส่งผลกระทบต่อลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์มีความสามารถในการป้องกันและลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี ได้รับการรับรองว่าปลอดภัยจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) สามารถใช้ได้กับพื้นผิวของอาหารอีกด้วย (Breen และคณะ, 1997)

2.2.3 กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์

กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ เกิดจากสมบัติการเป็นสารลดแรงตึงผิว จากบริเวณมีหัวและไม่มีหัวของโมเลกุล ซึ่งมีประจุสุทธิเป็นประจุบวก ส่งผลให้เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์สามารถเข้าจับกับประจุลบบริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ (Petrocci, 1977) หลังจากนั้น เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์จะซึมผ่านเข้าผนังเซลล์เข้าไป ส่งผลให้เกิดความไม่สมดุลในการควบคุมแรงดันออสโมติกระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ และเข้าไปรบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ทำลายผนังเซลล์และเซลล์เมมเบรน เซลล์จึงหยุดการแบ่งเซลล์ และส่งผลกระทบต่อทำให้เซลล์ตายในที่สุด ดังรูปที่ 2.6 โดยฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารประกอบเกลือแอมโมเนียมจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความยาวของสายคาร์บอน ซึ่งสารประกอบเกลือแอมโมเนียมที่มีหมู่แอลคิลในช่วง C_{12} - C_{16} จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสูง โดย C_{14} จะมีประสิทธิภาพยับยั้งสูงสุด (Cords, 1983)



รูปที่ 2.6 กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์

(ดัดแปลงจาก <http://www.perioexpertise.com/en/cetylpyridinium-chloride-cpc>)

จากกลไกการออกฤทธิ์ แสดงให้เห็นว่าเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์มีประสิทธิภาพในยับยั้งแบคทีเรียได้อย่างกว้างขวาง โดยมีการรายงานไว้ว่าประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ในการฉีดเข้าเส้นเลือด LD_{50} ของเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ในหนูอยู่ที่ 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในกระต่ายคือ 36 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตรงกันข้ามกับการใช้ในช่องปากนั้นมีค่าที่สูงขึ้นโดย LD_{50} ในหนูแรดเท่ากับ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในกระต่ายคือ 400 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และในหนูเม้าส์เท่ากับ 108 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (Lewis, 1996)

2.2.5 การประยุกต์ใช้เซทิลไพรดิเนียมคลอไรด์

เซทิลไพรดิเนียมคลอไรด์ถูกนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสุขอนามัยช่องปากซึ่งมีรายงานการใช้เซทิลไพรดิเนียมคลอไรด์อย่างปลอดภัยมานานกว่า 30 ปี (Breen และคณะ, 1995) ในด้านการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนั้นนิยมนำมาใช้ยืตอายุการเก็บรักษาของอาหารโดยวิธีการแช่หรือฉีดพ่นเพื่อป้องกันการยืตเกาะของแบคทีเรียได้ (Wang และคณะ, 1997) นอกจากนี้เซทิลไพรดิเนียมคลอไรด์ได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์และนิยมใช้เป็นสารเพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ผักสดแปรรูป และเนื้อสัตว์แปรรูปกันอย่างกว้างขวาง (Wang และคณะ, 2001, Yang และคณะ, 2003)

Pohlmana และคณะ (2002) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของของ 0.5% เซทิลไพรดิเนียมคลอไรด์ในการยับยั้ง *Salmonella* Typhimurium และ *E. coli* บนเนื้อมัด ก่อนเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ภายใต้ภาวะที่มีอากาศและภายใต้ภาวะสุญญากาศ วัดปริมาณเชื้อ สีและคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส ผลการทดลองพบว่าเซทิลไพรดิเนียมคลอไรด์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ในทั้งสองภาวะตลอดระยะเวลา 7 วัน นอกจากนี้ยังทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสยังคงมีสีแดง จึงสรุปว่าเซทิลไพรดิเนียมคลอไรด์ 0.5% ไม่ส่งผลกระทบต่อสีและกลิ่นของเนื้อมัดตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา

ขอไพบูลย์ (2548) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของ เซทิลไพรดิเนียมคลอไรด์ 0.5% ความต่อ *E. coli* ในเนื้อสันนอกหมูที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแสง UV ซึ่งผลทดลองพบว่าเซทิลไพรดิเนียมคลอไรด์ 0.5% มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* และทำให้เนื้อเกิดการสูญเสียของเหลวเล็กน้อย นอกจากนี้ยังช่วยรักษาให้เนื้อยังคงมีสีแดงและคุณภาพทางประสาทสัมผัสของเนื้อหมูอีกด้วย

Singh และคณะ (2005) ศึกษาประสิทธิภาพของเซทิลไพรดิเนียมคลอไรด์บนชิ้นเนื้อสไลด์และก้อนชิ้นเนื้อที่ถูกเติมด้วย *L. monocytogenes* ก่อนเก็บรักษา ซึ่งผลการทดลองพบว่าเซทิลไพรดิเนียมคลอไรด์มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes* โดยชิ้นเนื้อสไลด์ซึ่งมีปริมาณลดลงทันที $2 \log \text{CFU/cm}^2$ และในก้อนชิ้นเนื้อลดลงทันที $4 \log \text{CFU/cm}^2$ โดยตลอดระยะเวลา 42 วัน พบว่าชิ้นเนื้อที่เก็บรักษาโดยใช้เซทิลไพรดิเนียมคลอไรด์นั้นยังมีปริมาณเชื้อต่ำกว่าชิ้นเนื้อทั้งสองแบบที่ไม่มีการใช้เซทิลไพรดิเนียมคลอไรด์ นอกจากนี้ยังพบว่าเซทิลไพรดิเนียมคลอไรด์มีผลกระทบเพียงเล็กน้อยกับสีของชิ้นเนื้อในระหว่างการเก็บรักษา จึงสรุปได้ว่าเซทิลไพรดิเนียมคลอไรด์มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณ *L. monocytogenes* ในระหว่างการเก็บรักษาชิ้นเนื้อสไลด์และก้อนชิ้นเนื้อได้

Thongbai และคณะ (2005) ศึกษาการทำงานร่วมกันของไนซินและเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ต่อการยับยั้ง *Salmonella* Typhimurium ในน่องไก่ดิบ ผลการทดลองพบว่าในน่องไก่ดิบที่มีเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ 0.5% (w/v) ที่เวลา 120 วินาที และจากนั้นเติมไนซิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นานอีกเป็นเวลา 30 นาทีสามารถลดปริมาณของ *Salmonella* Typhimurium ได้มากที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการทำงานร่วมกันของไนซินและเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์สามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาน่องไก่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Lim และ Mustapha (2007) ศึกษาผลกระทบจาก 0.5% เซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ 0.12% แอซิทิฟายด์โซเดียมคลอไรด์ (ASC) และสารผสมทั้งสองสารในปริมาณที่เท่ากัน (0.25% CPC-0.06% ASC) ต่อ *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* ที่ปนเปื้อนบนเนื้อที่หั่นบาง และพ่นบนพื้นผิวเนื้อ โดยภายหลังการทดลองพบว่า 0.5% เซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* และ *S. aureus* แตกต่างกัน โดยเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณ *L. monocytogenes* ได้ดีที่สุด โดยตรวจไม่พบเชื้อตั้งแต่วันแรกที่พ่นสารตลอดจนวันสุดท้ายเวลาการเก็บรักษา นอกจากนี้ยังพบว่าเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ส่งผลกระทบต่อลักษณะเนื้อสัมผัส สี และกลิ่นของชิ้นเนื้อสไลด์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์สามารถนำมาใช้ในการควบคุมปริมาณแบคทีเรียที่เจริญบนผิวเนื้อได้โดยยังคงรักษาคุณภาพเนื้อไว้

ทองใบ (2010) ศึกษาผลของเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์และกรดแลคติกต่อการยับยั้ง *Escherichia coli* O157:H7 ที่ปนเปื้อนบนถั่วงอก โดยนำถั่วงอกแช่ด้วยเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ กรดแลคติก และเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ร่วมกับกรดแลคติกที่สามารถลดปริมาณ *E. coli* O157:H7 บนถั่วงอก คือ 4.0%w/v, 2.0%v/v และ 0.5%w/v ต่อ 2.0%v/v ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ที่สามารถนำมาใช้ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในการล้างผักผลไม้สดเพื่อเพิ่มความปลอดภัยในอาหาร

2.2.4 ปัจจัยที่ส่งผลต่อเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์

ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารประกอบเกลือแอมโมเนียมจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ เวลาที่สารสัมผัสกับจุลินทรีย์เป้าหมายในระยะเวลาเพียงพอต่อการออกฤทธิ์ของเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ พื้นผิวสัมผัสกับจุลินทรีย์ต้องมีมากพอไม่ถูกดูดซับหรือบดบังซึ่งส่งผลต่อการเข้าไปออกฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย นอกจากนี้ค่าความเป็นกรดเบส

อุณหภูมิที่รุนแรง ความกระด้างของน้ำมากขึ้น สามารถส่งผลต่อโครงสร้างของเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานลดลงได้อีกด้วย (Kim และ Slavik, 1996)

ความไม่ชอบน้ำยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานโดยโครงสร้างของเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ประกอบไปด้วยส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ ซึ่งส่วนที่ชอบน้ำหรือส่วนที่เป็นประจุบวกสามารถเกิดปฏิกิริยาโดยจับกับฟอสเฟตซึ่งมีประจุลบของเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรีย และสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียนั้นได้ในที่สุด (Albert-Kiszely และคณะ, 2007, Lim และ Mustapha, 2007)

แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบมีโครงสร้างแตกต่างกันโดยพบว่าประจุลบของกรดไทโคอิก ซึ่งจะพบเฉพาะในแบคทีเรียแกรมบวก สามารถเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลของเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ได้ง่าย ผิวเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีส่วนที่ไม่ชอบน้ำซึ่งมีประจุลบมากกว่า จึงสามารถเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลส่วนที่ชอบน้ำหรือโครงสร้างส่วนที่เป็นประจุบวกของเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียแกรมลบ โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะรบกวนกระบวนการหายใจของแบคทีเรียแกรมบวก (Kim และ Slavik, 1996, Lim และ Mustapha, 2007)

2.3 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิด Field emission

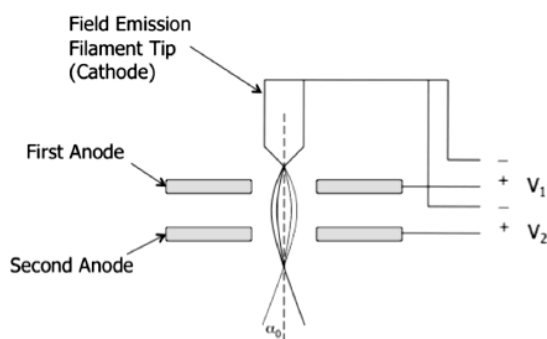
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิด Field emission (Field emission scanning electron microscopy; FE-SEM) (รูปที่ 2.7) เป็นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิดหนึ่งที่ใช้เป็นเครื่องมือศึกษาภาพของวัตถุต่างๆ ภายนอก โดยภาพที่ได้มีกำลังขยายที่สูงถึง 1,000,000 เท่า จึงสามารถศึกษาได้ถึงระดับนาโน ภาพที่ได้เป็นภาพ 3 มิติ ศักย์เร่งอิเล็กตรอนสามารถปรับได้ในช่วง 0.5-30 kV แหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนของ FE-SEM นั้น เกิดจาก Field emitter โดยการปลดปล่อยอิเล็กตรอนเกิดจากการดึงอิเล็กตรอนจากปลายลวดขนาดเล็กที่มีรัศมีประมาณ 100 นาโนเมตร ด้วยสนามไฟฟ้าจึงทำให้ภาพที่ได้มีความละเอียดสูงและมีความสว่าง จึงเหมาะในการนำมาศึกษาความตื้นลึกและพื้นผิวของวัตถุซึ่งสามารถนำไปใช้ได้หลากหลายสาขา เช่น วัสดุศาสตร์ วิศวกรรม การแพทย์ เครื่องสำอางค์ รวมไปถึงการศึกษาทางชีวภาพ (Pawley, 1997, Bogner และคณะ, 2007)



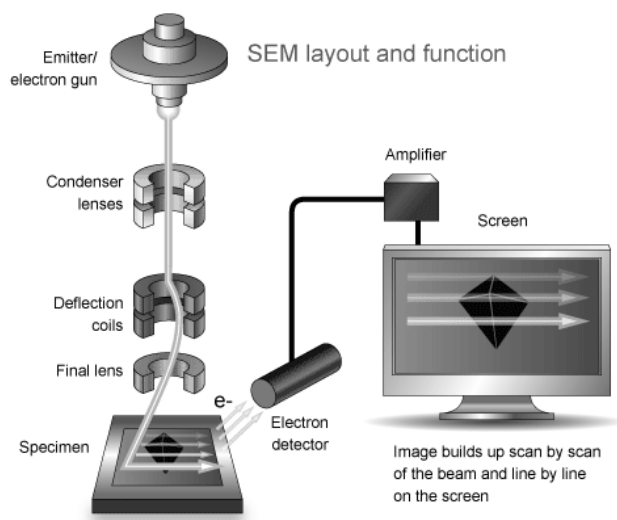
รูปที่ 2.7 ภาพถ่ายภายนอกของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (FE-SEM) รุ่น versa 3D ของบริษัท FEI

2.3.1 หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิด Field emission

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิด Field emission มีเครื่องกำเนิดอิเล็กตรอนที่เกิดจากกระแสไฟฟ้าแรงสูงส่งไปยังปลาย Filament ที่เป็นคริสตัลทังสเตนแหลม โดยมีขั้วแอโนด 2 ขั้ว (Pawley, 1997) (รูปที่ 2.8) จากนั้นอิเล็กตรอนผ่านเลนส์รวม (condenser lenses) เพื่อให้อิเล็กตรอนรวมตัวกันกลายเป็นลำอิเล็กตรอน ซึ่งภาพที่มีความคมชัดนั้นเกิดจากลำอิเล็กตรอนที่มีขนาดเล็ก จากนั้นลำอิเล็กตรอนจะผ่านเลนส์ใกล้วัตถุเพื่อปรับระยะโฟกัสและถูกกราดไปยังผิววัตถุที่ต้องการศึกษาส่งผลให้เกิดอิเล็กตรอนทุติยภูมิส่งสัญญาณไปยังตัวรับและแปลงสัญญาณไปแสดงผลบนหน้าจอ (Vernon-Parry, 2000) (รูปที่ 2.9)



รูปที่ 2.8 การจำลองหลักการทำงานของเครื่องกำเนิดอิเล็กตรอนแบบ Field emission (<http://www.semitracks.com/blog/>)



รูปที่ 2.9 ภาพจำลองหลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
(<http://bioaccent.org/microbiology/microbiology05.php>)

2.3.2 ประเภทการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิด Field emission

การแบ่งประเภทกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิด Field emission แบ่งได้จากเครื่องกำเนิดอิเล็กตรอนแบบ Field emission โดยแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1) Cold-field emission (CEM)

คริสตัลทั้งสแตนทอปที่ใช้รูปร่างเป็นแท่ง ปลายแหลม อิเล็กตรอนจะผ่านไปในอุณหภูมิต่ำ ถ้าอิเล็กตรอนที่ถูกปล่อยออกมาจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดประมาณ 1-2 นาโนเมตร ซึ่งมีพลังงานรบกวนวัตถุตัวอย่างน้อย ไม่ส่งผลในการทำลายวัตถุมากนัก เหมาะแก่การศึกษาวัตถุที่มีความไวต่อความร้อน (Bogner และคณะ, 2007)

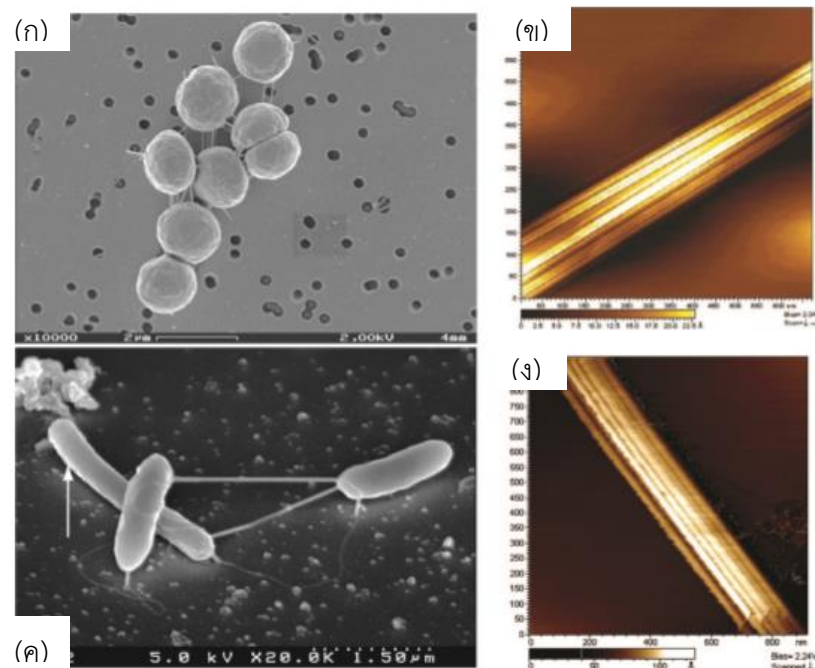
2) Thermal-field emission (TEM) หรือ Schottky-Emission

คริสตัลทั้งสแตนทอปที่ใช้ถูกเคลือบด้วยเซอร์โคเนียมไดออกไซด์ (ZrO_2) เป็นชั้นบางๆ อิเล็กตรอนจะผ่านไปในอุณหภูมิสูง ซึ่งส่งผลให้ทึบมีความสะอาด ช่วยลดความไม่เสถียรและสิ่งรบกวนอื่นได้ อย่างไรก็ตามการใช้งานในความร้อนสูงนั้นสามารถส่งผลแก่วัตถุที่มีความไวต่อความร้อนได้ (Bogner และคณะ, 2007)

2.3.4 การประยุกต์ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิด Field emission

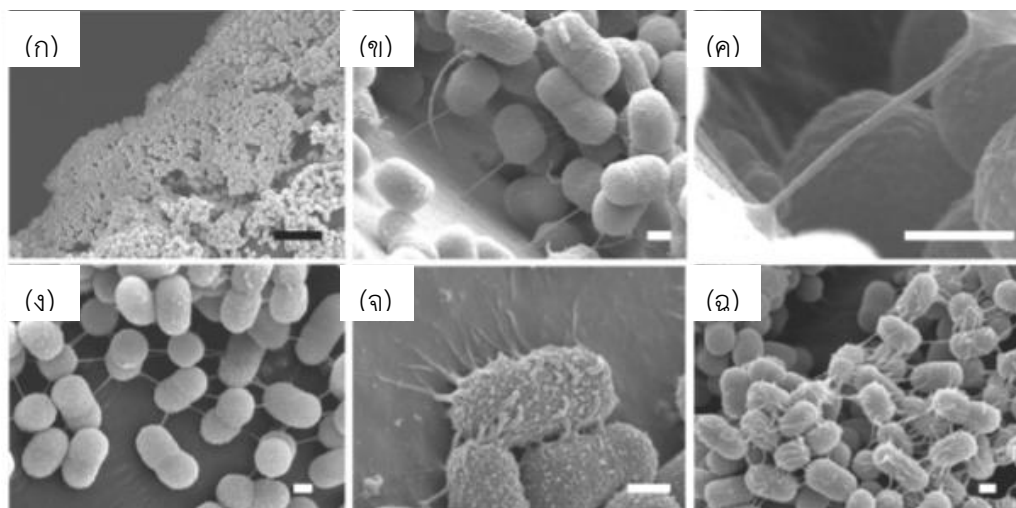
การศึกษาด้วยกล้อง FE-SEM นั้นเป็นที่นิยมเป็นอย่างมากในหลากหลายสาขา เนื่องจากภาพที่ได้มีความละเอียดสูงจึงสามารถเห็นรายละเอียดบนพื้นผิวได้อย่างชัดเจน อีกทั้งยังศึกษาความชัดลึกของวัตถุตัวอย่างได้อีกด้วย ในการศึกษาด้านชีวภาพนั้น FE-SEM เป็นเครื่องมือที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านจุลชีววิทยาในการศึกษาเซลล์แบคทีเรีย

Gorby และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตลวดโลหะนาโนด้วย *S. oneidensis* MR-1, *P. thermopropionicum* และ *M. thermoautotrophicus* ผลการทดลองพบว่าสามารถสร้างลวดโลหะที่มีขนาดอยู่ในระดับนาโนเมตรได้จากภาพ FE-SEM (รูปที่ 2.10) โดยแบคทีเรียเหล่านี้สามารถรีดิวซ์ไอออนเหล็กในสารละลายให้กลายเป็นเส้นสวดโลหะที่รวมกันเป็นมัดได้โดยกลุ่มเส้นลวดเหล่านี้มีค่าการนำไฟฟ้าสูงสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้



รูปที่ 2.10 ภาพลวดนาโนที่ผลิตจาก *S. oneidensis* MR-1 และ *P. thermopropionicum* เจริญร่วมกับ *M. thermoautotrophicus* ภายใต SEM และ STM โดยแสดงภาพ SEM ของ *S. oneidensis* (ก) ภาพ STM ยืนยันการเหนี่ยวนำไฟฟ้าของลวดนาโนที่ยื่นออกมาผลิตจาก *S. oneidensis* MR-1 (ข) ภาพ SEM แสดง *P. thermopropionicum* และ *M. thermoautotrophicus* ที่มีลวดนาโนเชื่อมระหว่างเซลล์ (ค) และภาพ STM แสดงลักษณะลวดนาโนที่มีค่าการนำไฟฟ้าสูงและลักษณะโครงสร้างเป็นเส้นขนาดเล็กที่รวมกลุ่มกัน (ง) (Gorby และคณะ, 2006)

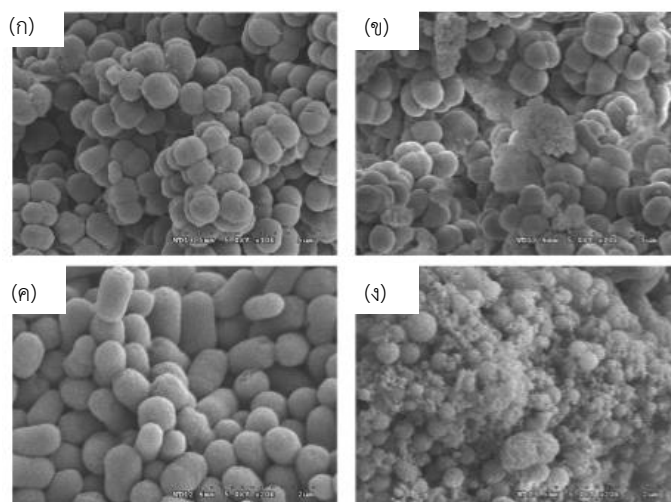
Ishii และคณะ (2004) ได้ศึกษารูปแบบของรยางค์ของ *Acinetobacter* Tol 5 ภายใต้กล้อง FE-SEM จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ารูป FE-SEM สามารถพิจารณารูปแบบรยางค์ของเซลล์ได้อย่างชัดเจน โดยพบว่ารยางค์แบบเส้นตรงจะยึดออกไปเป็นแนวตรงจับกับพื้นผิวด้านล่างโดยไม่แตกแขนงและเชื่อมโยงกับเซลล์อื่นด้วยความยาวหลายร้อยนาโนเมตร ส่วนรยางค์แบบเหี่ยวจะติดกับพื้นผิวหรือเซลล์อื่นด้วยจำนวนที่มากกว่า (รูปที่ 2.11)



รูปที่ 2.11 ภาพ FE-SEM ของ Tol 5 ที่เรียงตัวกันเป็นกลุ่มก้อนหลายชั้น (ก) ลักษณะการยึดเป็นเส้นตรงของเซลล์กับพื้นผิว (ข-ง) และลักษณะการยึดของเซลล์เป็นแบบเส้นเหี่ยวจากเซลล์ไปยังพื้นผิว (จ-ฉ) (Ishii และคณะ, 2004)

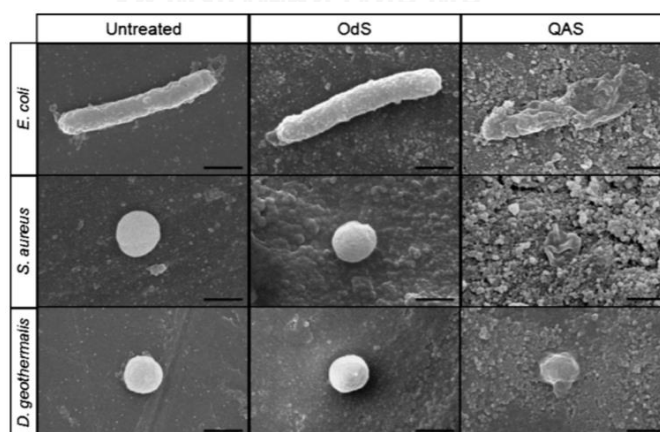
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้ศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *E. coli* ด้วยอนุภาคซิลเวอร์นาโน ภายใต้กล้อง FE-SEM พบเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้อย่างชัดเจน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโนมีผลในการยับยั้งการเจริญและการสืบพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว โดยการเปลี่ยนแปลงค่า pH และอุณหภูมิจะไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการทำงานของอนุภาคซิลเวอร์นาโน นอกจากนี้อนุภาคซิลเวอร์นาโนยังมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ด้วย (รูปที่ 2.12)



รูปที่ 2.12 ภาพ FE-SEM ของ *S. aureus* (ก) *S. aureus* ถูกยับยั้งด้วยอนุภาคนาโนซิลเวอร์ (ข) *E. coli* (ค) และ *E. coli* ที่ถูกยับยั้งด้วยอนุภาคนาโนซิลเวอร์ (ง) (Kim และคณะ, 2011)

Song และคณะ (2011) ศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียด้วยสารประกอบ Quaternary ammonium บนพื้นผิวอนุภาคนาโนซิลิกา โดยศึกษาลักษณะเซลล์ด้วยกล้อง FE-SEM จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเติมสารประกอบ Quaternary ammonium silane (QAS) มีผลทำให้ผนังเซลล์ด้านนอกถูกทำลายอย่างรุนแรงจนไม่สามารถระบุลักษณะรูปร่างได้ โดยประจุบวกของ Quaternary ammonium ใน QAS เข้าจับกับโครงสร้างลิวติโนไลเยอร์บนเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียจึงทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย เนื่องจากสารชนิดนี้มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำจึงเข้ากับเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีและประกอบกับความสามารถในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์จึงทำให้เกิดการทำลายที่รุนแรง (รูปที่ 2.13)



รูปที่ 2.13 ภาพ FE-SEM แสดงเซลล์ *E. coli*, *S. aureus* และ *D. geothermalis* ที่ภาวะต่างๆ (ภาวะควบคุม, เติมสาร OdS และ เติมสาร QAS) แถบสเกลขนาด 1 ไมโครเมตร (Song และคณะ, 2011)

2.4 กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม

กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic force microscopy, AFM) เป็นกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวอ่านกราดวิเคราะห์ (Scanning Probe Microscopy หรือ SPM) ชนิดหนึ่ง que พัฒนาขึ้นเพื่อใช้วัดค่าโดยตรงจากแรงระหว่างโมเลกุลที่มีลักษณะความละเอียดถึงระดับอะตอม (รูปที่ 2.14) ใช้ในการถ่ายภาพวัตถุหรือตรวจสอบลักษณะพื้นผิวที่มีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร และแสดงภาพออกมาเป็น 3 มิติ กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมสามารถนำมาใช้เพื่อศึกษาสมบัติของพื้นผิวต่างๆ ได้หลากหลาย รวมถึงการวัดค่าแรงเสียดทาน Adhesion และ Viscoelastic ซึ่งการหาสมบัติ Viscoelastic นั้นสามารถหาได้จากค่า Young's modulus, Imaging magnetic หรือ แรงไฟฟ้าสถิตย์ (Jalili และ Laxminarayana, 2004, Hilal และคณะ, 2006)



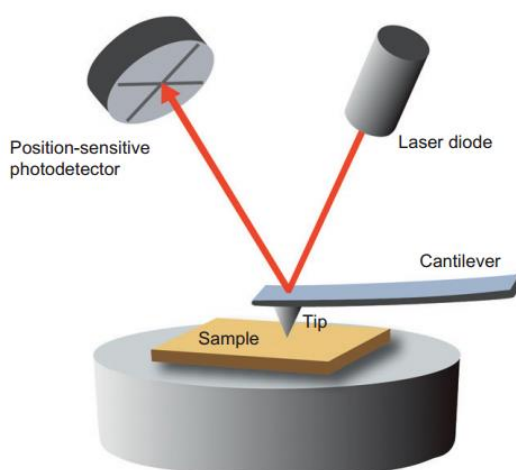
รูปที่ 2.14 ภาพถ่ายภายนอกของกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมรุ่น Bio-AFM ของบริษัท JPK Instruments

การทำงานของกล้องนี้ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในช่วงกว้างแม้กระทั่งบนพื้นผิวที่เป็นฉนวนไฟฟ้า เช่น พอลิเมอร์ สารกึ่งตัวนำ วัสดุ พิล์ม เส้นใย รวมไปถึงผงฝุ่นในอากาศหรือในของเหลว ปัจจุบันมีการนำมาใช้ศึกษากับสารชีวภาพทั้งสารชีวโมเลกุลหรือเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอีกด้วย ข้อได้เปรียบของกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมเมื่อเปรียบเทียบกับกล้องจุลทรรศน์ทั่วไปคือ ไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยากซับซ้อนและสามารถแสดงผลที่มีความน่าเชื่อถือในระดับนาโนเมตรโดยไม่ต้องเคลื่อนย้ายตัวอย่าง เปลี่ยนปลายแหลม หรือเปลี่ยนพื้นที่และเครื่องมือใดๆ เมื่อต้องการภาพจากตัวอย่างที่ต่างกัน (Liu และ Wang, 2011, Vahabi และคณะ, 2013)

2.4.1 หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม

ภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมนั้นเกิดจากการตรวจวัดค่าของแรงเชิงปฏิสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งของปลายแหลมหรือเรียกว่า ทิปโพรบ หรือเซนเซอร์ที่อยู่บนคาน (cantilever) กระทำต่อพื้นผิววัตถุในระหว่างที่ตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านปลายแหลมซึ่งแรงปฏิกิริยาจะกระทำในแนวตั้งฉากเกิดขึ้นระหว่างอะตอมของพื้นผิววัตถุกับปลายแหลม จากนั้นถูกนำมาแปรสัญญาณเพื่อนำมาสร้างเป็นภาพพื้นผิวที่เป็นลักษณะโครงสร้างระดับอะตอม (Jalili และ Laxminarayana, 2004, Hilal และคณะ, 2006)

การตรวจวัดค่าของแรงจากการเคลื่อนที่ของคานนั้นมีหลากหลายวิธี ในปัจจุบันกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมส่วนใหญ่ใช้ลำแสงเลเซอร์ โดยจะมีตัวส่งผ่านแสงเลเซอร์ (laser diode) ปล่อยให้กับปลายแหลมที่อยู่ด้านล่างคานโดยลำแสงจะสะท้อนไปยังตัวรับสัญญาณภาพ (photodetector) และเกิดภาพที่มีกำลังการขยายสูงแสดงบนจอภาพ (Liu และ Wang, 2011) ดังรูปที่ 2.15



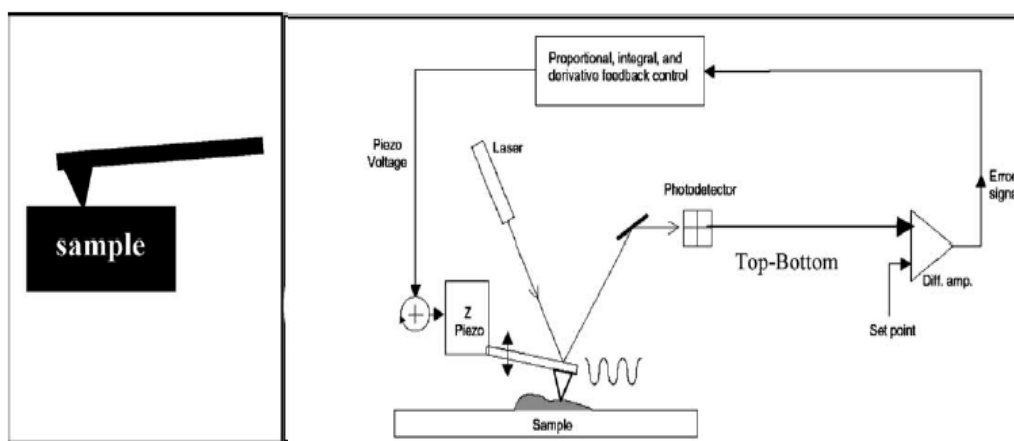
รูปที่ 2.15 แสดงภาพจำลองหลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Liu และ Wang, 2011)

2.4.2 ประเภทการทำงานของกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม

การทำงานของกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมมีหลายวิธีเพื่อให้เหมาะสมกับพื้นผิววัตถุที่ต้องการศึกษาและเกิดภาพตามต้องการได้ สามารถแบ่งประเภทตามการทำงานของคานได้ดังนี้ (Liu และ Wang, 2011)

1) การถ่ายภาพแบบสัมผัส (contact mode)

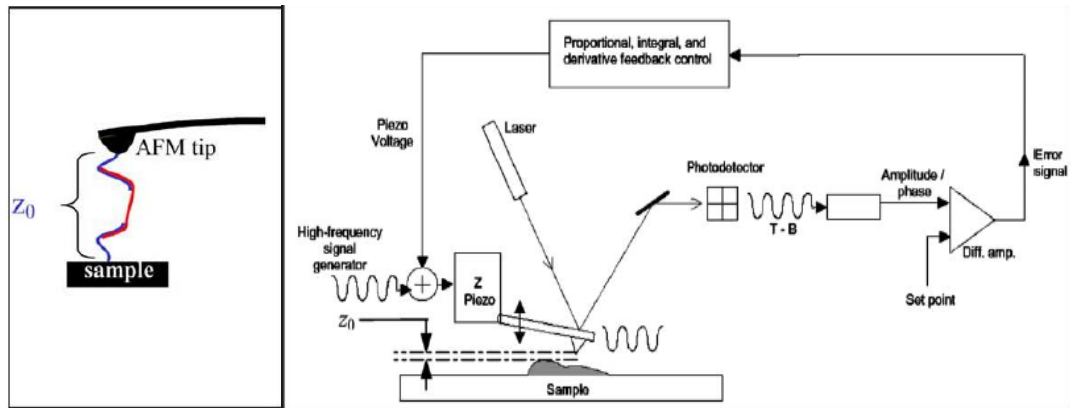
เป็นรูปแบบการศึกษาพื้นผิวโดยตรง คือ มีการรักษาระยะของปลายแหลมกับตัวอย่างให้คงที่ ปลายแหลมมีการสัมผัสกับตัวอย่าง โดยตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านปลายแหลม การเปลี่ยนแปลงของพื้นผิวส่งผลให้เกิดแรงกระทำกับคาน และคานจะส่งสัญญาณเข้าสู่เครื่องประมวลผลออกมาทางจอภาพต่อไป (รูปที่ 2.16) แต่ข้อเสียเปรียบของวิธีนี้คือ อาจเกิดการโก่งงอ หรือบิดเบี้ยวของคานเนื่องมาจากแรงต้านที่ได้จากการเคลื่อนที่ของตัวอย่าง อยู่ในทิศทางที่ขนานกับการวางตัวของคาน นอกจากนี้ข้อมูลความสูงของพื้นผิวอาจมีการผิดพลาดจากค่าจริงได้อีกด้วย (Jalili และ Laxminarayana, 2004)



รูปที่ 2.16 แสดงแผนภาพของระบบการสร้างภาพแบบสัมผัสในกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Jalili และ Laxminarayana, 2004)

2) การถ่ายภาพแบบไม่สัมผัส (non-contact mode)

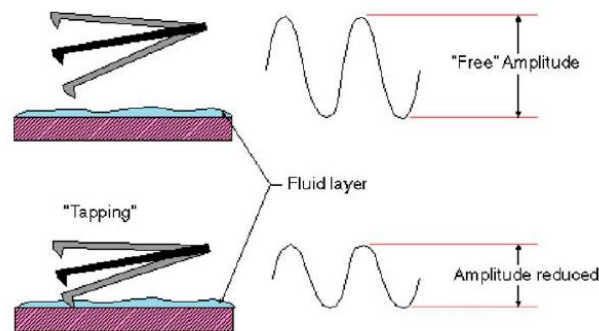
รูปแบบนี้เกิดจากการสั่นของคานที่อยู่ใกล้พื้นผิวตัวอย่างระยะห่างระหว่างพื้นผิวตัวอย่างกับปลายแหลมที่ไม่ห่างกันมากนัก จะเกิดแรงระหว่างกันซึ่งแรงสำคัญได้แก่แรงแวนเดอร์วาลส์ โดยระยะห่างนั้นมีค่าประมาณ 5-10 นาโนเมตร การสั่นของคานจะเกิดความถี่เรโซแนนซ์และส่งข้อมูลต่อไปยังเครื่องประมวลผล ดังแสดงในรูปที่ 2.17 แรงที่เกิดขึ้นระหว่างปลายแหลมกับตัวอย่างจะมีค่าน้อยกว่าในระบบการสร้างภาพแบบสัมผัสซึ่งส่งผลที่ดีกับตัวอย่างที่มีความอ่อนนุ่ม โดยตัวอย่างจะไม่เสียหายและไม่ปนเปื้อนสิ่งแปลกปลอมจากปลายแหลม แต่ยังมีข้อเสียเปรียบที่วิธีนี้สามารถใช้ได้เฉพาะในอากาศ ไม่สามารถใช้ในตัวอย่างที่เป็นของเหลวซึ่งจะมีแรงอื่นมารบกวนแรงแวนเดอร์วาลส์ (Jalili และ Laxminarayana, 2004)



รูปที่ 2.17 แผนภาพของระบบการสร้างภาพแบบไม่สัมผัสในกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Jalili และ Laxminarayana, 2004)

3) การถ่ายภาพแบบเคาะ (tapping mode)

เป็นระบบผสมกันระหว่างระบบทั้งสองข้างต้น ซึ่งรวบรวมเอาการแก้ปัญหาต่าง ๆ มาคานจะสั้นด้วยความถี่เรโซแนนซ์ซึ่งจะสัมผัสกับพื้นผิวสลับกับการสั้นเบาๆ เหนือพื้นผิวดังแสดงในรูปที่ 2.18 ข้อดีของวิธีการนี้คือสามารถแก้ปัญหการทำลายพื้นผิวตัวอย่างลงไปได้และยังลดการใช้พลังงานด้วยแรงที่เกิดจากธรรมชาติอีกด้วย



รูปที่ 2.18 แสดงแผนภาพของระบบการสร้างภาพแบบเคาะในกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Jalili และ Laxminarayana, 2004)

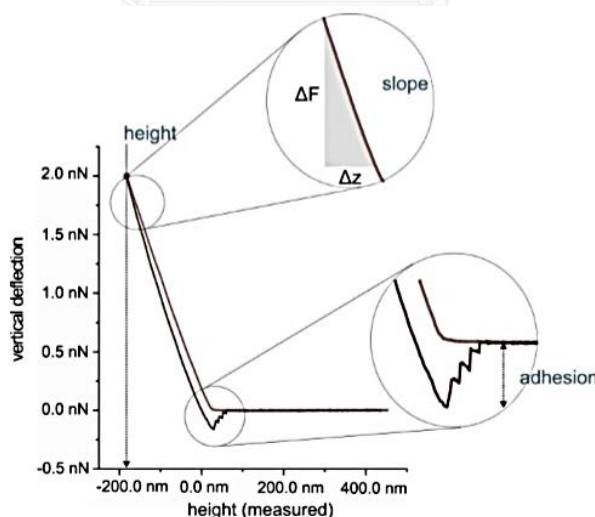
4) การถ่ายภาพเชิงปริมาณ (quantitative imaging; QI mode)

ในปัจจุบันมีการพัฒนาการถ่ายภาพวัตถุตัวอย่างในรูปแบบใหม่เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ทางชีวภาพ เพื่อการศึกษาลักษณะภายนอกและถ่ายภาพเซลล์ที่ยังมีชีวิต โดยเรียกรูปแบบนี้ว่า รูปแบบ QI ซึ่งเป็นรูปแบบที่ปรับปรุงวิธีการถ่ายภาพเพื่อให้ สามารถถ่ายภาพเซลล์ที่มีชีวิตได้ง่ายยิ่งขึ้น ภาพที่ได้ในแต่ละพิกเซลเกิดจากการวัดแรงระหว่างปลายแหลมกับพื้นผิวด้วยลักษณะการเคลื่อนที่ของทิว

แบบเฉพาะซึ่งมีข้อดี 2 ประการคือ ตัวอย่างที่มีความละเอียดอ่อนมาก เช่น เซลล์ที่มีชีวิต สามารถถ่ายภาพได้โดยไม่มีแรงจากภายนอกมากกระทำกับตัวอย่าง เซลล์จึงไม่ถูกทำลาย อีกประการหนึ่งคือ ภาพที่ได้จากการใช้รูปแบบ QI สามารถบอกข้อมูลรายละเอียดของผิวตัวอย่างนอกเหนือจากรูปแบบอื่น เนื่องจากการถ่ายภาพรูปแบบนี้เป็นกรวัดแรงบนพื้นผิว จึงได้ผลเป็นกราฟระหว่างแรงและระยะทาง ซึ่งสามารถนำข้อมูลมาวิเคราะห์และแสดงออกเป็นภาพที่ได้จากค่าต่าง ๆ นั้น เช่น แรงยึดติด (Adhesion Force) ค่าความชันของกราฟระหว่างแรงและระยะทาง (Slope) และค่า Young's modulus ดังแสดงในรูปที่ 2.19 (<http://www.jpk.com/qi-advanced.665.en.html>)

การถ่ายภาพเชิงปริมาณสามารถให้ข้อมูลของวัตถุตัวอย่างได้ดังนี้

1. ค่าความสูงจากพื้นหลัง (Height) แสดงความสูงหรือความหนาจากพื้นผิว และขนาดของตัวอย่าง อีกทั้งยังแสดงลักษณะพื้นผิวของตัวอย่างที่บริเวณต่างๆ
2. แรงยึดติด (Adhesion Force) เป็นแรงยึดติดระหว่างผิวตัวอย่างกับปลายทิวซึ่งเกิดขึ้นขณะปลายทิวกำลังเคลื่อนที่ขึ้นจากผิวเซลล์
3. ค่าความชันกราฟ (Slope) เป็นค่าความชันระหว่างแรงที่กระทำกับผิวตัวอย่างกับระยะที่ตกลงไปบนผิวเซลล์ จากข้อมูลนี้สามารถบอกความเหนียวและความต่งของเซลล์ได้
4. Young's modulus เป็นค่าที่แสดงสมบัติความยืดหยุ่นของผิวเซลล์



รูปที่ 2.19 ภาพจำลองผลการวิเคราะห์แรงระหว่างปลายแหลมกับพื้นผิวตัวอย่างด้วยเครื่อง AFM แบบเชิงปริมาณ โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแรงและระยะทาง (<http://www.jpk.com/qi-advanced.665.en.html>)

นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้ AFM ในรูปแบบเทคนิคใหม่เพื่อวัดค่าอื่นๆ ของพื้นผิววัตถุจากการเคลื่อนที่ของปลายแหลม ดังนี้

- 1) การตรวจวัดแรงเสียดทานบนพื้นผิว โดยเทคนิค lateral force microscopy
- 2) การตรวจวัดแรงระหว่างโมเลกุลโดยใช้ nanocontact mode ทำโดยใช้ปลายแหลมกวาดผ่านพื้นผิววัตถุในระยะที่ใกล้มากอย่างคงที่ซึ่งชั้นน้ำบางๆ ที่อยู่บนปลายแหลมจะเกิดเป็นสะพานแคปิลลารี (capillary bridge) เชื่อมไปยังพื้นผิววัตถุ ส่งผลให้ปลายแหลมเกิดการ “jump-to-contact”
- 3) การตรวจวัดความยืดหยุ่นของวัตถุ โดยใช้เทคนิค force modulation ในเทคนิคนี้ วัดค่าความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงและระยะการเคลื่อนที่
- 4) การศึกษาสมบัติของตัวอย่าง ทั้งแรงเสียดทาน ความยืดหยุ่น ความแข็ง ความหนืด โดยใช้เทคนิค Phase imaging โดยการให้ปลายแหลมกวาดผ่านพื้นผิวในระยะที่เปลี่ยนไป (phase shift) เทคนิคนี้ตรวจวัดค่าจากความสัมพันธ์ของปลายแหลมและพื้นผิวในพื้นที่ต่างๆ

2.4.3 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม

กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมมีการนำไปใช้กันอย่างแพร่หลายอย่างไรก็ตามยังคงมีข้อจำกัดของการประยุกต์ใช้กับวัตถุทางชีวภาพเช่น เซลล์ เนื้อเยื่อ โปรตีน หรือดีเอ็นเอ นั้นจะต้องยึดติดกับพื้นผิวรองรับ เช่น แผ่นไมก้าหรือกระจกปิดสไลด์ ได้เป็นอย่างดี จึงมีการวิจัยพัฒนาวิธีการต่างๆ ในการช่วยยึดติดโมเลกุลทางชีวภาพให้ติดแน่นบนพื้นผิวรองรับได้ซึ่งโดยปกตินั้นจะอยู่ในสภาพลอยในของเหลว สารที่ใช้ยึดติดเซลล์กับพื้นผิวรองรับที่ใช้โดยทั่วไปนั้นมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับวัตถุที่ต้องการศึกษา เช่น กลูตาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ฟอर्मาลดีไฮด์ (formaldehyde) พาราฟอर्मาลดีไฮด์ (paraformaldehyde) สารผสมระหว่างเมทานอลกับอะซิโตน หรือเอทานอลกับกรดอะซิติก เป็นต้น ในการศึกษาเซลล์แบคทีเรียหรือเนื้อเยื่อที่ยังมีชีวิตนั้นมีการเลือกใช้พอลิแอลโลซีน (poly-L-lysine; PLL) ที่มีมวลโมเลกุลสูงซึ่งเป็นสารที่มีประจุบวกทำให้สามารถเข้าจับผนังเซลล์ที่มีประจุลบได้ และไม่เป็นพิษกับเซลล์ ส่งผลให้ภาพที่ได้เกิดจากเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จริง นอกจากนี้การเตรียมสไลด์เคลือบ PLL นั้นยังสามารถเก็บไว้ได้นานอีกด้วย ปัจจุบันยังมีการศึกษาวิจัยนำสารอื่นๆ ที่นำมาใช้ตรึงเซลล์ขึ้นอยู่กับวัตถุที่ต้องการศึกษา ดังแสดงในตารางที่ 2.3 ซึ่งมีการใช้เจลาติน, EDS, APTES, Poly-L-lysine หรือ Poly-dopamine ที่นำไปใช้ในการศึกษาด้วย AFM

ตารางที่ 2.3 การเลือกใช้สารต่างๆในการตรึงแบคทีเรียในของเหลวเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ด้วย AFM (ดัดแปลงมาจาก (Louise Meyera และคณะ, 2010))

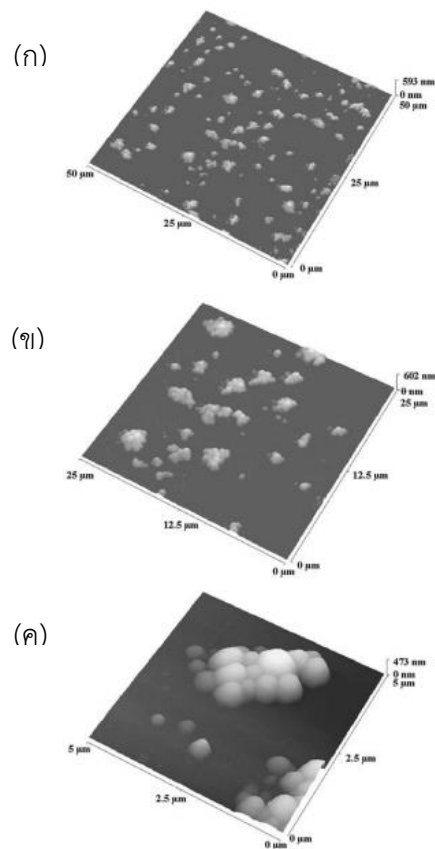
วิธีการ	อ้างอิง	หมายเหตุ
การตรึงด้วยเจลาติน	(Doktycz และคณะ, 2003) (Beckmanna และคณะ, 2006) (Louise Meyera และคณะ, 2010)	-มีประจุบวกรุนแรงจึงควบคุม ทิปกับตัวอย่างได้ยากใน PBS -เหมาะกับการใช้กับตัวอย่างที่มี แรงไอออนิกต่ำ และใช้น้ำ ปราศจากไอออน
การตรึงด้วย EDS (เอ็น-(2-อะมิโนเอทิล)-3-อะ มิโนโพรพิลไตรเอทอกซีไซ เลน)	(Louise Meyera และคณะ, 2010)	-ทำให้เซลล์ถูกตรึงด้วยแรงไอ ออนิกและแรงไฮโดรฟิลิก -มีความหนาแน่นของหมู่เอมีน ต่ำ
การตรึงด้วย APTES (3-อะมิโนโพรพิลไตรเอทอก ซีไซเลน)	(Louise Meyera และคณะ, 2010)	-ทำให้เซลล์ถูกตรึงด้วยแรงไอ ออนิกและแรงไฮโดรฟิลิก -มีความหนาแน่นของหมู่เอมีน ต่ำ -เหมาะกับการใช้น้ำปราศจาก ไอออน
การตรึงด้วย PEI (พอลิเอทิลีนอิมิน)	(Velegol และ Tilton, 2002) (Pelling และคณะ, 2005) (Gaboriaud และคณะ, 2008) (Francius และคณะ, 2008)	-มีประจุบวกส่งผลต่อแรง ระหว่างทิปกับตัวอย่าง
การตรึงด้วย PLL (พอลิแอลโลซีน)	(Schar-Zammaretti และ Ubbink, 2003) (Vadillo-Rodriguez และคณะ, 2008) (Stukalov และคณะ, 2008) (Meyer และคณะ, 2010)	-เซลล์ยึดเกาะได้ดีเนื่องจากมีหมู่ ฟังก์ชันที่ต่างจากสารตรึงเซลล์ อื่น เซลล์สามารถจับกับหมู่เอมีน ได้ดี -สามารถตรึงเซลล์ใน PBS ได้ดี
การตรึงด้วยพอลิโดพามีน	(Kang และ Elimelech, 2009)	-ใช้ในการยึดเซลล์ติดกับคานที่ ปลายทิปเพื่อศึกษาแรงระหว่าง เซลล์กับเซลล์

2.4.4 การประยุกต์ใช้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม

กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมถูกนำไปใช้ในหลากหลายแขนง ทั้งวัสดุ พอลิเมอร์ พลาสติก อนุภาคนาโนต่างๆ รวมไปถึงทางด้านชีวโมเลกุล เซลล์ หรือเนื้อเยื่อต่างๆ ดังเช่นการทดลองของ Dubes และคณะ (2003) ศึกษาเปรียบเทียบภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) และกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) ของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง (SLNs) ที่สร้างจาก 2,3 ไตแอลคาโนอิลไฮโคลเดกซ์ทริน (2,3-di-o-alkanoyl- β -cyclodextrin) ผลการเปรียบเทียบผลแสดงให้เห็นว่าผลของสัญญาณในวิธีการอบแห้งที่ใช้ในการเตรียมสารตัวอย่างสำหรับ SEM ทำให้เกิดการหดตัวลดขนาดของ SLNs ในขณะที่การเคลื่อนที่ของตัวอย่างจากการใช้ AFM ทำให้ SLNs รวมกันกลุ่มเล็กๆ ดังรูปที่ 2.20 ซึ่งขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคไม่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Photon Correlation Spectroscopy (PCS) ซึ่งให้ผลว่าอนุภาคมีขนาด 359 ± 15 นาโนเมตรดังตารางที่ 2.4 แสดงให้เห็นว่าการศึกษาด้วย AFM จะได้ภาพมีขนาดที่ใกล้เคียงขนาดจริงมากกว่าการศึกษาด้วย SEM อย่างเห็นได้ชัด

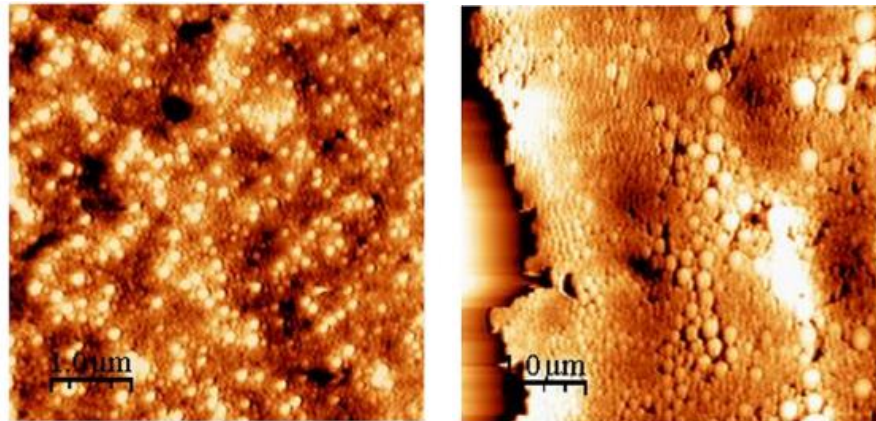
ตารางที่ 2.4 แสดงค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง (SLNs) ที่สร้างจาก 2,3 ไตแอลคาโนอิลไฮโคลเดกซ์ที่ได้จากการวัดด้วยวิธีต่างๆ

วิธีการวัด	ขนาดอนุภาค (นาโนเมตร)	
PCS	359 ± 15	
SEM	212 ± 12	
AFM	เส้นผ่าศูนย์กลาง	359 ± 50
	ความสูง	140 ± 27



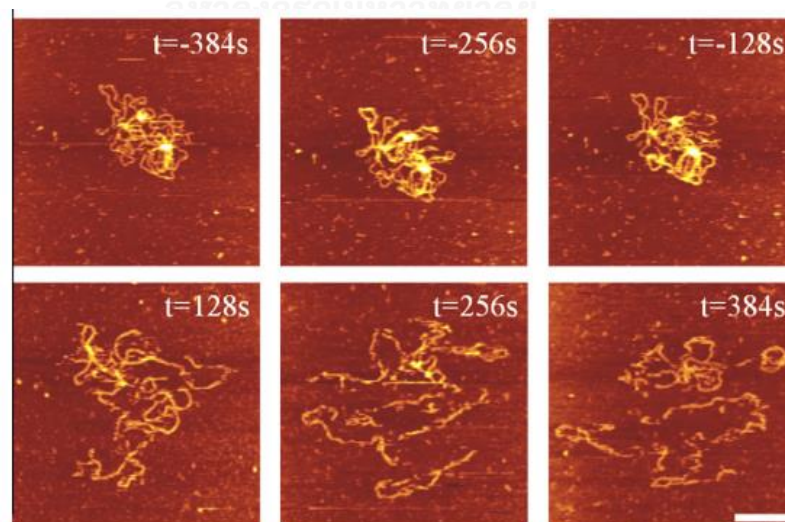
รูปที่ 2.20 แสดงภาพที่ได้จากระบบการสร้างภาพแบบไม่สัมผัสด้วย AFM ของ SLNs ที่ขนาดภาพ (ก) 50 มิลลิเมตร, (ข) 25 มิลลิเมตร และ (ค) 5 มิลลิเมตร

Fritzen-Garcia และคณะ (2009) ศึกษาด้วยระบบการสร้างภาพแบบไม่สัมผัสของ AFM ซึ่งนำไปใช้ในการถ่ายภาพอนุภาคนาโนจากพอลิยูรีเทนซึ่งสร้างด้วยไทรอลจากธรรมชาติ และ ไอโซพอร์นไดไอโซไซยานต (IPDI) ซึ่งมีพอลิเอทิลีนไกลคอล (PEG) บนพื้นผิวที่แตกต่างกันในด้านความชอบหรือไม่ชอบน้ำ ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนมีการกระจายที่ดีขึ้นในไมกาและซิลิกอนที่ชอบน้ำ ดังแสดงในรูปที่ 2.21



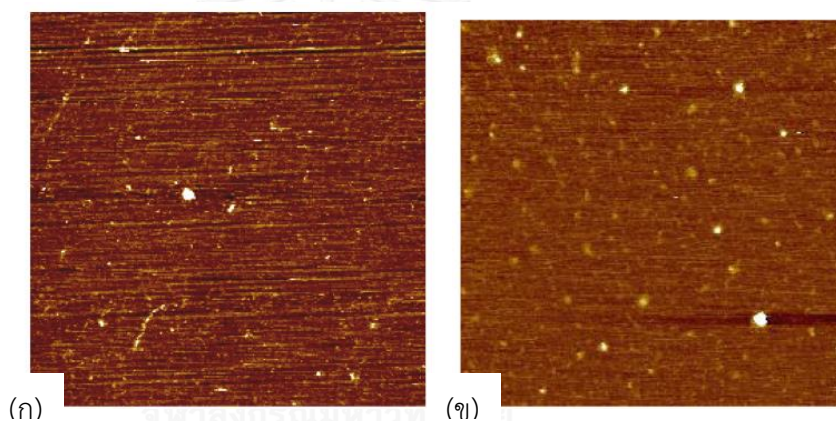
รูปที่ 2.21 แสดงภาพที่ได้จากระบบการสร้างภาพแบบไม่สัมผัสด้วย AFM ของอนุภาคนาโนจากพอลิยูรีเทนที่ขนาดภาพ 5 ไมโครเมตรบนพื้นผิวไมกา (ซ้าย) และซิลิกอนที่ขบมน้ำ (ขวา)

ทำการศึกษาเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรส II (Topo II) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีลักษณะเฉพาะในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างดีเอ็นเอโดยเร่งให้ดีเอ็นเอสายคู่เกิดการพาดทับซึ่งกันและกันโดยใช้พลังงานจาก ATP ในการทดลอง Topo II ของมนุษย์ จะเข้าทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอแบบซูเปอร์คอยล์สายบวมได้เร็วกว่าประมาณ 10 เท่าของสายลบ การศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) พบว่า Topo II ชอบที่จะเข้าจับกับดีเอ็นเอที่เกิดการพาดทับ (DNA cross-overs) ประมาณ 50% ซึ่งอยู่ที่มุมในช่วง 80-90 องศา นอกจากนี้ยังช่วยให้เห็นภาพการเปลี่ยนแปลงจากการคลายปมของ Topo II อีกด้วยดังแสดงในรูปที่ 2.22



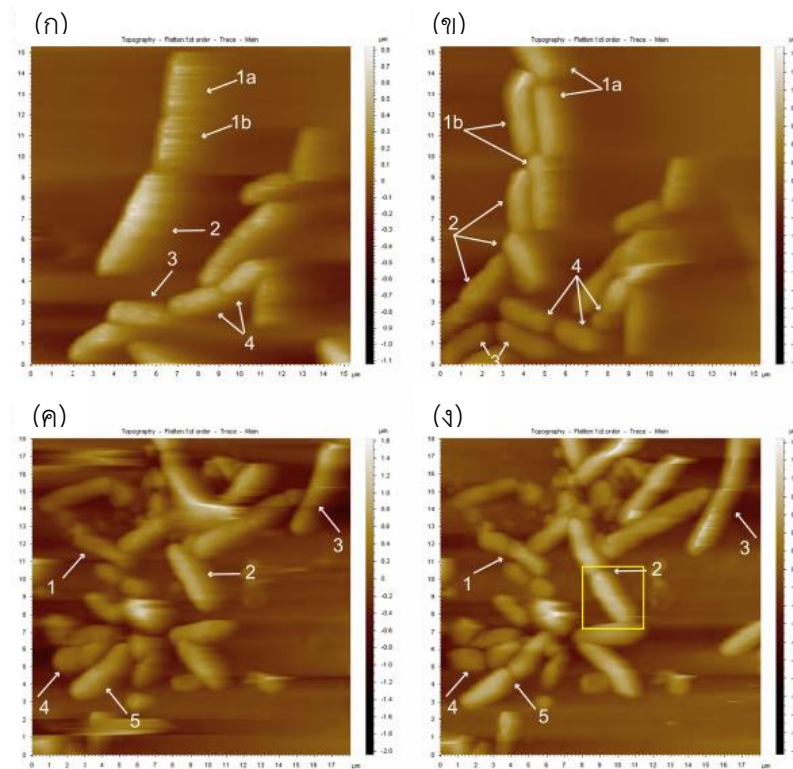
รูปที่ 2.22 แสดงภาพการคลายปมดีเอ็นเอของเอนไซม์ Topo II ในเวลาต่างๆ ด้วย AFM

Baaloushaa และ Lead (2013) ศึกษาผลกระทบของการใช้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม ด้วยระบบการสร้างภาพทั้ง 2 ชนิด คือแบบสัมผัสและไม่สัมผัส โดยศึกษาอนุภาคที่สกัดจากดินแม่น้ำ Suwannee (Suwannee River humic acids, SRHA) นำมาวัดขนาดของอนุภาคเปรียบเทียบระหว่างอนุภาคแห้งกับอนุภาคในสารละลาย ผลการทดลองพบว่าระบบการสร้างภาพแบบสัมผัส ส่งผลให้เกิดการสูญเสียอนุภาคเนื่องจากแรงระหว่างกระบวนการและการยึดติดของอนุภาคกับปลาย ทิป นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ AFM แบบไม่สัมผัสมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับอนุภาคเหล่านี้ ซึ่งจาก ผลของขนาดอนุภาคและสัญญาณวิทยามีความแตกต่างกันเล็กน้อยระหว่างอนุภาคในภาวะอากาศและ อนุภาคในสารละลาย โดยอนุภาคในภาวะอากาศมีขนาดเล็กกว่าและรวมตัวกัน ในขณะที่อนุภาคใน สารละลายมีขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อยและกระจายตัวกันมากกว่าซึ่งเป็นผลการทดลองจากภาวะที่ ไกล่เคียงกับภาวะที่อนุภาคอยู่ในธรรมชาติดังแสดงในรูปที่ 2.23



รูปที่ 2.23 แสดงภาพที่ได้จากระบบการสร้างภาพแบบไม่สัมผัสด้วย AFM ของอนุภาค SRHA (Suwannee River humic acids) ที่ pH 4.4 ที่ขนาดภาพ 2 ไมโครเมตร (ก) ในสารละลาย (ข) ใน ภาวะอากาศ

Lonergan และคณะ (2013) ได้ศึกษาพื้นผิวเซลล์ *Escherichia coli* สายพันธุ์ดั้งเดิม 221 และสายพันธุ์กลายพันธุ์ MK8A44 ที่ยังมีชีวิตอยู่ด้วยการตรึงเซลล์บน Poly-L-lysine (PLL) ใน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์แล้วส่องด้วยกล้อง AFM พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปเซลล์ทั้งสองสายพันธุ์มีการแบ่งเซลล์ เกิดขึ้นในลูกศรสีขาว ดังรูปที่ 2.24 สามารถสรุปได้ว่าเซลล์นั้นยังคงมีชีวิตโดยไม่โดนปลายทิปทำลาย



รูปที่ 2.24 แสดงภาพที่ได้จากระบบการสร้างภาพแบบไม่สัมผัสด้วย AFM ของเซลล์ดั้งเดิม 221 ที่นาที่ที่ 0 (ก) และนาที่ที่ 165 (ข) และเซลล์กลายพันธุ์ MK8A44 ที่นาที่ที่ 0 (ค) และนาที่ที่ 165 (ง) ซึ่งถูกตรึงด้วย PLL ในฟอตเฟสพฟเฟอร์

2.5 รามานสเปกโทรสโกปี

รามานสเปกโทรสโกปี (Raman spectroscopy) เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวางในหลากหลายแขนง ถูกนำมาใช้เพื่อหาโครงสร้างหรือสมบัติของส่วนประกอบพื้นฐาน โดยการใช้เครื่องรามานสเปกโตรมิเตอร์ (Raman spectrometer) (รูปที่ 2.25) วัดสเปกตรัมที่เปลี่ยนไปของรามานชิฟต์ที่เกิดการกระเจิงแบบไม่ยืดหยุ่น (Raman scattering) และตำแหน่งของสเปกตรัม นั้น ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะโครงสร้างพันธะของโมเลกุลในวัตถุนั้น โดยสารแต่ละชนิดมีรูปแบบสเปกตรัมที่จำเพาะเป็นเอกลักษณ์ของแต่ละสารแตกต่างกันขึ้นกับหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลนั้นๆ สามารถนำมาเปรียบเทียบสารมาตรฐานเพื่อตรวจสอบชนิดของสารได้ เทคนิคนี้สามารถประยุกต์ใช้วิเคราะห์วัสดุต่างๆได้ในหลากหลายสาขา อาทิเช่น เคมี, การแพทย์, ฟิสิกส์และวัสดุศาสตร์ เป็นต้น (Zhang และคณะ, 2010)



รูปที่ 2.25 แสดงภาพเครื่องรามานสเปกโทรมิเตอร์ (Raman spectrometer) รุ่น NTEGRA-spectra บริษัท NT-MDT

2.5.1 ข้อดีของเทคนิครามานสเปกโทรสโกปี

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิครามานสเปกโทรสโกปีสามารถตรวจวัดได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยไม่ต้องมีวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก สามารถวิเคราะห์ได้แม้ตัวอย่างมีปริมาณน้อยในระดับถึง พิโคลิตรหรือเฟมโตลิตรได้ สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งของแข็ง ของเหลว หรือแก๊ส อีกทั้งตัวอย่างนั้นไม่ ถูกทำลายในระหว่างวิเคราะห์อีกด้วย สเปกตรัมรามานแสดงสัญญาณที่มีความจำเพาะสูงซึ่งลักษณะ จำเพาะนี้เป็นประโยชน์มากในการจำแนกสารผสมต่างๆ กล่าวคือรามานสเปกโทรสโกปีมีความ เหมาะสมในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความหลากหลายและไม่เป็นระเบียบ นอกจากนี้รามาน สเปกโทรสโกปียังแสดงการรบกวนจากน้ำน้อย ซึ่งเทคนิคอื่นส่วนใหญ่มักถูกรบกวนได้ และมีการ ออกแบบให้ใช้ซอฟต์แวร์ขั้นสูงในการวิเคราะห์อีกด้วยการนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์เซลล์ แบคทีเรีย นั้น สเปกตรัมรามานที่เกิดขึ้นจากเซลล์โดยตรง โดยไม่มีการเคลือบผิวเซลล์หรือการแทนที่ น้ำในเซลล์ด้วยสารอื่น ดังนั้นเทคนิครามานสเปกโทรสโกปีจึงมีความเหมาะสมในการใช้วิเคราะห์ ตัวอย่างได้อย่างหลากหลาย (Cantarero, 2015)

2.5.2 หลักการทำงานของรามานสเปกโทรสโกปี

รามานสเปกโทรสโกปีเป็นเทคนิคที่เกิดจากการส่องผ่านลำแสงเลเซอร์ (Laser beam) ที่มีความเข้มแสงสูงชนิดโมโนโครมาติก (monochromatic) ไปยังวัตถุตัวอย่าง แสงส่วนใหญ่ผ่านทะลุไปได้ แสงส่วนน้อยจะตกกระทบบนวัตถุตัวอย่าง ซึ่งวัตถุจะดูดกลืนพลังงานเข้าไป ส่งผลทำให้อะตอม ภายในโมเลกุลของวัตถุนั้นเกิดการสั่นและชนกัน ทำให้การไหลเวียนเปลี่ยนแปลงไป อิเล็กตรอน ภายในเกิดการเปลี่ยนระดับชั้นพลังงาน ทำให้โฟตอนกระเจิงออกทุกทิศทางโดยมีการกระเจิง 2 รูปแบบ (รูปที่ 2.26) (Bumbrah และ Sharma, 2015) ได้แก่

1) การกระเจิงแบบยืดหยุ่น

การกระเจิงแบบนี้ โฟตอนที่กระเจิงจะมีความยาวคลื่นเท่าเดิม กล่าวคือ โฟตอนที่กระเจิงมีความยาวคลื่นเดียวกันกับความยาวคลื่นที่ตกกระทบ โดยอิเล็กตรอนมีพลังงานสุดท้ายเท่าเดิม ซึ่งเรียกการกระเจิงรูปแบบนี้ว่า การกระเจิงแบบเรเลห์ (Rayleigh scattering)

2) การกระเจิงแบบไม่ยืดหยุ่น

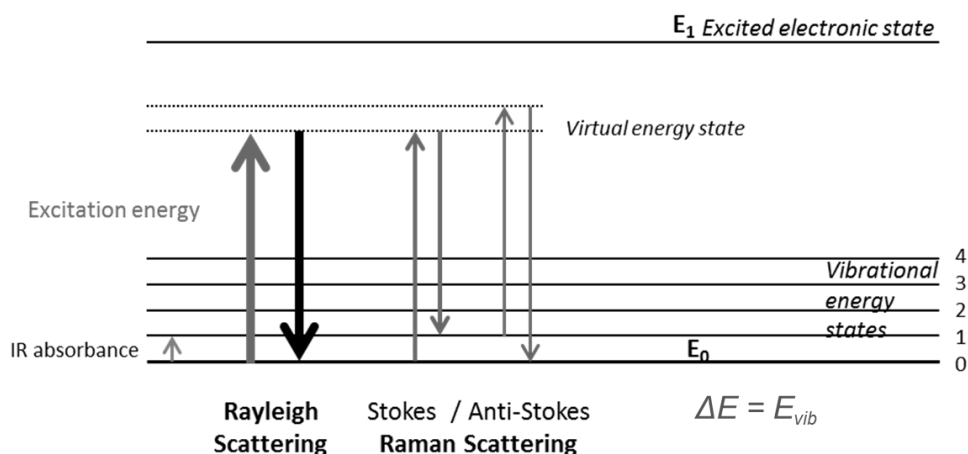
การกระเจิงแบบนี้เกิดขึ้นจากโฟตอนเพียง 1 ใน 10^7 เท่านั้น โดยโฟตอนที่กระเจิงจะมีความยาวคลื่นเปลี่ยนไป ซึ่งเรียกการกระเจิงรูปแบบนี้ว่า การกระเจิงแบบรามาน (Raman scattering) ซึ่งมี 2 แบบ ได้แก่

2.1) Stokes scattering

โฟตอนที่กระเจิงมีความยาวคลื่นมากกว่าความยาวคลื่นที่ตกกระทบโดยอิเล็กตรอนมีพลังงานสุดท้ายสูงขึ้น

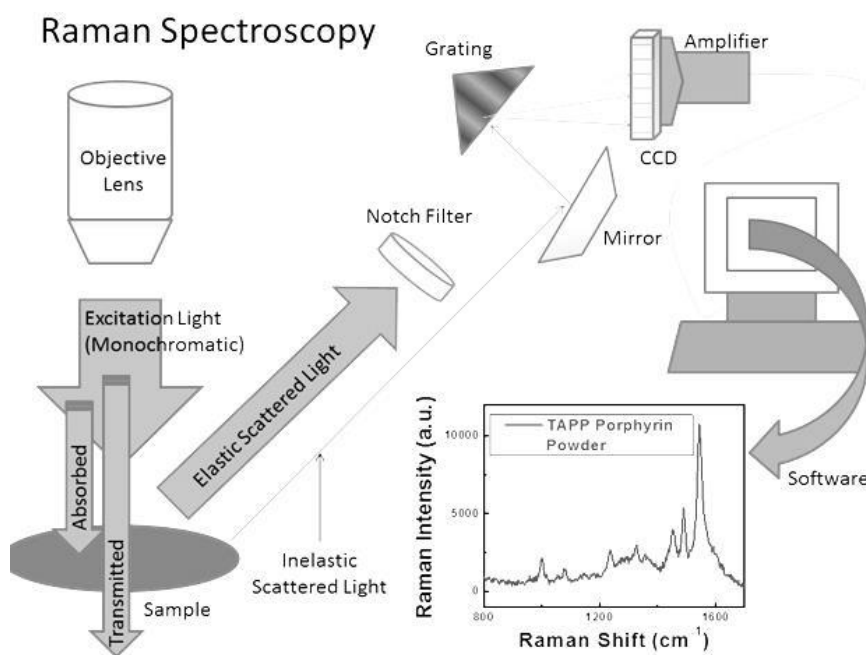
2.1) anti-Stokes scattering

โฟตอนที่กระเจิงมีความยาวคลื่นน้อยกว่าความยาวคลื่นที่ตกกระทบโดยอิเล็กตรอนมีพลังงานสุดท้ายน้อยลง



รูปที่ 2.26 แสดงรูปแบบการกระเจิงแสงแบบยืดหยุ่นและไม่ยืดหยุ่นของรามานสเปกโทรสโกปี (<http://www.surfgroup.be/raman>)

ในเทคนิครามานสเปกโทรสโกปีนั้นเป็นการตรวจวัดค่ารามานชิฟต์ซึ่งสัมพันธ์กับการโพลาไรเซชันที่เปลี่ยนแปลงไปโดยเกิดจากการกระเจิงแสงแบบไม่ยืดหยุ่นหรือการกระเจิงแสงแบบรามาน โดยโฟตอนที่กระเจิงจากการที่วัตถุรับแสงเลเซอร์นั้นจะถูกบังคับผ่านเลนส์ส่งให้ตัวรับสัญญาณนำไปวิเคราะห์และแปลงสัญญาณออกมาในรูปแบบสเปกตรัมและแสดงบนจอภาพ (Bumrah และ Sharma, 2015) ดังแสดงในรูปที่ 2.27



รูปที่ 2.27 แสดงการจำลองหลักการทำงานของเครื่องรามานสเปกโทรมิเตอร์ (https://www3.nd.edu/~kamatlab/facilities_spectroscopy.html)

การวิเคราะห์ด้วยเครื่องรามานสเปกโทรมิเตอร์ส่วนที่สำคัญคือ เครื่องนั้นสามารถวัดแสงที่กระเจิงได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งโดยปกติแล้วแสงจะมีความเข้มน้อย เมื่อวัตถุตัวอย่างเกิดกระเจิงจึงมีค่าน้อยด้วยส่งผลให้ตรวจวัดได้ยาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้แหล่งกำเนิดแสงที่ให้ความเข้มสูง (Bumrah และ Sharma, 2015)

2.5.3 การถ่ายภาพด้วยรามานสเปกโทรสโกปี

การถ่ายภาพด้วยรามานสเปกโทรสโกปี (Raman imaging) หรือเรียกอีกอย่างว่า Raman mapping เป็นการศึกษาข้อมูลวัตถุตัวอย่างทั้ง รูปร่างลักษณะ ตำแหน่งที่อยู่ ปริมาณ และการกระจายตัวของสาร โดยการนำสเปกตรัมรามานชิฟต์ที่เป็นเอกลักษณ์ของแต่ละโมเลกุลซึ่งเปรียบเสมือนลายนิ้วมือนำมาแทนเป็นสี โดยแต่ละสีแสดงถึงแต่ละโมเลกุล เทคนิคนี้สามารถนำไป

ประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ได้อย่างมาก ทั้งในการศึกษาส่วนประกอบภายในเซลล์แบคทีเรีย ตำแหน่งโมเลกุลในเนื้อเยื่อ การจำแนกประเภทเซลล์มะเร็งในอวัยวะต่างๆ นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์ได้แบบเรียล-ไทม์ได้อีกด้วย (Zhang และคณะ, 2010)

2.5.4 การขยายสัญญาณรามาน

การนำเทคนิครามานสเปกโทรสโกปีมาประยุกต์ใช้ในทางชีวภาพนั้น ยังคงมีข้อจำกัดเนื่องจากโมเลกุลบางโมเลกุลให้สัญญาณรามานที่น้อย สเปกตรัมที่ได้ไม่มีความชัดเจนเพียงพอ การขยายสัญญาณรามานมีหลากหลายวิธี ซึ่งในปัจจุบันมีการพัฒนาเพื่อใช้ในทางชีววิทยา โดยมีวิธีดังนี้ (Zhang และคณะ, 2010)

1) Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy, CARS

เป็นเทคนิคหนึ่งที่ไม่มีการใช้สารติดฉลาก (label) ทำโดยส่งโฟตอนหลายโฟตอน (multiple photons) ที่ความยาวคลื่นเดียวกันไปกระตุ้นการสั่นของโมเลกุลในวัตถุตัวอย่าง เมื่อโฟตอนหลายโฟตอนเกิดการชนกับโมเลกุลอย่างต่อเนื่อง โมเลกุลจะปล่อยคลื่นออกมาและเกิดเป็นสัญญาณรามานที่เพิ่มมากขึ้นกระบวนการนี้ทำให้เกิดรังสีที่ต่อเนื่องเพิ่มขึ้น เกิดจากความถี่ที่แตกต่างกันระหว่างพัลส์ของเลเซอร์ (Laser pulse) ที่เท่ากับกับความถี่รามานของพันธะเคมีในสารที่เราสนใจ ถึงแม้ว่าเทคนิค CARS จะทำให้ได้ขนาดของคลื่นหลายๆ อันดับที่ชัดเจนมากกว่าเทคนิคปกติ แต่โดยรวมแล้วความไวของเทคนิคนี้ยังคงน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่นๆ ดังนั้นเทคนิค CARS จึงมักนิยมนำมาใช้อย่างมากในการตรวจสอบสารในเนื้อเยื่อชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจสอบสารจำพวกไขมันที่มีหมู่ CH_2 ในปริมาณมาก มีการนำเทคนิคนี้มาใช้ในการถ่ายภาพการชนถ่ายออร์แกนเนลภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยการศึกษาเชิงปริมาณของมวลไขมันภายในเซลล์ ทำให้สามารถวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์และไขมันอิสระได้ นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ในการถ่ายภาพการแบ่งเซลล์ของเซลล์ต้นกำเนิดของตัวอ่อนมนุษย์ซึ่งสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีภายในเซลล์ที่มีความสัมพันธ์กันกับองค์ประกอบภายในเซลล์ เช่น นิวเคลียส, โซโทพลาซึม และเยื่อหุ้มเซลล์ เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่เพิ่งถูกพัฒนาขึ้นเพื่อตรวจวัดพันธะไฮโดรคาร์บอน ซึ่งข้อมูลที่ได้นั้นละเอียดกว่าการใช้กล้องจุลทรรศน์ มีความจำเพาะและรวดเร็ว ใช้เวลาในการกราดวิเคราะห์น้อย ซึ่งคาดว่าในอนาคตสามารถพัฒนาถ่ายภาพได้อย่างกว้างขวางมากยิ่งขึ้น

2) Single-walled carbon nanotubes, SWNTS

คาร์บอนนาโนทิวบ์ชั้นเดียว (Single-walled carbon nanotubes, SWNTS) เป็นสารที่ให้สัญญาณรามานที่พีก 1593 cm^{-1} ซึ่งเกิดจากการจับคู่ของอิเล็กตรอนและโฟตอนที่แข็งแรง ทำให้เกิดการสั่นเป็นวง และให้สัญญาณรามานที่ชัดเจนจากสัญญาณพื้นหลัง การนำมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มสัญญาณรามานนั้นมีการศึกษาการกระจายตัวของสารชีวโมเลกุล เช่น ในเซลล์มะเร็งของหนูเมาส์โดยการตรวจหาเป้าหมายและตำแหน่งของ SWNTS ที่จับอยู่กับอาร์จินีน-ไกลซีน-กรดแอสปาทิก (RGD) ภายในเซลล์เมื่อผ่านไป 3 วัน พบว่า เซลล์มะเร็งมีการสะสมของ SWNTS-RGD การทดลองนี้ให้การสนับสนุนเป็นอย่างดีในการพัฒนาการถ่ายภาพด้วยรามานสเปกโทรสโกปีเพื่อนำไปเป็นวิธีใหม่ในการระบุโรคและรักษาในผู้ป่วยมะเร็ง

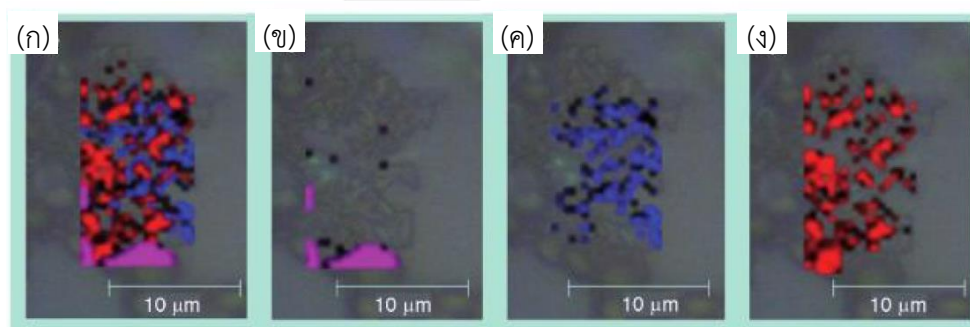
3) Surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS

เป็นการเพิ่มสัญญาณรามานที่อาศัยปรากฏการณ์เชิงแสงที่มีชื่อว่าเซอร์เฟสพลาสมอนเรโซแนนซ์ (surface plasmon resonance) ซึ่งเป็นปรากฏการณ์เกี่ยวกับคลื่นความหนาแน่นของประจุที่เกิดจากการสั่นของอิเล็กตรอนอิสระ ที่มีลักษณะการสั่นพร้อมเพรียงกัน โดยเกิดขึ้นที่ผิวรอบๆ อนุภาคโลหะนาโนที่สัมผัสกับสารไดอิเล็กตริก เช่น ระหว่างทองหรือเงิน กับ น้ำหรืออากาศ ซึ่งโมเลกุลของวัตถุที่ต้องการศึกษานั้นจะถูกดูดซับบนพื้นผิวขรุขระของโลหะ ส่งผลให้สัญญาณรามานมีความเข้มสูง เนื่องจากมีสนามไฟฟ้าเพิ่มขึ้นโดยทั่วไปแล้วเทคนิค SERS จะใช้อนุภาคนาโนทองคำกับสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ เช่น Cy3, Cy5 และโรดามีน (rhodamine) ซึ่งเทคนิคนี้สามารถเพิ่มความเข้มของสัญญาณรามานได้ถึง 10^{14} - 10^{15} เท่า มีการนำมาใช้ในการทดลองตรวจวัดโพลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ห่อหุ้มแอลคิลไทออลในการตรวจจับดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยการใช้อนุภาคนาโนทองคำร่วมกับสาร Cy3 ซึ่งเป็นอนุภาคนาโนทองคำที่จับอยู่กับโปรตีน แล้วโปรตีนเข้าไปทำงานในเซลล์นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์นำอนุภาคนาโนทองคำใช้ในการศึกษาเซลล์มะเร็ง โดยตรวจติดตามด้วยเทคนิครามานสเปกโทรสโกปีร่วมกับการเอกซเรย์ในการรักษามะเร็งอีกด้วย

2.5.5 การประยุกต์ใช้รามานสเปกโทรสโกปี

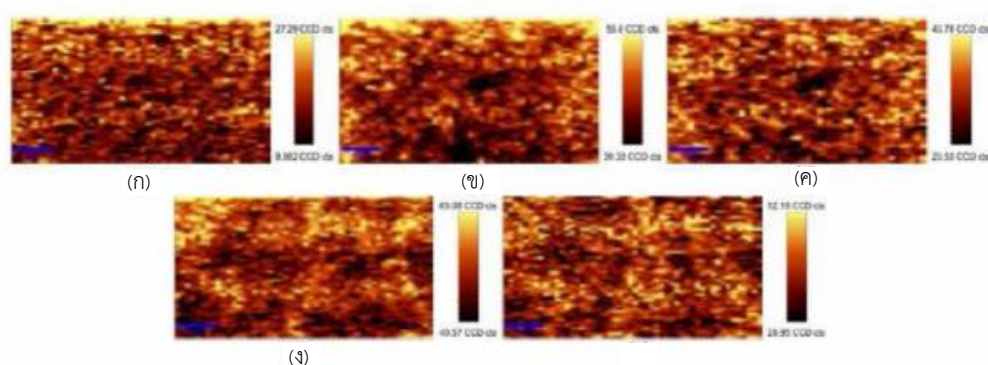
เนื่องจากเทคนิครามานสเปกโทรสโกปีเป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพอีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์สารได้หลากหลายทั้งสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และชีวโมเลกุล โดยผลที่ได้นั้นได้เป็นสัญญาณรามานที่เป็นเอกลักษณ์ มีรูปแบบจำเพาะ ซึ่งสามารถใช้หลักการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเพื่อการพิสูจน์ตรวจสอบชนิดของสารและหาหมู่ฟังก์ชันของโมเลกุลได้ ในทางชีววิทยานี้การนำเทคนิคนี้ยังคงเป็นเทคนิคใหม่ที่กำลังเป็นที่นิยมและพัฒนากันอย่างแพร่หลาย

ปัจจุบันมีการนำเทคนิครามานสเปกโทรสโกปีไปประยุกต์ใช้ในการศึกษารูปร่างลักษณะตำแหน่งของสารภายในเซลล์ ปริมาณสารที่เซลล์ผลิต รวมไปถึงการระบุชนิดของแบคทีเรียอีกด้วย ดังเช่น Ashton และคณะ ปี ค.ศ. 2011 ได้รายงานการนำเทคนิครามานสเปกโทรสโกปีไปประยุกต์ใช้ในการระบุสายพันธุ์แบคทีเรียโดยการเลี้ยงแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ร่วมกันคือ *Bacillus subtilis* (น้ำเงิน), *Staphylococcus epidermidis* (แดง) และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (ชมพู) ดังแสดงในรูปที่ 2.28 จากภาพเห็นได้ชัดว่าเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบตำแหน่งการกระจายตัวของจุลินทรีย์และสามารถระบุชนิดของจุลินทรีย์ได้อีกด้วยโดยไม่ต้องมีการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่น



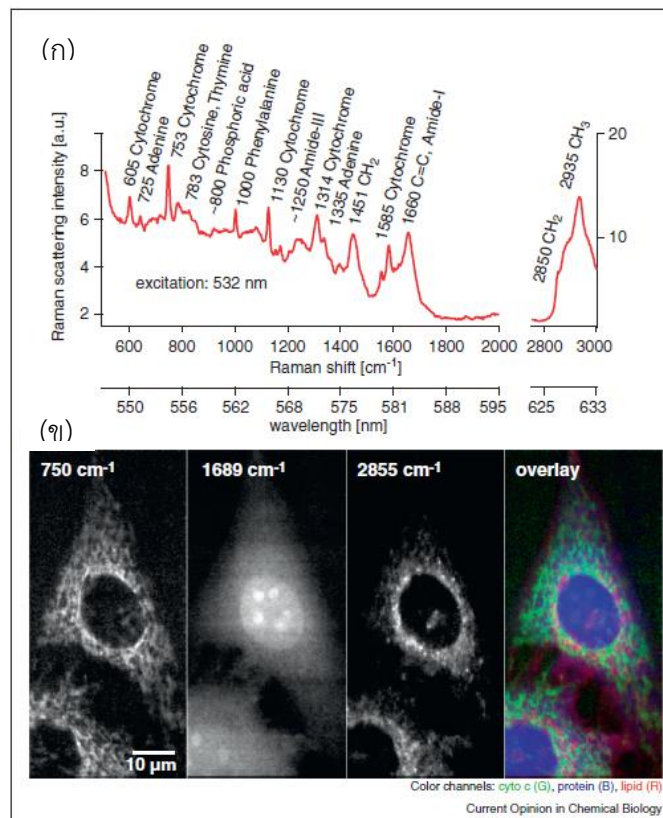
รูปที่ 2.28 ภาพถ่ายรามานของ *Bacillus subtilis* (น้ำเงิน) และ *Staphylococcus epidermidis* (แดง) และ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (ชมพู) ด้วยระบบคอนโฟคัลรามาน (Confocal Raman) ใช้เลเซอร์ที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตรโดย (ก) แสดงตำแหน่งของเชื้อผสม และ (ข-ง) แสดงตำแหน่งของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ (Ashton และคณะ, 2011)

Lu และคณะ (2011) ได้ศึกษาประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญต่อ *Listeria monocytogenes* และ *E. coli* O157:H7 ของกระเทียมสกัดเข้มข้นและไดแอลลิซัลไฟด์ด้วยเทคนิค Fourier transform Infrared (FT-IR), การใช้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) เทคนิครามาน สเปกโทรสโกปีรวมถึงการถ่ายภาพด้วยรามาน ซึ่งเทคนิคการเพิ่มสัญญาณรามานนั้นผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค SERS โดยใช้นาโนทองคำเคลือบบนแผ่นซิลิกอน ซึ่งผลจากภาพถ่ายรามานพบว่าแบคทีเรียได้รับความเสียหายจากสารต้านการเจริญของแบคทีเรีย จากภาพสามารถนำมาคาดการณ์ประเภทและระดับความเสียหายที่เซลล์ได้รับจากทั้งกระเทียมสกัดเข้มข้นและไดแอลลิซัลไฟด์ ดังรูปที่ 2.29



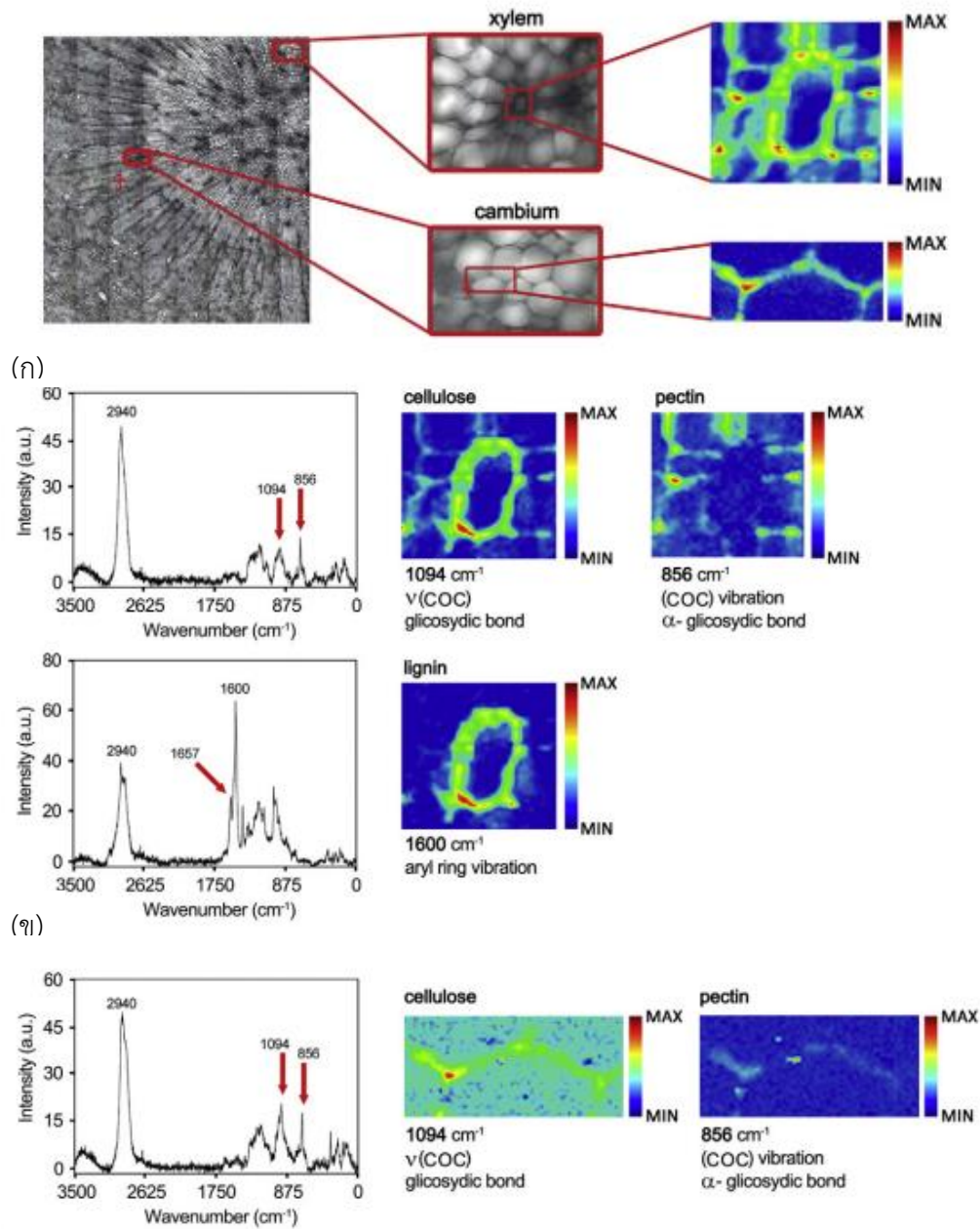
รูปที่ 2.29 ภาพถ่ายรามานของเซลล์ *E. coli* O157:H7 (ก-ค) และ *L. monocytogenes* (ง-จ) โดยเลือกความยาวคลื่นที่ (ก) 1208 cm^{-1} (ข) 1195 cm^{-1} (ค) $1525\text{-}1788\text{ cm}^{-1}$ (ง) $1206\text{-}1539\text{ cm}^{-1}$ (จ) $1535\text{-}1761\text{ cm}^{-1}$

นอกจากการนำเทคนิครามานสเปกโทรสโกปีมาใช้ในการศึกษาจุลินทรีย์แล้ว ยังมีการนำมาศึกษาในเนื้อเยื่ออีกด้วย Palonpon และคณะ (2013) รายงานถึงการนำเทคนิครามานสเปกโทรสโกปีมาใช้ในการศึกษาเซลล์ HeLa โดยการใช้เลเซอร์ที่มีความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ตรวจสอบองค์ประกอบของไซโทซอล โดยได้สามารถระบุสารได้จากพีครามานต่างๆ คือ ไซโทโครม 750 cm^{-1} โปรตีน 1689 cm^{-1} และ ไขมัน 2855 cm^{-1} ซึ่งภาพที่ได้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการใช้ศึกษาข้อมูลตำแหน่ง จำแนก และระบุสารต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์เนื้อเยื่อได้ดี ดังรูปที่ 2.30



รูปที่ 2.30 ผลจากการใช้เทคนิครามานสเปกโทรสโกปีของไซโทโครมในเซลล์เนื้อเยื่อโดยใช้ลำแสงเลเซอร์ที่มีความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร (ก) แสดงรามานพีคของสารต่างๆ และ (ข) แสดงภาพถ่ายรามานของไซโทโครม (750 cm^{-1}), โปรตีน (1689 cm^{-1}) และ ไขมัน (2855 cm^{-1})

Szymanska-Chargot และคณะ (2016) ได้ศึกษาเนื้อเยื่อกระดูกพรุนที่ตัดขวาง โดยเลือกเนื้อเยื่อที่มีหน้าที่แตกต่างกันคือ ไซเลมที่ทำหน้าที่ลำเลียงน้ำ และแคมเปียมที่ทำหน้าที่ขยายขนาดออกด้านข้าง ศึกษาตำแหน่งของสารเคมีภายในเนื้อเยื่อด้วยภาพถ่ายรามานผลที่ได้จากภาพนั้นแสดงให้เห็นถึงตำแหน่งของเซลลูโลส (1094 cm^{-1}) และเพกทิน (856 cm^{-1}) ของเนื้อเยื่อทั้งสองชนิด ส่วนลิกนิน (1600 cm^{-1}) พบเพียงในไซเลมเท่านั้นและไม่พบลิกนินในแคมเปียม ดังรูปที่ 2.31 ซึ่งอาจส่งผลถึงการทำงานที่แตกต่างกันของเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดนี้



รูปที่ 2.31 แสดงภาพถ่ายรามานของรากแครอทตัดขวาง โดยภาพเนื้อเยื่อไซเลม (ก) และแคมเบียม (ข) มีช่วงสัญญาณรามานอยู่ในช่วง 2940 cm^{-1} ซึ่งมีรามานพีคของเซลลูโลส (1094 cm^{-1}), เพกทิน (856 cm^{-1}) และลิกนิน (1600 cm^{-1})

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ รุ่น MLS3020 ของบริษัท Sanyo, ญี่ปุ่น
2. ตู้อบฆ่าเชื้อ รุ่น D06063 ของบริษัท Memmert, เยอรมัน
3. เครื่องชั่ง รุ่น PG2002-S และ AG285 ของบริษัท Mettler Toledo, สวิตเซอร์แลนด์
4. เครื่องปั่นผสม (vortex) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries , สหรัฐอเมริกา
5. ตู้บ่มเชื้อ รุ่น D06061 ของบริษัท Memmert, เยอรมัน
6. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, ไทย
7. โถดูดความชื้น
8. ไมโครปิเปตต์ รุ่น P20, P200 และ P1000 ของบริษัท Gilson, ฝรั่งเศส
9. จานเพาะเชื้อพลาสติกปราศจากเชื้อ (Sterile petridish) Greiner bio-one, ออสเตรีย
10. งานไมโครไตเตอร์ ชนิด 96 หลุมของบริษัท Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
11. งานเพาะเนื้อเยื่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตรของบริษัท Greiner bio-one (Thailand), ไทย
12. กระจกปิดสไลด์ (Cover slip) ของบริษัท Menzel-Glaser, เยอรมัน
13. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Field-Emission Scanning Electron Microscope, FE-SEM) รุ่น Versa 3D, สหรัฐอเมริกา
14. กล้องรามานสเปกโทรมิเตอร์ รุ่น NT-MDT NTEGRA spectra, รัสเซีย
15. กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (Atomic Force Microscope, AFM) ของบริษัท JPK Instruments AG, สิงคโปร์

3.2 เคมีภัณฑ์

1. เซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์ ของบริษัท Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
2. โซเดียมคลอไรด์ ของบริษัท Merck, เยอรมัน
3. ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท J.T. Baker, สหรัฐอเมริกา
4. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโตเดคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) ของบริษัท Carlo ERBA, อิตาลี
5. ไนซินของบริษัท Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา

6. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท Merck, เยอรมัน
7. พอลิแอลไลซีน (Poly-L-lysine, PLL) ของบริษัท Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา
8. อาหารเลี้ยงเชื้อทริปติกซอยบรอต (Tryptic soy broth, TSB) ของบริษัท Merck, เยอรมัน

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นชนิดเพื่อการวิเคราะห์ (Analytical grade)

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

Listeria monocytogenes DMST 17303

Escherichia coli ATCC 25922

3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.4.1 เตรียมสารออกฤทธิ์และแบคทีเรียตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

3.4.1.1 การเตรียมไนซิน

ละลายผงไนซินของบริษัท Sigma, สหรัฐอเมริกา ในกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.02 โมลาร์ โดยเตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 100,000 IU/มิลลิลิตร (1 กรัมของไนซินมีแอกทิวิตีเท่ากับ 1,168,000 IU) กรองผ่านเมมเบรน ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการใช้ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ

3.4.1.2 การเตรียมเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์

ละลายสารเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (CPC) ของบริษัท Sigma, สหรัฐอเมริกา ในน้ำกลั่นเตรียมไว้ที่ความเข้มข้น 20,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บในขวดสีชา ที่ 4 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการใช้ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ

3.4.1.3 การเตรียมแบคทีเรียตัวอย่าง

ฉีด *L. monocytogenes* DMST17303 และ *E. coli* ATCC25922 ลงบนอาหารแข็ง Tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 16-18 ชั่วโมงเขี่ยโคลนเดี่ยวย้ายลงสู่ TSA slant บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมงเก็บที่อุณหภูมิ

4 องศาเซลเซียสเพื่อเก็บเป็น Stock culture และเชื้อโคโลนีเดี่ยวย้ายลงสู่อาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) เพื่อใช้ในการทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง เจือจางจนได้ 1000 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเริ่มต้น จนได้ความเข้มข้นของเชื้อสุดท้ายประมาณ 10^5 - 10^6 CFU/มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดลองต่อไปซึ่งเป็นปริมาณที่เหมาะสมในการจำลองปริมาณเชื้อปนเปื้อนในอาหาร

3.4.2 การหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทำงานของไนซิน เซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ และการทำงานร่วมกันของไนซินและเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์

ขั้นตอนนี้หาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม (Minimum inhibitory concentration; MIC) ทำโดยการเติมไนซินหรือ CPC หรือไนซิน-CPC ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในงานไมโครไตเตอร์ ชนิด 96 หลุม ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายดัง ตารางที่ 3.1 จากนั้นเติม *L. monocytogenes* DMST17303 หรือ *E. coli* ATCC25922 ซึ่งอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB ที่มี 10^5 - 10^6 CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (อัตราส่วนปริมาตรของสารออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียเป็น 1:1) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดความขุ่นที่ 450 นาโนเมตร (OD_{450}) ทุก 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 2 วัน เลือกค่าความเข้มข้นสุดท้ายที่ให้ค่าความขุ่นคงที่ เป็นค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมหรือ MIC ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองชนิด นำค่าความเข้มข้นนี้ใช้ในการทดลองถัดไป

ตารางที่ 3.1 ความเข้มข้นสุดท้ายของสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ทดลองเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม

แบคทีเรียที่ใช้ทดลอง	ความเข้มข้นสุดท้าย (ต่อไมโครลิตร)			
	เมื่อไม่ใช้ร่วมกัน		เมื่อใช้ร่วมกัน (ไนซิน-CPC)	
	ไนซิน (IU)	CPC (ไมโครกรัม)	ไนซิน (IU)	CPC (ไมโครกรัม)
<i>L. monocytogenes</i>	62.5-250	0.375-12.5	62.5-250	0.375-12.5
<i>E. coli</i>	5,000-30,000	0.75-12.5	5,000-30,000	0.75-12.5

3.4.3 ศึกษารูปร่างภายนอกที่เปลี่ยนไปของเซลล์จากการออกฤทธิ์ร่วมกันที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (FE-SEM)

นำเซลล์แขวนลอยที่มีโนซิน, CPC หรือ โนซิน-CPC ความเข้มข้น MIC ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่ผ่านการบ่มนาน 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มากรองผ่านเมมเบรนพอลิคาร์บอเนต ขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นนำเมมเบรนที่มีเซลล์สะสมอยู่มาตรึงเซลล์ด้วยสารละลาย กลูตาราลดีไฮด์ 2.5% ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.2 นาน 1-2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์นาน 5 นาที สองครั้งและล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ต่อมาทำให้แห้งโดยใช้สารละลายเอทานอลความเข้มข้นสูงขึ้นเป็นลำดับนาน 5 นาที (50%, 70%, 95% และ 100%) จากนั้นนำตัวอย่างเข้าเครื่อง critical point dryer เพื่อดึงน้ำออกและแทนที่น้ำด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลว เพื่อคงสภาพเซลล์ไว้ วางตัวอย่างบนแผ่นอลูมิเนียมและพันด้วยทอง แล้วส่องภายใต้กล้อง FE-SEM โดยใช้ศักย์เร่งอิเล็กตรอนที่ 10 กิโลโวลต์ กำลังขยาย 10,000, 30,000 และ 100,000 เท่า

3.4.4 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายนอกของเซลล์ที่มีชีวิตอย่างละเอียดขณะเซลล์ยังมีชีวิตภายใต้ กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM)

นำสารพอลิแอลไลซีน (Poly-L-lysine; PLL) หยดลงบน cover glass ทำให้แห้งโดยใช้ โถดูดความชื้นได้เป็นสไลด์ PLL จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยที่มีโนซิน หรือ CPC หรือทั้งโนซิน-CPC ที่ผ่านการบ่มนาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm นาน 5 นาที หยดเซลล์แขวนลอยลงบนสไลด์ PLL ทิ้งไว้ให้แห้งโดยใช้เวลาน้อยกว่า 1 นาทีล้างเซลล์ที่ไม่ยึดติดกับพื้นผิว PLL ออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ ตัวอย่างยึดติดกับจานเพาะเชื้อเยื่อ และเทสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้ท่วมตัวอย่าง ส่อง ภายใต้กล้อง AFM โดยใช้เทคนิค AFM แบบ Quality contact mode ที่อุณหภูมิห้อง คานติด คงที่ 0.12 N/m ทิปเป็น Si_3N_4 รัศมีความโค้งขนาดประมาณ 10 นาโนเมตร ตรวจวัดค่าโดยใช้ โปรแกรม JPK processor

3.4.5 ศึกษาตำแหน่งการทำงานของสารออกฤทธิ์ภายใต้กล้องรามานสเปกโตรมิเตอร์ (Raman spectrometer)

นำเซลล์แขวนลอยที่มีโนซินหรือ CPC หรือโนซิน-CPC ความเข้มข้น MIC ที่ผ่านการบ่มนาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm นาน 5 นาที นำตะกอนเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง และหยดลงบนแผ่นเคลือบซิลเวอร์ ซึ่งใช้เป็นสารที่ช่วยเพิ่มสัญญาณรามาน จากนั้นทำให้แห้งด้วยตู้ดูดความชื้นประมาณ 10-15 นาที และส่องภายใต้กล้องรามานสเปกโตรมิเตอร์ โดยใช้ลำแสง 532 นาโนเมตร สังเกตและวัดสเปกตรัมที่เกิดขึ้น จากนั้นนำมาทำแผนที่รามาน (Raman mapping) ด้วยโปรแกรม NOVA ก่อให้เกิดรูปซึ่งแสดงตำแหน่งการทำงานของสารออกฤทธิ์ได้

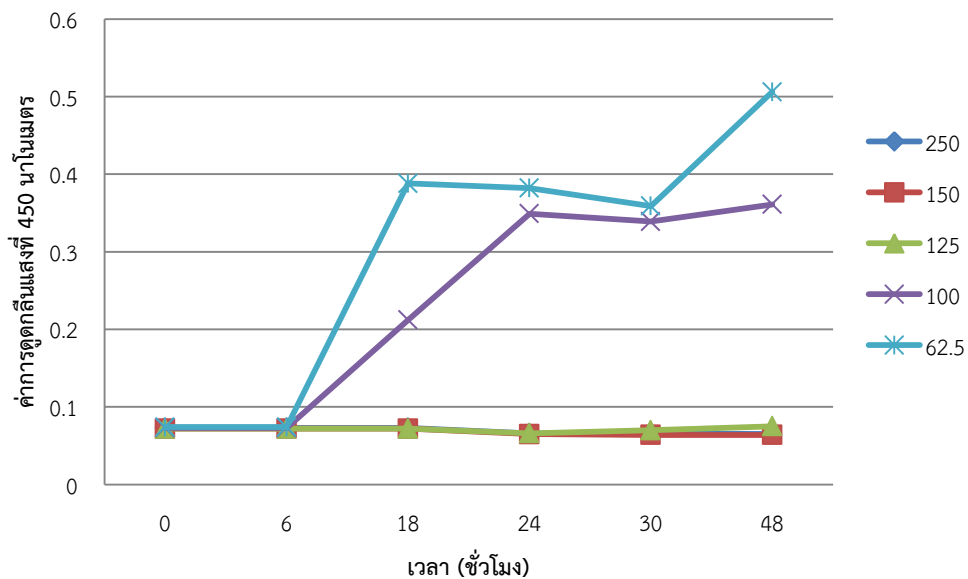


บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

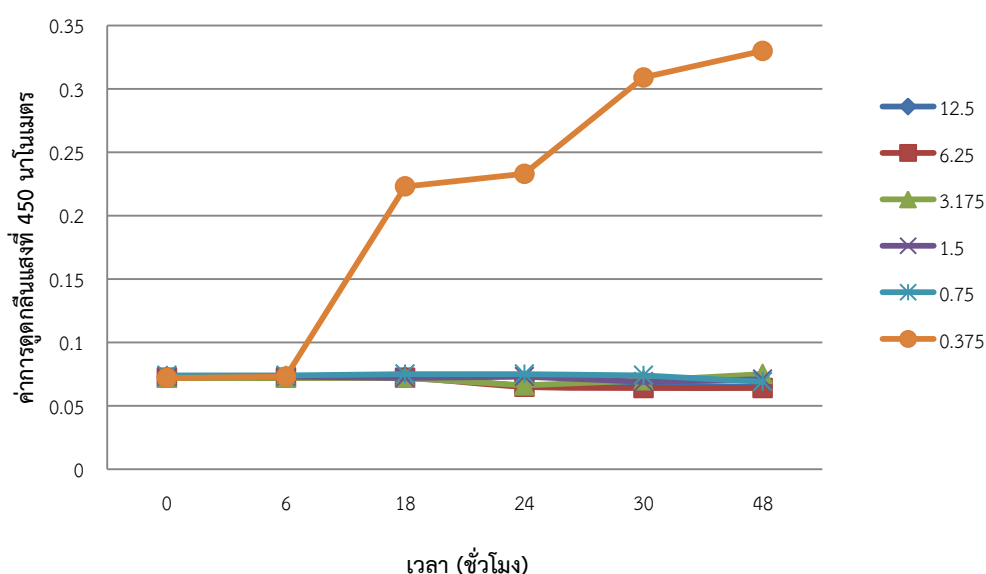
4.1 การหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทำงานของไนซิน เซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ และการทำงานร่วมกันของไนซินและเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์

ผลจากการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสม (MIC) ของไนซิน, CPC และไนซิน-CPC แสดงเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ซึ่งแสดงให้เห็นถึงปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตในระยะเวลาต่างๆ โดยผลการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ด้วยไนซินที่ความเข้มข้น 62.5-250 IU/มิลลิลิตร แสดงดังรูปที่ 4.1 โดยผลจากกราฟพบว่าที่ความเข้มข้นไนซินสูงตั้งแต่ 125, 150 และ 250 IU/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ได้ตลอด 48 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้นไนซิน 62.5 และ 100 IU/มิลลิลิตร *L. monocytogenes* สามารถรอดชีวิตได้ ซึ่งมีการเจริญที่สามารถเห็นชัดเจนในชั่วโมงที่ 18 ดังนั้นค่า MIC ของไนซินซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* คือ 125 IU/มิลลิลิตร



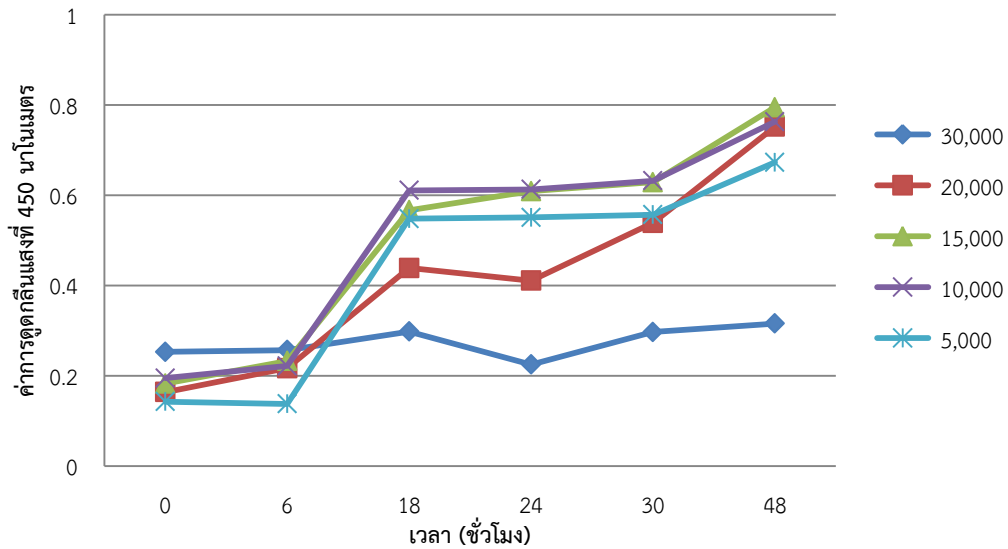
รูปที่ 4.1 การยับยั้ง *L. monocytogenes* ของไนซินที่ความเข้มข้น 62.5-250 IU/มิลลิลิตรในระยะเวลาต่างๆ

ผลจากยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ด้วย CPC ที่ความเข้มข้น 0.375-12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แสดงดังรูปที่ 4.2 จากกราฟพบว่าที่ความเข้มข้น CPC ตั้งแต่ 0.75-12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ตลอด 48 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้น CPC ที่ 0.375 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร *L. monocytogenes* สามารถเจริญได้ ซึ่งเห็นชัดเจนในชั่วโมงที่ 18 ดังนั้นค่า MIC ของ CPC ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* คือ 0.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



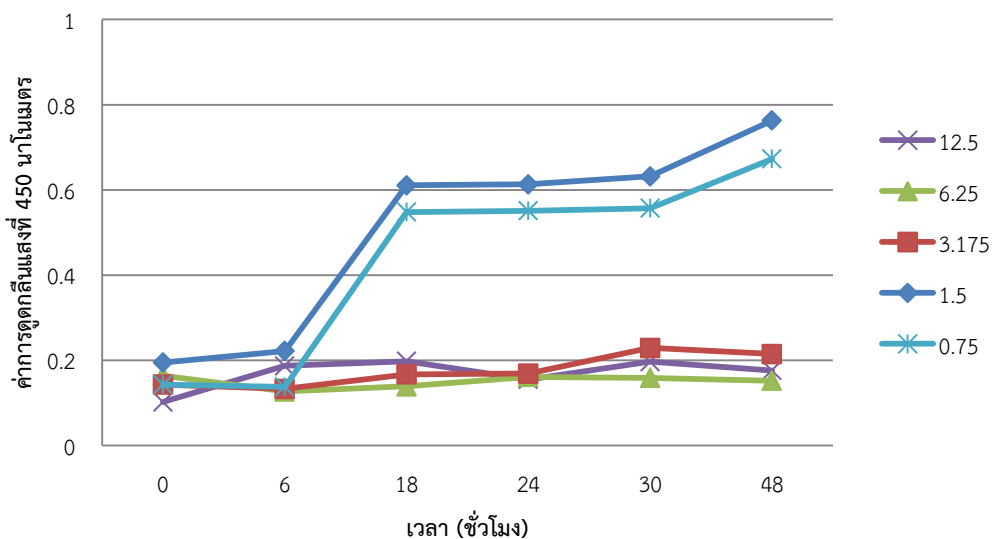
รูปที่ 4.2 การยับยั้ง *L. monocytogenes* ของ CPC ที่ความเข้มข้น 0.375-12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในระยะเวลาต่างๆ

ผลจากยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ด้วย CPC ที่ความเข้มข้น 5,000-30,000 IU/มิลลิลิตร แสดงดังรูปที่ 4.3 โดยผลจากกราฟพบว่าที่ความเข้มข้นไนซิน 30,000 IU/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ตลอด 48 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้นไนซินน้อยตั้งแต่ 5,000-20,000 IU/มิลลิลิตร *E. coli* สามารถรอดชีวิตได้ ซึ่งเห็นชัดเจนในชั่วโมงที่ 18 ดังนั้นค่า MIC ของไนซินซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* คือ 30,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



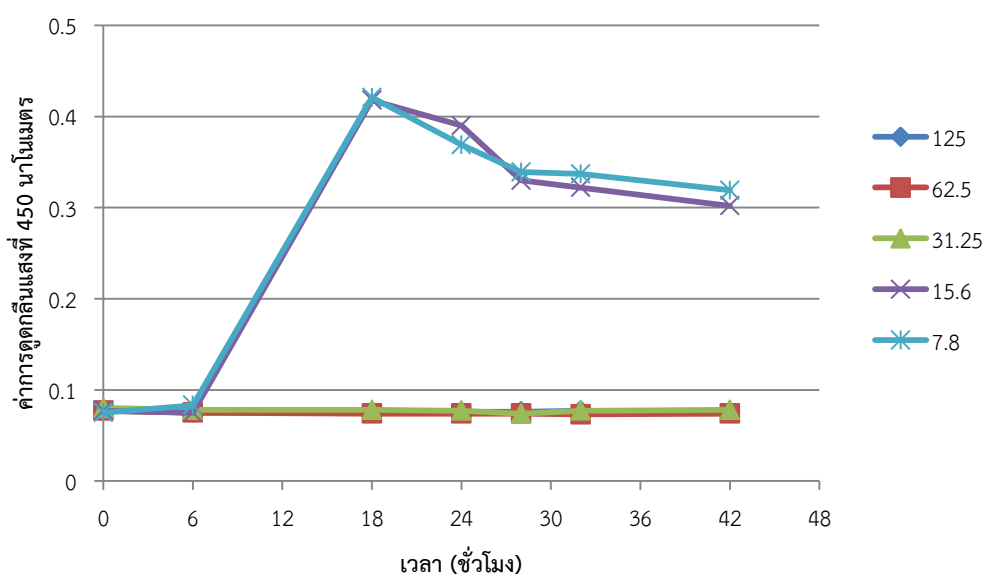
รูปที่ 4.3 การยับยั้ง *E. coli* ของไนซินที่ความเข้มข้น 5,000-30,000 IU/มิลลิลิตรในระยะเวลาดังกล่าว

ผลจากการศึกษาการเจริญของ *E. coli* ด้วย CPC ที่ความเข้มข้น 0.75-12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แสดงดังรูปที่ 4.4 โดยจากกราฟพบว่าที่ความเข้มข้น CPC ตั้งแต่ 3.175-12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ตลอด 48 ชั่วโมง ในขณะที่ความเข้มข้น CPC ที่ 0.75 และ 1.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร *E. coli* สามารถเจริญได้ ซึ่งเห็นชัดเจนในชั่วโมงที่ 18 ดังนั้นค่า MIC ของ CPC ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* คือ 3.175 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



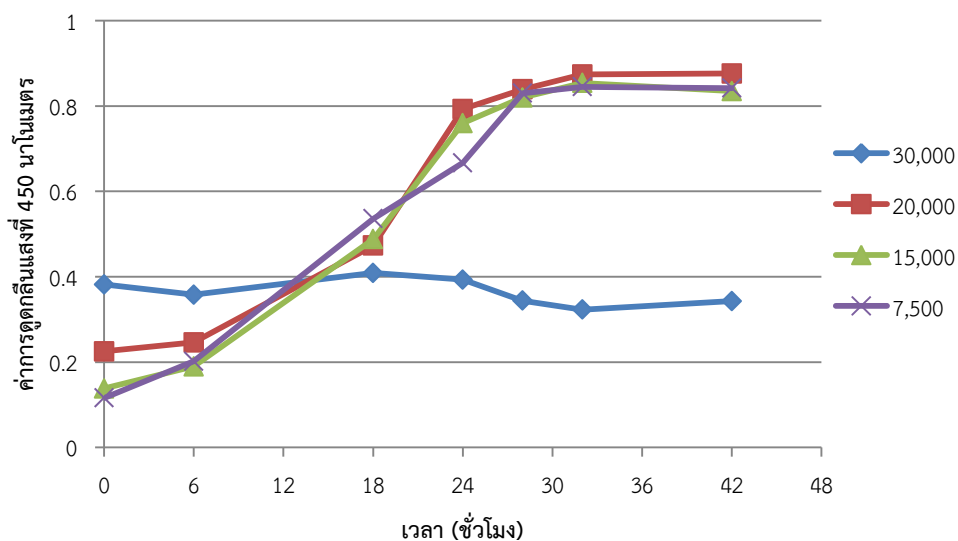
รูปที่ 4.4 การยับยั้ง *E. coli* ของ CPC ที่ความเข้มข้น 0.75-12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในระยะเวลาดังกล่าว

จากการศึกษาหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ด้วยไนซิน-CPC โดยการใช้ CPC ที่ความเข้มข้น MIC คือ 0.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และไนซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในระยะเวลา 42 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.5 พบว่าในการใช้ CPC ที่ MIC ร่วมกับไนซินที่ความเข้มข้น 31.25-125 IU/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ได้ตลอด 42 ชั่วโมง ในขณะที่การใช้ CPC ที่ MIC ร่วมกับไนซินที่ความเข้มข้น ที่ 7.8 และ 156 IU/มิลลิลิตร *L. monocytogenes* สามารถมีชีวิตรอดได้ ซึ่งเห็นชัดเจนในชั่วโมงที่ 18 จึงแสดงให้เห็นว่าการใช้ CPC ร่วมกับไนซินในการยับยั้ง *L. monocytogenes* สามารถลดปริมาณการใช้ไนซินลงเป็น 31.25 IU/มิลลิลิตร



รูปที่ 4.5 การยับยั้ง *L. monocytogenes* ของ CPC ที่ความเข้มข้น 0.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กับไนซินที่ ความเข้มข้น 7.8-125 IU/มิลลิลิตร ในระยะเวลาต่างๆ

จากการศึกษาหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้ง *E. coli* ด้วยไนซิน-CPC โดยการใช้ CPC ที่ความเข้มข้น MIC คือ 3.175 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และไนซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในระยะเวลา 42 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.6 พบว่าในการใช้ CPC ที่ MIC ร่วมกับไนซินที่ความเข้มข้น 30,000 IU/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ตลอด 42 ชั่วโมง ในขณะที่การใช้ CPC ร่วมกับไนซินที่ความเข้มข้นที่ 7,500-30,000 IU/มิลลิลิตร *E. coli* สามารถมีชีวิตรอดได้ ซึ่งเห็นชัดเจนในชั่วโมงที่ 24 จึงแสดงให้เห็นว่าการใช้ CPC ร่วมกับไนซินในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ไม่สามารถลดปริมาณการใช้ไนซินได้



รูปที่ 4.6 การยับยั้ง *E. coli* ของ CPC ที่ความเข้มข้น 3.175 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กับไนซินที่ความเข้มข้น 7,500-30,000 IU/มิลลิลิตร ในระยะเวลาต่างๆ

การศึกษาการทำงานร่วมกันของไนซินและ CPC ทำโดยหาความสัมพันธ์จากการนำค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบซึ่งได้จากการทดลองก่อนหน้ามาคำนวณหาค่าดัชนี FIC (fractional inhibition index, FIC) (Meletiadis และคณะ, 2010) เพื่อวิเคราะห์ลักษณะการทำงานร่วมกันของสารสองชนิด โดยคำนวณจากสมการ

$$FIC = ([A] / MIC_A) + ([B] / MIC_B)$$

เมื่อ [A] และ [B] แทนค่า ด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของไนซินและ CPC เมื่อทำงานร่วมกันตามลำดับ ขณะที่ ค่า MIC_A และ MIC_B แทนค่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบของไนซินและ CPC เมื่อทำงานแยกกันอย่างอิสระ นำค่าดัชนี FIC ที่ได้จากสมการไปเปรียบเทียบกับค่าดัชนี FIC มาตรฐานดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ดัชนี FIC มาตรฐาน และการแปลผลเพื่ออธิบายลักษณะของการทำงานร่วมกันของสาร

ค่า FIC	ผลของการทำงานร่วมกัน
<0.5	มีการเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกัน (synergy)
>0.5 แต่ <0.75	มีการเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกันบางส่วน (partial synergy)
>0.75 แต่ <1.0	มีการเพิ่มฤทธิ์แบบบวกเพิ่ม (additive effect)
>1.0 แต่ <4.0	ไม่มีความแตกต่างระหว่างการทำงานเชิงเดี่ยวหรือทำงานร่วมกัน (indifference)
>4.0	มีการต่อต้านซึ่งกันและกัน (antagonism)

ผลจากการคำนวณค่าดัชนี FIC จากค่าความเข้มข้นต่ำสุดของไนซินและ CPC ในการทำงานร่วมกันเพื่อยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* และ *E. coli* พบว่าให้ดัชนี FIC เท่ากับ 1.25 และ 2.00 ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองค่ามีค่าอยู่ในช่วง >1.0 แต่ <4.0 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไนซินและ CPC ไม่มีความแตกต่างระหว่างการทำงานเชิงเดี่ยวหรือทำงานร่วมกัน (indifference) ในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* และ *E. coli* โดยผลจากการทดลองที่ให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบและค่าดัชนี FIC ของการทำงานร่วมกันของไนซินและ CPC แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบและค่าดัชนี FIC ของการทำงานร่วมกันของไนซินและ CPC

แบคทีเรียที่ใช้ทดลอง	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งของสารที่ใช้ในการทดสอบ				ดัชนี FIC
	เมื่อทำงานเชิงเดี่ยว		เมื่อทำงานร่วมกัน		
	ไนซิน (IU ต่อ มิลลิลิตร)	CPC (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	ไนซิน (IU ต่อ มิลลิลิตร)	CPC (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	
<i>L. monocytogenes</i>	125	0.75	31.3	0.75	1.25
<i>E. coli</i>	30,000	3.175	30,000	3.175	2.00

จากผลจากการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไนซินและ CPC สามารถสรุปได้ว่า ค่า MIC ของไนซินและ CPC ต่อการออกฤทธิ์ยับยั้ง *L. monocytogenes* คือ 125 IU/มิลลิลิตร และ 0.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ค่า MIC ต่อการออกฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* คือ 30,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 3.175 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งการศึกษากการทำงานร่วมกันของไนซินและ CPC ด้วยการคำนวณค่าดัชนี FIC พบว่า ไนซินและ CPC ไม่มีความแตกต่างระหว่างการทำงานเชิงเดี่ยวหรือทำงานร่วมกัน (indifference) ในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* และ *E. coli* ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ กุลวัฒน์ศาล (2008) โดยนำค่า MIC นี้ใช้ในการทดลองถัดไป

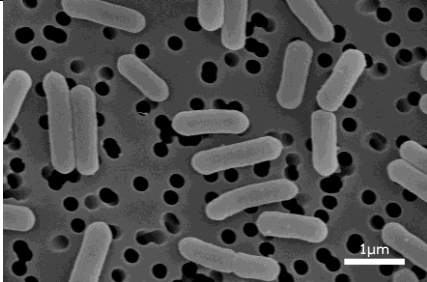
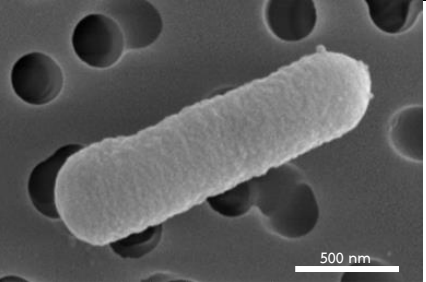
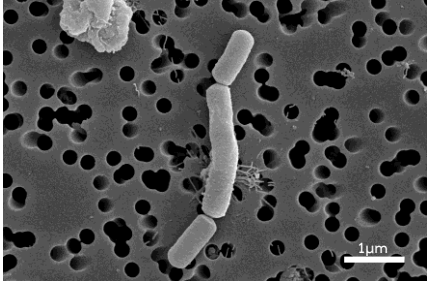
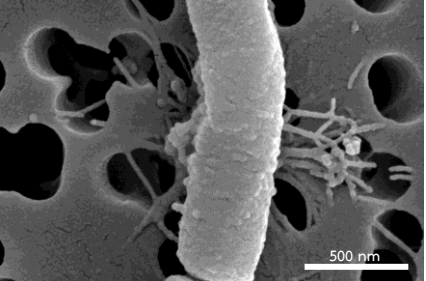
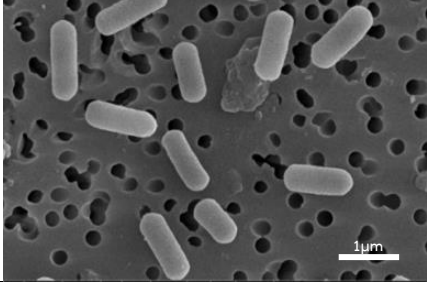
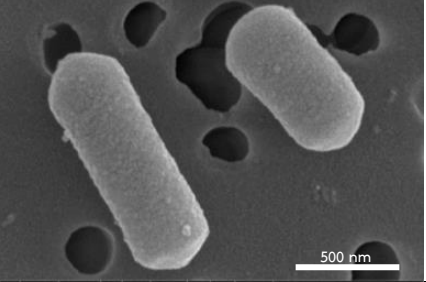
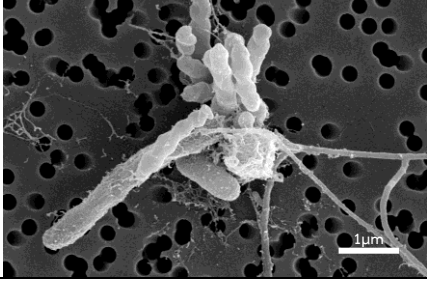
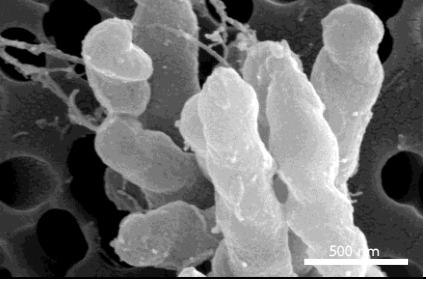
4.2 ผลการศึกษารูปร่างภายนอกที่เปลี่ยนไปของเซลล์จากการออกฤทธิ์ร่วมกันที่ความเข้มข้นต่างๆภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (FE-SEM)

จากการนำเซลล์ *L. monocytogenes* และ *E. coli* ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน, CPC และไนซิน-CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง มากรองผ่านเมมเบรนพอลิคาร์บอเนต ขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร แทนที่น้ำภายในเซลล์ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวเคลือบผิวเซลล์ด้วยทอง และนำมาศึกษาภายใต้กล้อง FE-SEM ซึ่งแสดงภาพที่กำลังขยาย 30,000 เท่า และ 100,000 เท่า พบว่าภาพ FE-SEM ที่กำลังขยาย 30,000 เท่า ของ *L. monocytogenes* และ *E. coli* ที่ไม่มีสารยับยั้งการเจริญพบว่า เซลล์มีจำนวนมาก เมื่อเปรียบเทียบกับ *L. monocytogenes* และ *E. coli* ที่ถูกกระทำด้วยสารออกฤทธิ์ทั้ง ไนซิน, CPC และ ไนซิน-CPC โดยพบว่าเซลล์มีจำนวนลดน้อยลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งสอดคล้องกันกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ และยังพบว่าเซลล์ที่ถูกกระทำด้วยไนซิน-CPC มีรูปร่างที่ผิดปกติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้น MIC ของไนซิน, CPC และไนซิน-CPC ส่งผลให้เซลล์เกิดความผิดปกติ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

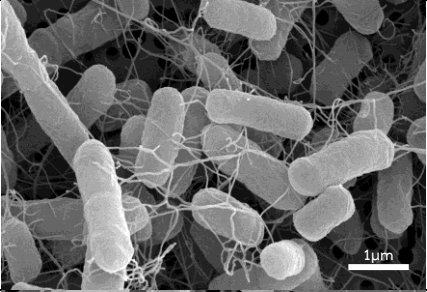
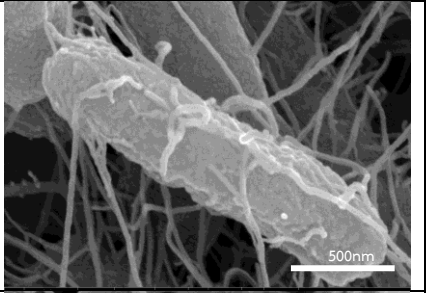
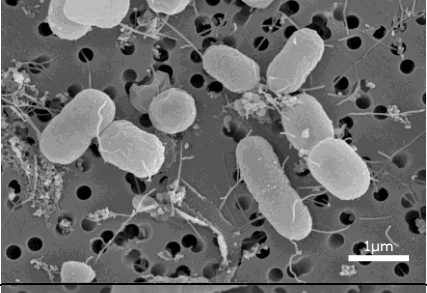
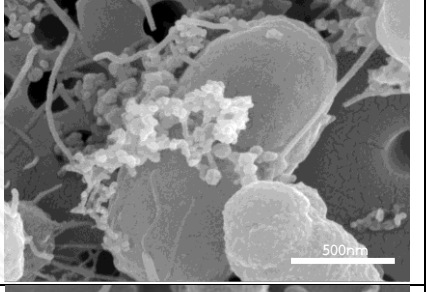
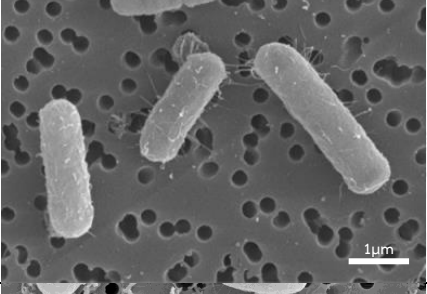
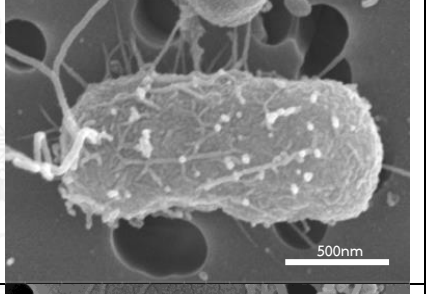
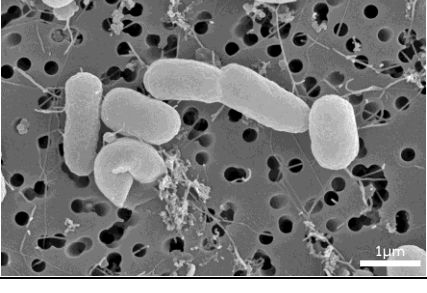
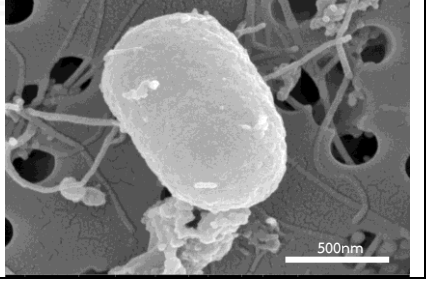
ภาพ FE-SEM ที่กำลังขยาย 100,000 เท่า ของ *L. monocytogenes* พบว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับสารยับยั้งการเจริญมีรูปร่างเป็นแท่งยาว ขนาดประมาณ 1.5-2 ไมโครเมตร ผิวเซลล์เรียบ ในขณะที่เซลล์ *L. monocytogenes* ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซินมี ความผิดปกติโดยผิวเซลล์มีลักษณะไม่เรียบ ขรุขระ เซลล์มีรูปร่างโค้งงอ ในการศึกษา *L. monocytogenes* ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC พบว่าเซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งขนาดสั้นลงเล็กน้อย ขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร แต่ไม่พบความผิดปกติที่ชัดเจนทั้งผิวและรูปร่างลักษณะของเซลล์ ส่วนใน *L. monocytogenes* ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC นั้นพบว่าเซลล์มีความผิดปกติอย่างชัดเจน มีลักษณะรูปร่างบิดเบี้ยว ไม่เป็นแท่ง ผิวเซลล์ค่อนข้างขรุขระ ซึ่งลักษณะเซลล์ถูกทำลายคล้ายกับ *L. monocytogenes* ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซินและ CPC แต่ส่งผลการทำลายเซลล์ที่รุนแรงและเห็นได้ชัดเจนมากกว่าดังแสดงในตารางที่ 4.3

ภาพ FE-SEM ที่กำลังขยาย 100,000 เท่า ของ *E. coli* พบว่าเซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งสั้นขนาดประมาณ 2 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลาและพิไลยาวล้อมรอบเซลล์เป็นจำนวนมากซึ่งเห็นได้อย่างชัดเจน ในขณะที่เซลล์ *E. coli* ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน มีรูปร่างเป็นแท่งแต่ขนาดสั้นกว่าเซลล์ปกติที่ไม่มีสารยับยั้งการเจริญ โดยมีขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร แฟลกเจลลาและพิไลไม่สมบูรณ์ ส่วนเซลล์ *E. coli* ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC พบว่ามีแฟลกเจลลาและพิไลสั้น ไม่สมบูรณ์ แต่ไม่พบความผิดปกติของรูปร่างเซลล์ที่ชัดเจน ในขณะที่เซลล์ *E. coli* ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC พบว่าเซลล์มีความผิดปกติ รูปร่างบิดงอ และหดสั้นลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไนซิน-CPC สามารถออกฤทธิ์ทำลายเซลล์อย่างรุนแรง เซลล์มีความผิดปกติที่เห็นได้ชัดเจนกว่าการถูกยับยั้งด้วยไนซินหรือ CPC เพียงชนิดเดียว ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.3 แสดงรูปร่างภายนอกของเซลล์ *L. monocytogenes* ที่ถูกยับยั้งด้วย ไนซิน, CPC และ ไนซิน-CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้อง FE-SEM ที่กำลังขยายต่างๆ

สารยับยั้ง การเจริญ	กำลังขยาย (เท่า)	
	30,000	100,000
ไม่มี		
ไนซิน		
CPC		
ไนซิน-CPC		

ตารางที่ 4.4 แสดงรูปร่างภายนอกของเซลล์ *E. coli* ที่ถูกยับยั้งด้วย ไนซิน, CPC และ ไนซิน-CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้อง FE-SEM ที่กำลังขยายต่างๆ

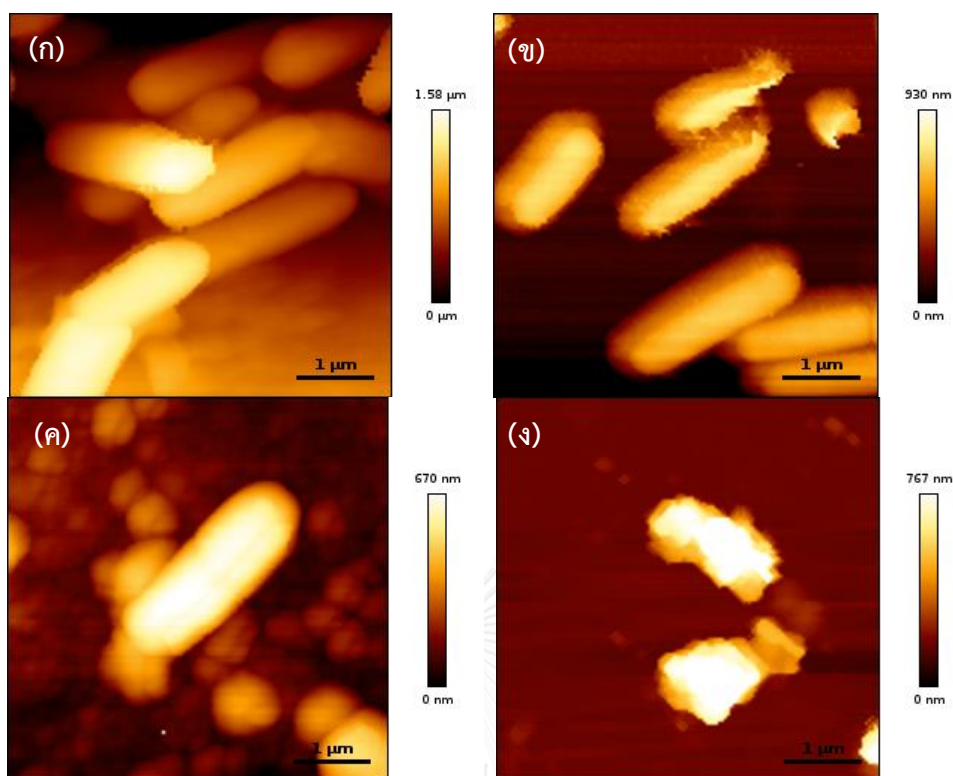
สารยับยั้ง การเจริญ	กำลังขยาย (เท่า)	
	30,000	100,000
ไม่มี		
ไนซิน		
CPC		
ไนซิน -CPC		

การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ถูกทำลายด้วยสารออกฤทธิ์ภายใต้กล้อง FE-SEM เซลล์จะถูกแทนที่น้ำภายในเซลล์ด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลว หลังจากนั้นพ่นด้วยทองที่ผิวเซลล์จึงสามารถนำเซลล์มาถ่ายภาพได้ โดยภาพที่ได้พบว่าเซลล์ที่ถูกทำลายด้วยสารออกฤทธิ์ส่วนใหญ่มีลักษณะบดงอาจเกิดจากการทำงานของสารออกฤทธิ์ที่ทำให้ผนังเซลล์เกิดรูและรบกวนการสร้างผนังเซลล์ ส่งผลให้ผนังเซลล์ไม่แข็งแรง ดังนั้นเมื่อมีการแทนที่น้ำภายในเซลล์จากการเตรียมตัวอย่าง จึงทำให้เกิดลักษณะดังกล่าวขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ที่ถูกทำลายด้วยสารออกฤทธิ์มีผิวขรุขระและไม่สามารถเห็นรูที่เกิดขึ้นบนผิวเซลล์ได้อย่างชัดเจน อาจเนื่องมาจากการเคลือบทองบนผิวเซลล์ที่หนา

4.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายนอกของเซลล์ที่มีชีวิตอย่างละเอียดขณะเซลล์ยังมีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM)

ผลจากการศึกษารูปร่างของเซลล์ที่มีชีวิตของ *L. monocytogenes* และ *E. coli* ที่ถูกตรึงโดย PLL ในบัฟเฟอร์ภายใต้กล้อง AFM โดยภาพจาก AFM สามารถแสดงถึงค่าความสูงจากพื้นหลัง, ค่า Adhesion, ค่าความชันกราฟ, ค่า Young's modulus และภาพ 3 มิติของค่าความชันกราฟโดยความสูงจากพื้นหลังแสดงถึงความกว้างของเซลล์ ค่า Adhesion แสดงให้เห็นถึงแรงยึดระหว่างผิวเซลล์กับปลายทิวที่กำลังยกขึ้น ซึ่งหมายถึงแรงยึดติดของผิวเซลล์ ค่าความชันกราฟ แสดงถึงแรงที่ปลายทิวกระทำกับเซลล์ต่อระยะที่เซลล์ยุบตัว ซึ่งแสดงถึงความเต่งและความเหนียวของเซลล์ ส่วนค่า Young's modulus แสดงถึงค่าความสามารถในการยืดหยุ่นของผิวเซลล์ และภาพ 3 มิติที่แสดงรูปร่างเซลล์ซึ่งแสดงตำแหน่งสีเป็นค่าความชันกราฟ

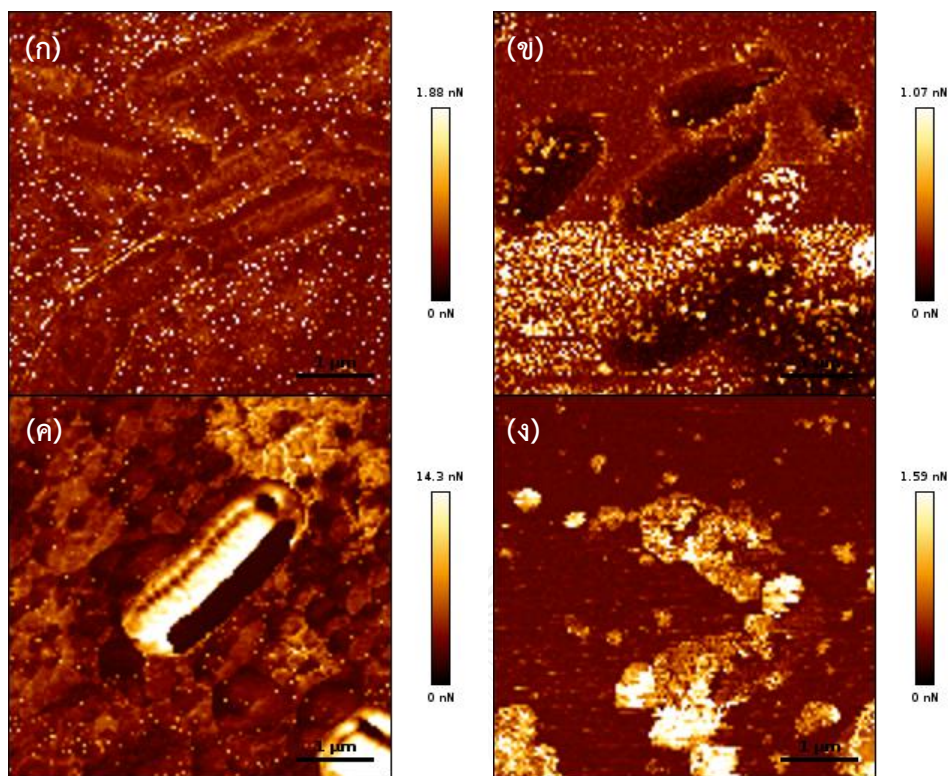
ผลจากการศึกษา *L. monocytogenes* ได้เป็นภาพ AFM จากค่าความสูงของเซลล์ (รูปที่ 4.7) แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ไม่มีสารยับยั้งการเจริญ มีรูปร่างเป็นแท่งยาว ขนาดประมาณ 2.5 ไมโครเมตร และมีความกว้างประมาณ 1 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.7ก) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซินที่ความเข้มข้น MIC นาน 6 ชั่วโมง พบว่าผนังเซลล์มีความผิดปกติ เกิดรูแหวง เห็นขอบเขตเซลล์ไม่ชัดเจน (รูปที่ 4.7ข) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงชัดเจน (รูปที่ 4.7ค) ในขณะที่เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง นั้นพบว่าเซลล์มีความผิดปกติอย่างชัดเจน ผิวเซลล์ขรุขระ สูญเสียรูปร่าง (รูปที่ 4.7ง) การศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ด้วยไนซินเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เนื่องจากการทดลองในระยะเวลา 24 ชั่วโมงนั้นไม่สามารถตกตะกอนเซลล์ได้เพราะเซลล์ถูกทำลาย ดังนั้นจึงลดระยะเวลาลงเป็น 6 ชั่วโมง ซึ่งทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ชัดเจนได้



รูปที่ 4.7 ภาพ AFM ที่ได้จกค่าความสูงของเซลล์ *L. monocytogenes* ใน PBS บัฟเฟอร์ที่ถูกตรึงบน PLL (ก) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซินที่ความเข้มข้น MIC นาน 6 ชั่วโมง (ข) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ค) และเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

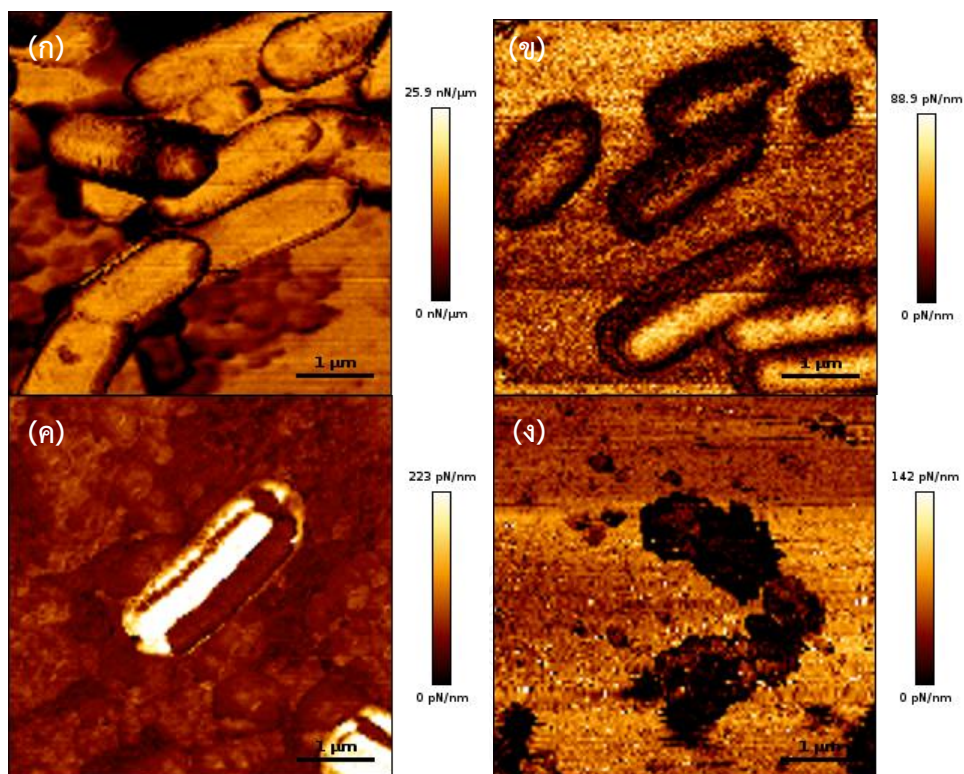
ผลของภาพ AFM จากค่า Adhesion ของเซลล์ *L. monocytogenes* (รูปที่ 4.8) แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ไม่มีสารยับยั้งการเจริญมีผิวเซลล์ที่มีแรงยึดติดน้อย (รูปที่ 4.8ก) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน พบว่าค่า Adhesion มีค่าน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีสารยับยั้ง แสดงให้เห็นว่าผิวเซลล์มีแรงยึดติดน้อย (รูปที่ 4.8ข) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC พบว่าเกิดบริเวณที่มีค่า Adhesion มากและน้อยแตกต่างกัน 2 บริเวณ คือบริเวณที่มีแรงยึดติดน้อยมากและบริเวณที่มีแรงยึดติดน้อย (รูปที่ 4.8ค) ในขณะที่เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC นั้นพบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีสารยับยั้ง พบว่าค่า Adhesion มีค่าสูงขึ้นมากแสดงให้เห็นว่ามีแรงยึดติดมาก (รูปที่ 4.8ง) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าบริเวณที่มีแรงยึดติดมากอาจเป็นสารประกอบภายในเซลล์ไหลออกสู่ภายนอกเซลล์ และเซลล์ถูกทำลายอย่างรุนแรง



รูปที่ 4.8 ภาพ AFM ที่ได้จกค่า Adhesion ของเซลล์ *L. monocytogenes* ใน PBS บัฟเฟอร์ที่ถูกตรึงบน PLL (ก) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซินที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ข) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ค) และเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

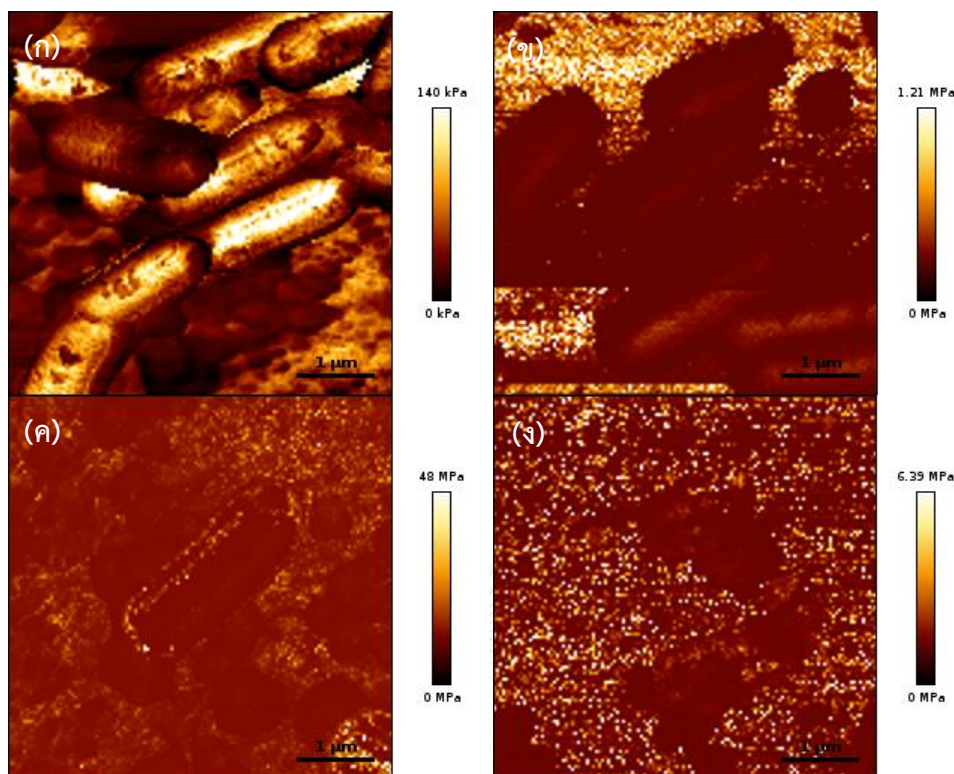
ผลของภาพ AFM จากค่าความชันกราฟของเซลล์ *L. monocytogenes* (รูปที่ 4.9) แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ไม่มีสารยับยั้งการเจริญมีค่าความชันกราฟมากแสดงให้เห็นว่าเซลล์มีความเต่ง (รูปที่ 4.9ก) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน พบว่าค่าความชันกราฟมีค่าน้อยโดยเฉพาะขอบเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีสารยับยั้ง แสดงว่าเซลล์เหี่ยว มีความเต่งน้อยลง แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีความผิดปกติที่ผิวเซลล์ ทำให้ไม่สามารถคงสภาพได้ (รูปที่ 4.9ข) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC พบว่ามีบริเวณของค่าความชันกราฟที่แตกต่างกัน 2 บริเวณคือบริเวณที่มีค่ามากและบริเวณที่มีค่าน้อย โดยมีบริเวณที่มีค่ามากแสดงให้เห็นว่าบริเวณนี้เซลล์มีความแข็ง และบริเวณที่มีค่าน้อยเป็นบริเวณที่เซลล์เหี่ยว มีความอ่อนยวบ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีความผิดปกติ (รูปที่ 4.9ค) ในขณะที่เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC พบว่าค่าความชันกราฟมีค่าน้อย แสดงให้เห็นว่าเซลล์เหี่ยว มีความอ่อนยวบ (รูปที่ 4.9ง)



รูปที่ 4.9 ภาพ AFM ที่ได้จกค่าความชันกราฟของเซลล์ *L. monocytogenes* ใน PBS บัฟเฟอร์ที่ถูกตรึงบน PLL (ก) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซินที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ข) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ค) และเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของภาพ AFM จากค่า Young's modulus ของเซลล์ *L. monocytogenes* (รูปที่ 4.10) มีผลที่สอดคล้องกันกับค่าความชันกราฟ ซึ่งพบว่าเซลล์ที่ไม่มีสารยับยั้งการเจริญมีค่า Young's modulus มากแสดงให้เห็นว่าเซลล์มีความยืดหยุ่นมาก ทนต่อแรงกระทำมาก สามารถคงสภาพเซลล์ได้ดี (รูปที่ 4.10ก) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน พบว่ามีค่า Young's modulus น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีสารยับยั้ง แสดงว่าเซลล์ไม่มีความความยืดหยุ่น (รูปที่ 4.10ข) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC พบว่ามีค่า Young's modulus น้อยเช่นเดียวกัน แสดงว่าเซลล์ไม่มีความความยืดหยุ่น (รูปที่ 4.10ค) และเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC พบว่ามีค่าน้อย เซลล์ไม่มีความความยืดหยุ่นเช่นกัน (รูปที่ 4.10ง) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน, CPC และไนซิน-CPC ไม่สามารถคงสภาพไว้สูญเสียสภาพง่าย

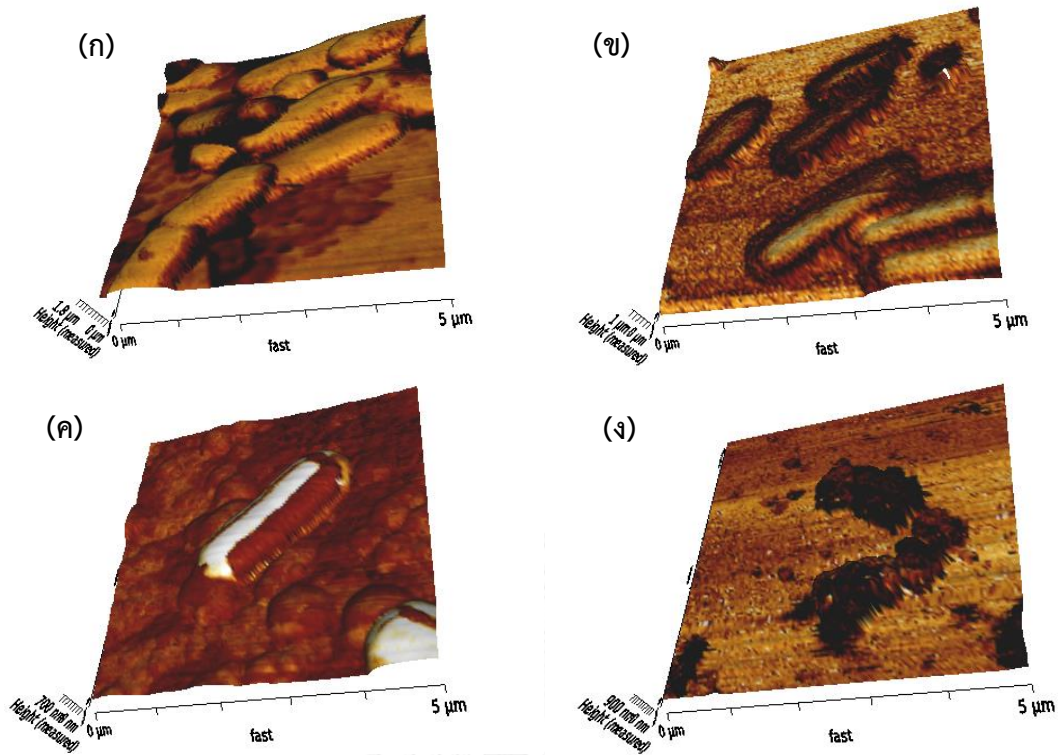


รูปที่ 4.10 ภาพ AFM ที่ได้จากค่า Young's modulus ของเซลล์ *L. monocytogenes* ใน PBS บัฟเฟอร์ที่ถูกตรึงบน PLL (ก) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซินที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ข) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ค) และเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

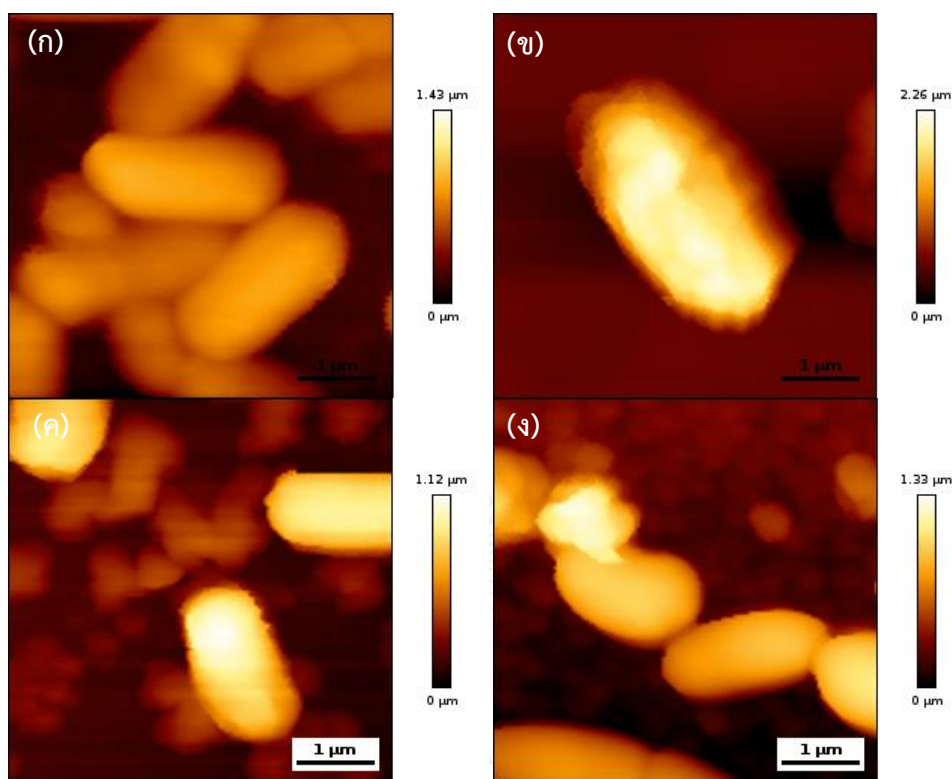
ผลจากการทำภาพ 3 มิติที่แสดงรูปร่างเซลล์จากค่าความสูงเซลล์และแสดงตำแหน่งสีจากค่าความชันกราฟแสดงดังรูปที่ 4.11 ซึ่งภาพ 3 มิตินี้แสดงถึงตำแหน่งความเต่งและเหี่ยวของเซลล์ ของ *L. monocytogenes* ได้อย่างชัดเจน โดยเซลล์ที่ไม่มีสารยับยั้งการเจริญมีความเต่ง (รูปที่ 4.11ก) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน มีความเต่งน้อยลงโดยเฉพาะขอบเซลล์ (รูปที่ 4.11ข) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC มีบริเวณที่มีความแข็ง และบริเวณที่เหี่ยว (รูปที่ 4.11ค) ในขณะที่เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC นั้นเหี่ยว มีความอ่อนยวบมากที่สุดโดยไม่มีบริเวณที่เต่ง (รูปที่ 4.11ง)

เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งด้วยไนซิน, CPC และ ไนซิน-CPC แสดงให้เห็นว่าไนซินและ CPC นั้นให้ผลการยับยั้งเซลล์ในรูปแบบที่แตกต่างกันโดยผลการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ด้วยการทำงานร่วมกันของไนซินและ CPC ให้ผลในการทำให้เซลล์เสียหายมากที่สุด คือทำให้เซลล์เหี่ยว และผิวขรุขระและไร้รูปร่าง



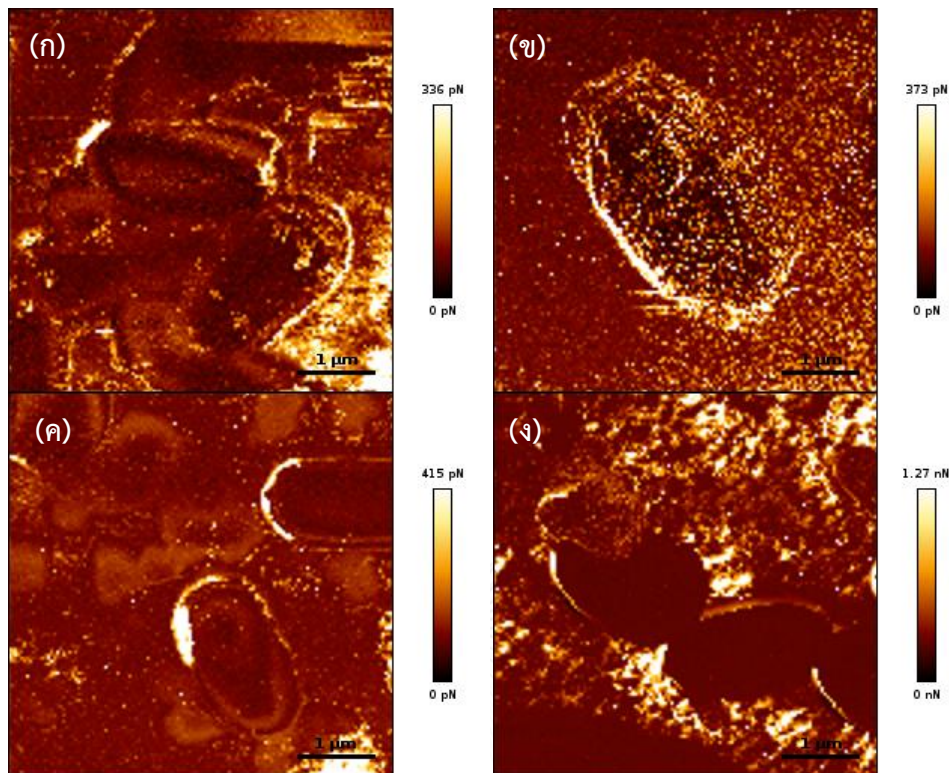
รูปที่ 4.11 ภาพ AFM แบบ 3 มิติ ของเซลล์ *L. monocytogenes* ใน PBS บัฟเฟอร์ที่ถูกตรึงบน PLL (ก) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซินที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ข) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ค) และเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ง)

ผลจากการศึกษา *E. coli* ได้เป็นภาพ AFM จากค่าความสูงของเซลล์ (รูปที่ 4.12) แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ไม่มีสารยับยั้งการเจริญ รูปร่างเป็นแท่งสั้น ขนาดประมาณ 3 ไมโครเมตร และมีความกว้างประมาณ 1-1.5 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.12ก) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซินที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง พบว่าผนังเซลล์ผิดปกติ ผิวเซลล์ขรุขระ เห็นขอบเขตเซลล์ไม่ชัดเจน (รูปที่ 4.12ข) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีขนาดสั้นลงเล็กน้อยซึ่งไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน (รูปที่ 4.12ค) ในขณะที่เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง นั้นพบว่าเซลล์มีความผิดปกติอย่างชัดเจน รูปร่างบิดงอ เกิดบริเวณคล้ายรูและมีกลุ่มก้อนของสารบางอย่าง (รูปที่ 4.12ง)



รูปที่ 4.12 ภาพ AFM ที่ได้จากค่าความสูง ของเซลล์ *E. coli* ใน PBS บัฟเฟอร์ที่ถูกตรึงบน PLL (ก) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซินที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ข) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ค) และเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ง)

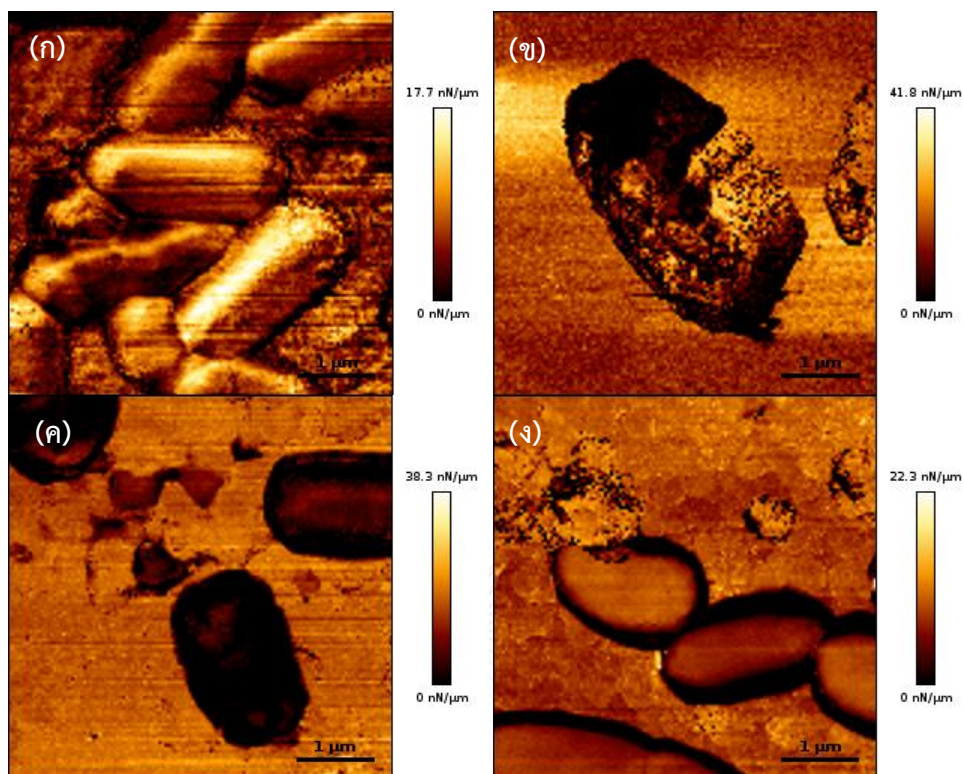
ผลของภาพ AFM จากค่า Adhesion ของเซลล์ *E. coli* (รูปที่ 4.13) แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ไม่มีสารยับยั้งการเจริญมีผิวเซลล์ที่มีแรงยึดติดไม่มาก (รูปที่ 4.13ก) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน พบว่ามีบริเวณที่มีค่า Adhesion สูงบนผิวเซลล์และด้านข้างเซลล์ แสดงให้เห็นถึงแรงยึดติดที่กระจายตัวอยู่โดยรอบ อาจเป็นไนซินที่จับตัวอยู่ที่ผิวเซลล์ (รูปที่ 4.13ข) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC พบว่าค่า Adhesion ไม่แตกต่างกับเซลล์ปกติมากนัก (รูปที่ 4.13ค) ในขณะที่เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC นั้นพบว่ามีบริเวณคล้ายรูซึ่งมีกลุ่มก้อนนั้นมีค่า Adhesion ที่สูงกว่าบนผิวเซลล์ แสดงให้เห็นว่าบริเวณนี้มีแรงยึดติดซึ่งแตกต่างกับผิวเซลล์ (รูปที่ 4.13ง) ซึ่งอาจเป็นสารประกอบภายในเซลล์ไหลออกสู่ภายนอก



รูปที่ 4.13 ภาพ AFM ที่ได้จากค่า Adhesion ของเซลล์ *E.coli* ใน PBS บัฟเฟอร์ที่ถูกตรึงบน PLL (ก) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซินที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ข) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ค) และเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ง)

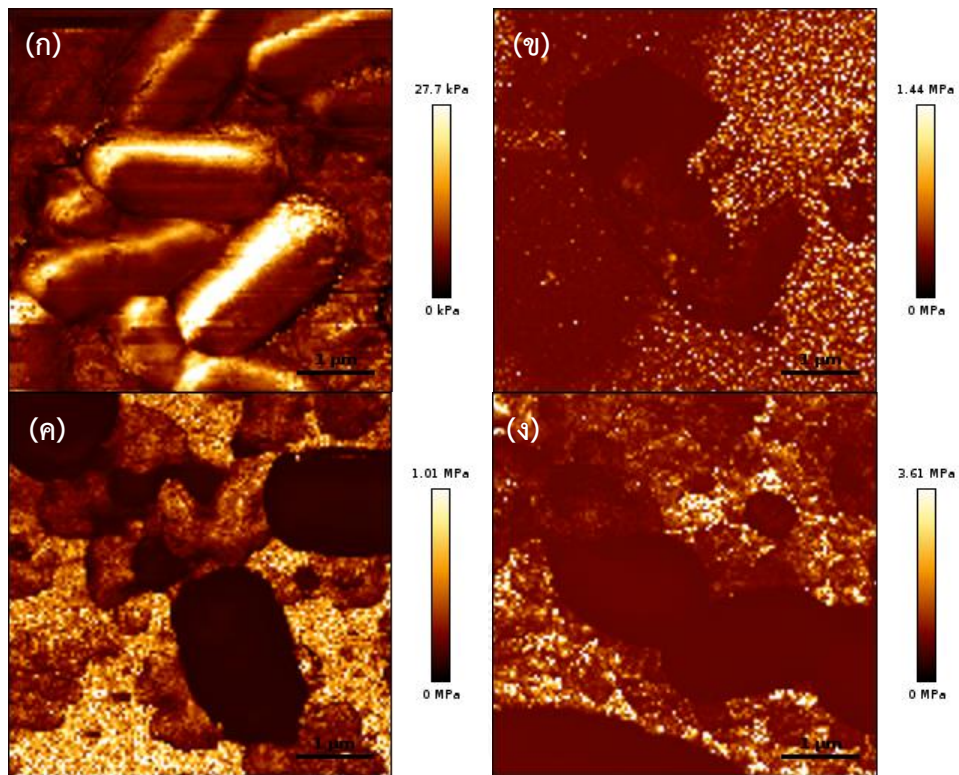
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของภาพ AFM จากค่าความชันกราฟของเซลล์ *E. coli* (รูปที่ 4.14) แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ไม่มีสารยับยั้งการเจริญมีค่าความชันกราฟมากแสดงให้เห็นว่าเซลล์มีความเต่ง (รูปที่ 4.14ก) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน พบว่าค่าความชันกราฟน้อยกล่าวคือมีบริเวณสีเข้มมาก แสดงว่าบริเวณนั้นไม่มีความเต่ง เหี่ยวและอ่อนยวบ นอกจากนี้ยังพบบริเวณที่มีค่ามากสูงกว่าเกิดขึ้นบริเวณข้างเซลล์ด้านหนึ่ง ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความแข็งมากกว่า (รูปที่ 4.14ข) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC พบว่าบริเวณที่ค่าความชันกราฟที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีสารยับยั้ง แสดงว่าให้เห็นว่าเซลล์เหี่ยว มีความอ่อนยวบ แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีความผิดปกติที่ผิวเซลล์ ทำให้ไม่สามารถคงสภาพได้ (รูปที่ 4.14ค) ในขณะที่เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC พบว่าบริเวณขอบเซลล์มีค่าน้อย แสดงให้เห็นว่าขอบเซลล์เหี่ยว มีความอ่อนยวบ (รูปที่ 4.14ง) แสดงให้เห็นว่าเซลล์ไม่สามารถคงสภาพเดิมได้



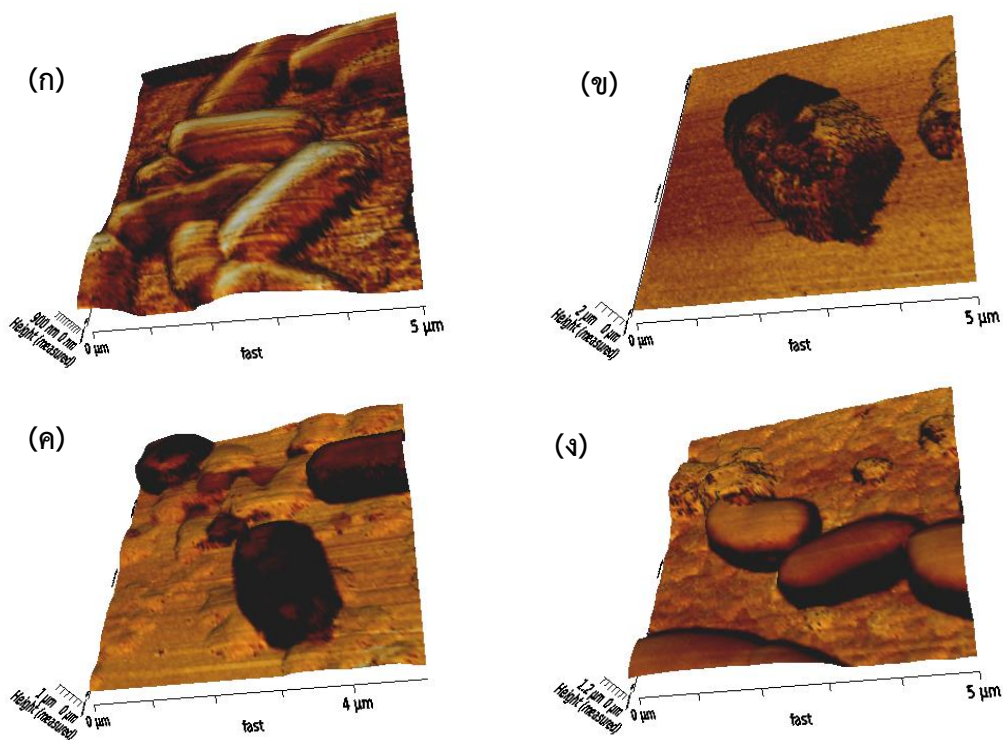
รูปที่ 4.14 ภาพ AFM ที่ได้จากค่าความชันกราฟของเซลล์ *E. coli* ใน PBS บัฟเฟอร์ที่ถูกตรึงบน PLL (ก) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซินที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ข) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ค) และเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ง)

ผลของภาพ AFM จากค่า Young's modulus ของเซลล์ *E. coli* (รูปที่ 4.15) มีผลที่สอดคล้องกันกับค่าความชันกราฟ โดยพบว่าเซลล์ที่ไม่มีสารยับยั้งการเจริญมีค่า Young's modulus มากแสดงให้เห็นว่าเซลล์มีความยืดหยุ่นมาก ทนต่อแรงกระทำได้มาก และสามารถคงสภาพเซลล์ได้ดี (รูปที่ 4.15ก) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน พบว่ามีค่า Young's modulus น้อยแสดงว่าเซลล์ไม่มีความยืดหยุ่น นอกจากนี้ยังพบว่าด้านข้างเซลล์มีบริเวณที่มีค่ามากซึ่งแสดงว่ามีความยืดหยุ่นสูงและกระจายตัวด้านข้างเซลล์ (รูปที่ 4.15ข) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC พบว่ามีค่า Young's modulus น้อยเช่นเดียวกัน แสดงว่าเซลล์ไม่มีความความยืดหยุ่น (รูปที่ 4.15ค) และเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC พบว่ามีค่าน้อย แสดงให้เห็นว่าเซลล์ไม่มีความยืดหยุ่นเช่นกัน (รูปที่ 4.15ง) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ไม่ทนต่อแรงกระทำ ไม่สามารถคงสภาพไว้และสูญเสียสภาพเดิมได้ง่าย



รูปที่ 4.15 ภาพ AFM ที่ได้จากค่า Young's modulus ของเซลล์ *E.coli* ใน PBS บัฟเฟอร์ที่ถูกตรึงบน PLL (ก) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซินที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ข) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ค) และเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ง)

ผลจากการทำภาพ 3 มิติที่แสดงรูปร่างเซลล์จากค่าความสูงเซลล์และแสดงตำแหน่งสีจากค่าความชันกราฟแสดงดังรูปที่ 4.16 เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ด้วยไนซิน, CPC และ ไนซิน-CPC แสดงให้เห็นว่าทั้งไนซินและ CPC ให้ผลการยับยั้งเซลล์รูปแบบที่แตกต่างกัน โดยผลการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ด้วยไนซิน-CPC ให้ผลที่ใกล้เคียงกับการใช้แยกกันคือ ทำให้เซลล์เหี่ยว และเกิดรูที่ผิวเซลล์



รูปที่ 4.16 ภาพ AFM แบบ 3 มิติของค่าความชันกราฟ ของเซลล์ *E. coli* ใน PBS บัฟเฟอร์ที่ถูกตรึงบน PLL (ก) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยโนซินที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ข) เซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ค) และเซลล์ที่ถูกยับยั้งด้วยโนซิน-CPC ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง (ง)

ผลจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ *L. monocytogenes* และ *E. coli* เนื่องจากการออกฤทธิ์ของโนซิน, CPC และ โนซิน-CPC เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันระหว่างภาพภายใต้กล้อง FE-SEM และ AFM สามารถสรุปได้ว่าโนซินส่งผลให้ *L. monocytogenes* มีผิวเซลล์ไม่เรียบ ขรุขระ และรูปร่างโค้งงอ อีกทั้งยังทำให้เซลล์เหี่ยว ขาดความยืดหยุ่น เนื่องจากโนซินสามารถเข้าจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกได้ง่าย ทำให้เกิดภาพที่แสดงให้เห็นถึงความขรุขระที่ผิวเซลล์ และความไม่ผิดปกติของรูปร่างเซลล์ เมื่อเซลล์เกิดรูทำให้เซลล์เหี่ยวและขาดความยืดหยุ่น เนื่องจากสารประกอบภายในเซลล์ไหลออกสู่ภายนอก (Hoffmann และคณะ, 2001) ซึ่งมีผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Perumalla และ Hettiarachchy (2011) ในขณะที่โนซินที่ความเข้มข้นสูงได้ส่งผลให้ *E. coli* มีผิวขรุขระ หดสั้นแต่ยังคงรูปร่างแท่ง และมีบริเวณคล้ายรู ซึ่ง *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีชั้น LPS หนาอยู่รอบเซลล์ (Hoffmann และคณะ, 2001) จึงต้องใช้โนซินที่มีความเข้มข้นสูงมากในการแทรกเข้าสู่ชั้นเมมเบรนภายในเกิดเป็นรู และสารประกอบภายในไหลสู่ภายนอกเซลล์ในที่สุด ภาพที่ได้จึงแสดงให้เห็นถึงเซลล์ที่เหี่ยว ไม่ยืดหยุ่น และบริเวณรูมีแรงยึดติดและยืดหยุ่น

เนื่องจากสารประกอบภายในไหลออกสู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ (Meincken และคณะ (2005)) ที่ได้ศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ด้วยสารเมลิททิน (melittin) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่เป็นสารประกอบเปปไทด์ ภายใต้กล้อง AFM ภาพที่ได้พบว่าเกิดลักษณะคล้ายรูบนผิวเซลล์ *E. coli* เช่นเดียวกัน ซึ่งภาพ AFM นี้สามารถเห็นได้ชัดว่าเมลิททินสามารถทำลายได้ทั้งชั้น LPS และเมมเบรนได้

ผลจากการศึกษาทำงานของ CPC ภายใต้กล้อง FE-SEM และ AFM นั้นแสดงให้เห็นว่า CPC ส่งผลให้ *L. monocytogenes* มีแท่งสั้นลงอย่างเห็นได้ชัด และทำให้ผิวเซลล์เกิดความผิดปกติทั้งข้างขึ้นและอ่อนลง และมีแรงยึดติดมากขึ้น ในขณะที่ CPC ทำให้ *E. coli* มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น ขอบเขตไม่ชัดเจน เซลล์เหี่ยวและอ่อนยวบด้วยเช่นกัน ทั้งนี้เนื่องจาก CPC เข้าไปรบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ทำลายผนังเซลล์และเซลล์เมมเบรน และเซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวได้ (Cord) ซึ่งการทำงานของ CPC นั้นสามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ

ผลจากการศึกษาการทำงานของโนซิน-CPC ภายใต้กล้อง FE-SEM, AFM สามารถสรุปได้ว่าโนซิน-CPC ส่งผลทำลายเซลล์ *L. monocytogenes* อย่างรุนแรง โดยทำให้เซลล์มีรูปร่างบิดเบี้ยว ไม่เป็นแท่ง ผิวขรุขระ มีความอ่อนยวบ ไม่ยึดหยุ่น และมีแรงยึดติด ซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันของโนซินและ CPC โดยโนซินซึ่งทำงานได้ดีกับแบคทีเรียแกรมบวกเข้าจับกับผิวเซลล์ก่อให้เกิดรู และ CPC เข้าไปรบกวนกระบวนการสร้างผนังเซลล์และเซลล์เมมเบรนส่งผลให้ผิวเซลล์ไม่แข็งแรง ไม่สามารถกักเก็บสารประกอบภายในเซลล์ได้ ทำให้ผิวเซลล์ขรุขระ บิดเบี้ยว อ่อนยวบ ไร้รูปร่าง และมีแรงยึดติด ในขณะที่โนซิน-CPC ได้ส่งผลต่อ *E. coli* โดยทำให้เซลล์หดสั้น บิดงอ เกิดเป็นรูซึ่งเห็นได้อย่างชัดเจน เซลล์เหี่ยวและอ่อนยวบ ซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันของโนซินและ CPC ซึ่ง CPC สามารถเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแกรมลบได้และรบกวนการกระบวนการสร้างผนังเซลล์และเซลล์เมมเบรน ทำให้ผิวเซลล์ชั้น LPS ไม่แข็งแรง โนซินจึงสามารถเข้าสู่เซลล์เมมเบรนภายในได้สร้างรูและส่งผลให้สารประกอบภายในเซลล์ไหลออกมาได้ในที่สุด ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Thongbai และคณะ (2006) ที่ศึกษาภายใต้กล้อง SEM พบว่าการทำงานของโนซินร่วมกับ CPC สามารถทำให้เซลล์ *E. coli* เกิดความผิดปกติได้

เมื่อเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ของโนซิน, CPC และ โนซิน-CPC นั้น แสดงให้เห็นว่า โนซิน-CPC สามารถออกฤทธิ์ทำลายเซลล์ได้อย่างรุนแรง เซลล์มีความผิดปกติมากที่สุด เห็นชัดเจนได้ทั้งการศึกษาภายใต้กล้อง FE-SEM และ AFM ถึงแม้จากค่าดัชนี FIC สรุปว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างการทำงานเชิงเดียวกับทำงานร่วมกันเนื่องจากสามารถลดจำนวนเซลล์ลงได้อย่างไม่แตกต่าง

กันมากนัก แต่การทำงานร่วมกันนั้นสามารถทำลายเซลล์ได้อย่างรุนแรงกว่า เซลล์ชนิดปกติมากกว่า อย่างเห็นได้ชัด จึงสามารถสรุปได้ว่าการทำงานร่วมกันของไนซินและ CPC มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes* และ *E. coli*

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ถูกทำลายด้วยสารออกฤทธิ์ภายใต้กล้อง FE-SEM และไม่สามารถเห็นรูที่เกิเกิดขึ้นบนผิวเซลล์ได้อย่างชัดเจน อาจเนื่องมาจากการเคลือบทองบนผิวเซลล์ ในขณะที่ผลจากการศึกษาภายใต้กล้อง AFM นั้นแสดงให้เห็นรูบนผิวเซลล์ได้ชัดเจนมากกว่า และภาพที่ได้เป็นภาพที่เกิดจากเซลล์ที่ยังมีชีวิตและอยู่ในบัฟเฟอร์ซึ่งมีความใกล้เคียงกับภาวะแวดล้อมที่เซลล์อาศัยอยู่ตามธรรมชาติ ดังนั้นผลจากการทำงานของสารออกฤทธิ์ที่ภายใต้กล้อง AFM นั้นจึงมีความใกล้เคียงกับเซลล์ที่ถูกทำลายในภาวะจริงมากกว่าการศึกษาด้วยกล้อง FE-SEM จึงสรุปได้ว่าภาพจาก FE-SEM สามารถแสดงการเปลี่ยนแปลงภายนอกของเซลล์ที่ถูกทำลายด้วยสารออกฤทธิ์ได้เบื้องต้น และภาพจาก AFM แสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องกันซึ่งสามารถยืนยันผลการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ถูกทำลายได้ นอกจากนี้ภาพจาก AFM ยังสามารถแสดงข้อมูลละเอียดด้วยการแสดงภาพจากค่าความสูงจากพื้นหลัง, ค่า Adhesion, ค่าความชันกราฟ, ค่า Young's modulus และภาพ 3 มิติ ซึ่งแสดงข้อมูลแรงยึดติด ความยืดหยุ่น ความเหี่ยวหรือเต่งของเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

4.4 ผลการศึกษาตำแหน่งการทำงานของสารออกฤทธิ์ภายใต้กล้องรามานสเปกโตรมิเตอร์ (Raman spectrometer)

การศึกษาด้วยเทคนิครามานนั้นได้ใช้เทคนิคการเพิ่มสัญญาณรามานแบบ Surface Enhance Raman spectroscopy (SERS) โดยการใช้นาโนซิลเวอร์เคลือบบนไมกาเป็นซับสเตรต ลำแสงเลเซอร์ 532 นาโนเมตร ด้วยเวลาแอกควิสิชัน (acquisition times) ที่ 30 วินาที ผลจากการตรวจวัดพีครามานในช่วง $200-4500\text{ cm}^{-1}$ ด้วยโปรแกรมโนวา พบว่าเกิดการกระเจิงแสงที่รูปแบบแตกต่างกันโดยไนซิน, CPC และเซลล์แบคทีเรีย แสดงพีครามานที่ 3090 cm^{-1} , 1652 cm^{-1} และ 2934 cm^{-1} ตามลำดับ โดย 3090 cm^{-1} คือพีคของการสั่นของพันธะไฮโดรคาร์บอน (Howell และคณะ, 1999) 1652 cm^{-1} คือพีคของการสั่นแบบยืดหยุ่นของแอมโรมาติก (Sun และคณะ, 1990) และ 2934 cm^{-1} เป็นพีคของการสั่นแบบยืดหยุ่นที่เป็นแบบ antisymmetric ของ CH_2 (Orange และคณะ, 1996)

ผลจากการสร้างแผนที่รามาน 64×64 พิกเซล ด้วยโปรแกรมโนวาแสดงให้เห็นดังรูปที่ 4.17 จากภาพแผนที่รามานของเซลล์ *E. coli* พบว่าพีครามานของเซลล์ *E. coli* ที่ 2934 cm^{-1} (สีแดง)

แสดงให้เห็นถึงเซลล์ *E. coli* มีรูปร่างเป็นแท่ง มีสภาพสมบูรณ์ (รูปที่ 4.17ข) ขนาดประมาณ 2 ไมโครเมตร

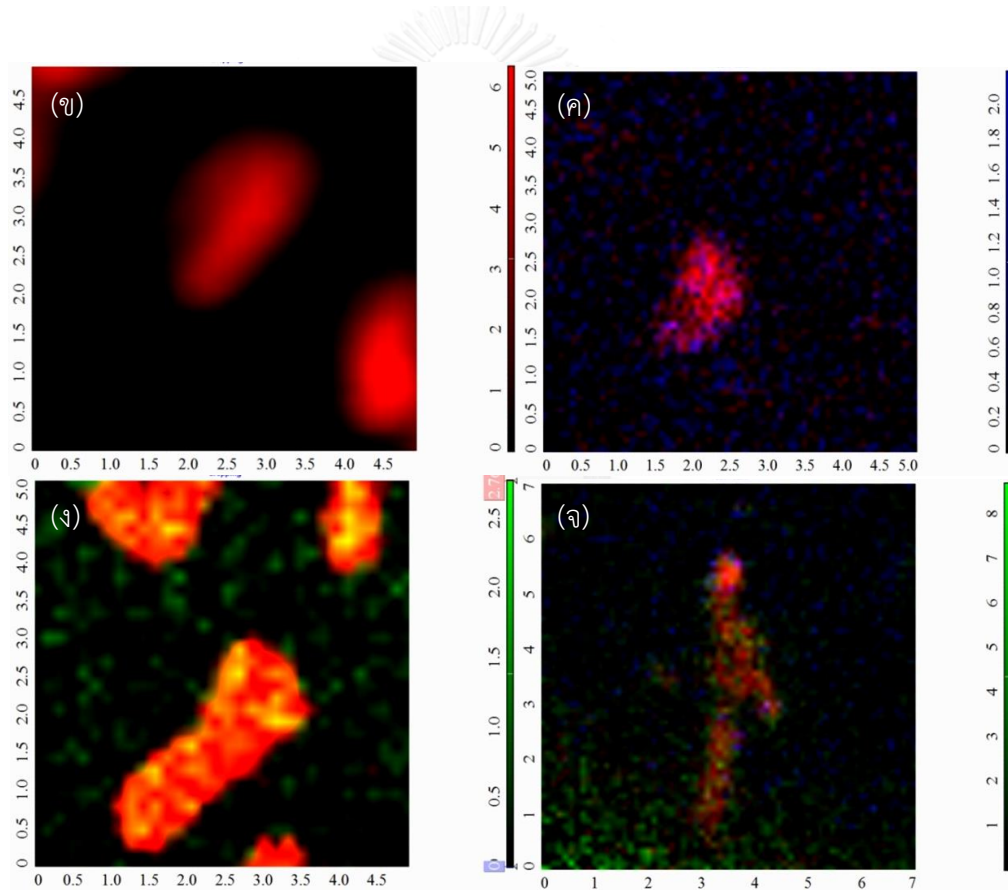
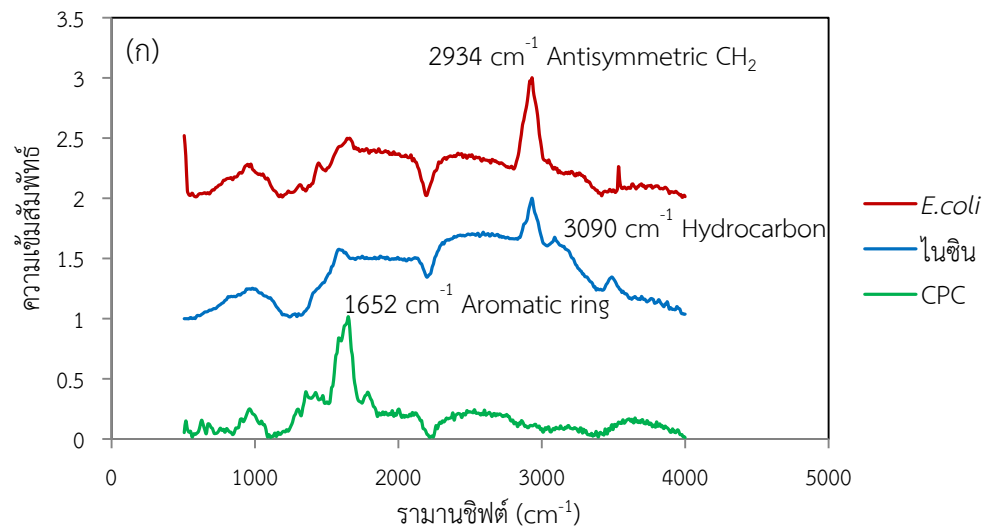
ภาพแผนที่รามานของเซลล์ *E. coli* ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน ขนาด 5x5 ไมโครเมตร แสดงดังรูปที่ 4.17ค โดยพิครามานของไนซินที่ 3090 cm^{-1} (น้ำเงิน) แสดงให้เห็นว่าไนซินกระจายตัวอยู่บนผิวเซลล์ (แดง) ที่มีรูปร่างผิดปกติ แสดงสีแดงไม่ชัดเจนบางตำแหน่ง รูปร่างสั้นเกือบกลม ซึ่งไนซินบนผิวเซลล์นี้บางตำแหน่งแสดงออกมาเป็นสีม่วงเนื่องจากเกิดภาพซ้อนทับกันระหว่างสีน้ำเงินและสีแดง นอกจากนี้ยังพบการกระจายตัวของไนซิน (น้ำเงิน) ในบริเวณต่างๆโดยรอบ

ภาพแผนที่รามานของเซลล์ *E. coli* ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ขนาด 5x5 ไมโครเมตร แสดงดังรูปที่ 4.17ง โดยพิครามานของ CPC ที่ 1652 cm^{-1} (เขียว) แสดงให้เห็นว่า CPC กระจายตัวอยู่บนผิวเซลล์ (แดง) ที่มีรูปร่างผิดปกติ ผิวเซลล์ไม่เรียบ แต่ยังคงมีรูปร่างแท่ง โดย CPC บนผิวเซลล์นี้แสดงออกมาเป็นสีเหลืองเนื่องจากเกิดภาพซ้อนทับกันระหว่างสีเขียวและสีแดง นอกจากนี้ยังพบการกระจายตัวของ CPC (เขียว) ในบริเวณต่างๆโดยรอบ

ภาพแผนที่รามานของเซลล์ *E. coli* ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน-CPC ขนาด 7x7 ไมโครเมตร แสดงดังรูปที่ 4.17จ โดยพิครามานของไนซินและ CPC ที่ 3090 cm^{-1} และ 1652 cm^{-1} ตามลำดับแสดงให้เห็นว่าทั้งไนซิน (น้ำเงิน) และ CPC (เขียว) กระจายตัวอยู่บนผิวเซลล์ (แดง) ซึ่งเกาะกลุ่มกัน แสดงสีแดงไม่ชัดเจน ผิวเซลล์ไม่เรียบ นอกจากนี้ยังพบว่าไนซินและ CPC มีการกระจายตัวที่แยกกัน โดยพบ CPC (เขียว) กระจายตัวอยู่ด้านล่าง และไนซิน (น้ำเงิน) กระจายตัวอยู่ด้านบน

ในการศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ด้วยเทคนิครามานนั้นไม่สามารถดำเนินการได้ เนื่องจากเครื่องที่ใช้ทำการทดลองข้างต้นไม่สามารถใช้งานได้ตามปกติซึ่งใช้เวลาในการซ่อมแซม ทำให้ระยะเวลาในการทดลองนั้นไม่เพียงพอ จึงไม่สามารถทำการทดลองได้

ผลจากการศึกษาภายใต้กล้องรามานสเปกโตรมิเตอร์พบว่าเกิดการกระเจิงแสงที่รูปแบบแตกต่างกันโดยไนซิน, CPC และเซลล์ *E. coli* แสดงพิครามานที่ 3090 cm^{-1} , 1652 cm^{-1} และ 2934 cm^{-1} ตามลำดับ ซึ่งพีคของ CPC สอดคล้องกับผลของ (Sun และคณะ (1990)) และพีคของ *E. coli* สอดคล้องกับ Naja และคณะ, 2007 การศึกษาตำแหน่งการทำงานของสารออกฤทธิ์พบว่าบนผิวเซลล์นั้นมีทั้งไนซินและ CPC กระจายตัวอยู่ในรูปแบบสุ่มแต่บริเวณรอบเซลล์นั้นพบว่าสารทั้งสองชนิดมีการกระจายตัวที่แยกกัน อาจเนื่องมาจากไนซินและ CPC มีประจุรวมเป็นบวก (petroc) ส่งผลให้ทั้งสองสารมีสภาพขั้วเดียวกันทำให้เกิดการผลักกัน ดังนั้นจึงอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้สารทั้งสองชนิดเมื่อทำงานร่วมกันแล้วไม่มีความแตกต่างระหว่างการทำงานเชิงเดี่ยวหรือทำงานร่วมกัน ทั้งนี้ต้องมีการศึกษาอย่างละเอียดต่อไป



รูปที่ 4.17 กราฟสเปกตรัมรามาน (ก) ของ *E. coli* (2934 cm^{-1}) ไนซิน (3090 cm^{-1}) และ CPC (1652 cm^{-1}) และภาพแผนที่รามานของ *E. coli* (ข) และ *E. coli* ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน (ค), CPC (ง) และไนซิน-CPC (จ) ที่ความเข้มข้น MIC นาน 24 ชั่วโมง

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของไนซินและ CPC สามารถสรุปได้ว่าค่า MIC ของไนซินและ CPC ต่อการออกฤทธิ์ยับยั้ง *L. monocytogenes* คือ 125 IU/มิลลิลิตร และ 0.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ค่า MIC ต่อการออกฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* คือ 30,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 3.175 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งการศึกษากการทำงานร่วมกันของไนซินและ CPC ด้วยการคำนวณค่าดัชนี FIC พบว่า ไนซินและ CPC ไม่มีความแตกต่างระหว่างการทำงานเชิงเดี่ยวหรือทำงานร่วมกัน (indifference) อย่างไรก็ตามเมื่อนำ *L. monocytogenes* และ *E. coli* ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซิน, CPC และไนซิน-CPC ที่ความเข้มข้น MIC มาศึกษาด้วยกล้อง FE-SEM และ AFM สามารถสรุปได้ว่า ไนซินและ CPC เมื่อทำงานร่วมกันแล้วมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์แบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้อย่างรุนแรง เซลล์มีความผิดปกติมากกว่าการทำงานเชิงเดี่ยว นอกจากนี้ผลจากการศึกษาด้วยกล้อง AFM นั้นสามารถแสดงให้เห็นถึงข้อมูลอย่างละเอียดของเซลล์มีชีวิตที่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งมีการเตรียมตัวอย่างที่ง่ายไม่ยุ่งยาก และรวดเร็ว ภาพได้ที่จึงเป็นภาวะที่เกิดขึ้นใกล้เคียงกับภาวะแวดล้อมตามธรรมชาติมากกว่า การใช้เครื่องมืออื่นๆ ดังนั้นการศึกษการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เนื่องจากสารออกฤทธิ์ด้วยกล้อง AFM จึงเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพมาก สำหรับการศึกษาดำเน่งการทำงานของสารออกฤทธิ์ด้วยเทคนิครามานนั้นแสดงให้เห็นว่าเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะ สามารถใช้ในการศึกษาสารชีวโมเลกุลและแผนที่รามานนั้นสามารถแสดงให้เห็นถึงตำแหน่งของสารออกฤทธิ์บนผิวเซลล์แบคทีเรียได้อย่างแม่นยำ ซึ่งเครื่องมือทั้งสองชนิดนี้เป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยสารชีวโมเลกุล และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาสารนอมอาหารที่ใช้ในอุตสาหกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

รายการอ้างอิง

- Al-Musallam TA, Evans CA, Drummond JL, Matasa C & Wu CD (2006) Antimicrobial properties of an orthodontic adhesive combined with cetylpyridinium chloride. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 129: 245–251.
- Albert-Kiszely A, Pjetursson BE, Salvi GE, Witt J, Hamilton A, Persson GR & Lang NP (2007) Comparison of the effects of cetylpyridinium chloride with an essential oil mouth rinse on dental plaque and gingivitis - a six-month randomized controlled clinical trial. *Journal Clinical Periodontol* 34: 658-667.
- Alonso-Sarduya L, Roduit C, Dietler G & Kasas S (2011) Human topoisomerase II–DNA interaction study by using atomic force microscopy. *FEBS Letters* 585: 3139–3145.
- Arauz LJ, Jozala AF, Mazzola PG & Vessoni Penna TC (2009) Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science and Technology* 20: 146-154.
- Arques JL, Rodriguez E, Gaya P, Medina M & Nunez M (2005) Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *International Dairy Journal* 15: 893-900.
- Asaduzzaman SM & Sonomoto K (2009) Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. *Journal of bioscience and bioengineering* 107: 475-487.
- Ashton L, Lau K, Winder CL & Goodacre R (2011) Raman spectroscopy: lighting up the future of microbial identification. *Future microbiology* 6: 991-997.
- Baaloushaa M & Lead JR (2013) Characterization of natural and manufactured nanoparticles by atomic force microscopy: Effect of analysis mode, environment and sample preparation, *Colloids and Surfaces A. Physicochemistry Engineering Aspects* 419: 238–247.
- Bauer R & Dicks LM (2005) Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *International journal of food microbiology* 101: 201-216.

- Beckmanna MA, Venkataramanc S, Doktycza MJ, Natarod MJ, Sullivana CJ, Morrell-Falvey JL & D.P. A (2006) Measuring cell surface elasticity on enteroaggregative *Escherichia coli* wild type and dispersin mutant by AFM. *Ultramicroscopy* 106: 695–702.
- Black EP, Kelly AL & Fitzgerald GF (2005) The combined effect of high pressure and nisin on inactivation of microorganisms in milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6: 286-292.
- Bogner A, Jouneau PH, Thollet G, Basset D & Gauthier C (2007) A history of scanning electron microscopy developments: Towards “wet-STEM” imaging. *Journal of Micron* 38: 390–401.
- Bosilevac JM, Arthur TM, Wheeler TL, Shackelford SD, Rossman M, Reagan JO & Koohmaraie M (2004) Prevalence of *Escherichia coli* O157 and levels of aerobic bacteria and Enterobacteriaceae are reduced when hides are washed and treated with cetylpyridinium chloride at a commercial beef processing plant. *Journal Food Protection* 67: 646-650.
- Bozaris IS & Adams MR (1999) Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of gram negatives. *International Journal of Food Microbiology* 53: 105-113.
- Breen PH, Compadre CM, Fifer EK, Salari H, Serbus DC & Lattin DL (1995) Quaternary ammonium compounds inhibit and reduce the attachment of viable *Salmonella* Typhimurium to poultry tissues. *Journal of Food Science* 60: 1191-1196.
- Breen PJ, Salari H & Compadre CM (1997) Elimination of *Salmonella* contamination from poultry tissues by cetylpyridinium chloride solutions. *Journal of Food Protection* 60: 1019-1021.
- Bumrah GS & Sharma RM (2015) Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*.
- Cantarero A (2015) Raman Scattering Applied to Materials Science. *Procedia Materials Science* 9: 113-122.

- Capellas M, Mor-Mur M, Gervilla R, Yuste J & Guamis B (2000) Effect of high pressure combined with mild heat or nisin on inoculated bacteria and mesophiles of goats' milk fresh cheese. *Food Microbiology* 17: 633-641.
- Chihib NE, Monnerat L & JM M (1999) Nisin, Temperature and pH effects on growth and viability of *Pectinatus frisingensis*, a Gram-negative, strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. *Journal of Apply Microbiology* 87: 438-446.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF & Chikindas ML (2001) Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71: 1-20.
- Cords BR (1983) *Sanitizers: Halogens and Surface-Active Agents*. New York, In Antimicrobials in Foods, edited by A.L Branen and P.M.Davidson. Marcel Dekker, Inc.
- Cotter PD, Collin CH & Paul RR (2005) Bacteriocin: Developing innate immunity for food. *Nature Microbiology Review* 3: 777-788.
- De Vuyst L & Vandamme EJ (1994) Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications. *Chapman & Hall* 152-199.
- Doktycz MJ, Sullivan CJ, Hoyt PR, Pelletier DA, Wu S & Allison DP (2003) AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces. *Ultramicroscopy* 97: 209-216.
- Dubes A, Parrot-Lopez H, Abdelwahed W, Degobert G, Fessi H, Shahgaldian P & Coleman AW (2003) Scanning electron microscopy and atomic force microscopy imaging of solid lipid nanoparticles derived from amphiphilic cyclodextrins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 55: 279-282.
- Dupard T, Janes ME, Beverly RL & Bell J (2006) Antimicrobial effect of cetylpyridinium chloride against *Listeria monocytogenes* growth on the surface of raw and cooked retail shrimp. *Journal of Food Science* 71: 241-244.

- Fang TJ & Tsai HC (2003) Growth patterns of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef treated with nisin, chelators, organic acids and their combinations immobilized in calcium alginate gels. *Food Microbiology* 20: 243-253.
- Francius G, Tesson B, Dague E, Martin-Jezequel V & Dufrene YF (2008) Nanostructure and nanomechanics of live *Phaeodactylum tricornutum* morphotypes. *Environ Microbiol* 10: 1344-1356.
- Fritzen-Garcia MB, Zanetti-Ramos BG, Oliveira CS, Soldi V, Pasa AA & Creczynski-Pasa TB (2009) Atomic force microscopy imaging of polyurethane nanoparticles onto different solid substrates. *Materials Science and Engineering* 29: 405-409.
- Gaboriaud F, Parcha BS, Gee ML, Holden JA & Strugnell RA (2008) Spatially resolved force spectroscopy of bacterial surfaces using force-volume imaging. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 62: 206-213.
- Gálvez A, Abriouel H, López RL & Omar NB (2007) Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 120: 51-70.
- Garcia-Graells C, Valckx C & Michiels C (2000) Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in milk by combined treatment with high hydrostatic pressure and the lactoperoxidase system. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4173-4179.
- Garde S, Gómez-Torres N, Hernández M & Ávila M (2014) Susceptibility of *Clostridium perfringens* to antimicrobials produced by lactic acid bacteria: Reuterin and nisin. *Food Control* 44: 22-25.
- Gorby YA, Yanina S, McLean JS, *et al.* (2006) Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 103: 11358–11363.
- Hilal N, Bowen WR, Alkhatib L & Ogunbiyi O (2006) A review of atomic force microscopy applied to cell interactions with membranes. *Chemical Engineering Research and Design* 84: 282-292.
- Hoffmann A, Pag U, Wiedemann I & Sahl HG (2001) Combination of antibiotic mechanisms in lantibiotics. *Il Farmaco* 57: 685-691.
- Hoover DG (1993) *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Academic Press.

- Howell NK, Arteaga G, Nakai S & Li-Chan ECY (1999) Raman spectral analysis in the c-h stretching region of proteins and amino acids for investigation of hydrophobic interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 924-933.
- Ishii S, Koki J, Unno H & Hori K (2004) Two morphological types of cell appendages on a strongly adhesive bacterium, *Acinetobacter* sp. strain Tol 5. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5026–5029.
- Jalili N & Laxminarayana K (2004) A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences. *Mechatronics* 14: 907-945.
- Jimenez-Villarreal JR, Pohlman FW, Johnson ZB & Brown AH (2003) Effects of chlorine dioxide, cetylpyridinium chloride, lactic acid and trisodium phosphate on physical, chemical and sensory properties of ground beef. *Meat Science* 65: 1055-1062.
- Jung G (1991) *Nisin and novel lantibiotics*. ESCOM, The Netherlands.
- Kang S & Elimelech M (2009) Bioinspired single bacterial cell force spectroscopy. *Langmuir* 25: 9656-9659.
- Kim J-W & Slavik MF (1996) Cetylpyridinium chloride (CPC) treatment on poultry skin to reduce attached *Salmonella*. *Journal of Food Protection* 59: 322-326.
- Kim JW & Slavik MF (1996) Cetylpyridinium chloride (CPC) treatment on poultry skin to reduce attached *Salmonella*. *Journal of Food Protection* 59: 322-326.
- Kim SH, Hyeong-Seon L, Deok-Seon R, Soo-Jae C & Dong-Seok L (2011) Antibacterial activity of silver-nanoparticles against staphylococcus aureus and *Escherichia coli*. *Korean Journal Microbiology Biotechnology* 39: 77-85.
- Kopermsub P, Mayen V & Warin C (2011) Potential use of niosomes for encapsulation of nisin and EDTA and their antibacterial activity enhancement. *Food Research International* 44: 605-612.
- Krafft C, Knetschke T, Funk RHW & Salzer R (2005) Identification of organelles and vesicles in single cells by Raman microspectroscopic mapping. *Vibrational Spectroscopy* 38: 85-93.

- Lewis RJ (1996) Cetylpyridinium Chloride Monohydrate. *Saxs Dangerous Properties of Industrial Materials* 9: 56-57.
- Lim K & Mustapha A (2007) Inhibition of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on sliced roast beef by cetylpyridinium chloride and acidified sodium chlorite. *Food microbiology* 24: 89-94.
- Liu S & Wang Y (2011) A review of the application of atomic force microscopy (AFM) in food science and technology. *Advances in food and nutrition research* 62: 201-240.
- Liu W & Hansen JN (1993) The antimicrobial effect of a structural variant of subtilin against outgrowing *Bacillus cereus* T spores and vegetative cells occurs by different mechanisms. *Apply Environmental Microbiology* 59: 648-651.
- Lonergan NE, Britt LD & Sullivan CJ (2013) Immobilizing live *Escherichia coli* for AFM studies of surface dynamics. *Ultramicroscopy* 137: 30-39.
- Lopez-Pedemonte T, Roig-Sagues AX, Trujillo AJ, Capellas M & Guamis B (2003) Inactivation of spores of *Bacillus cereus* in cheese by high hydrostatic pressure with the addition of nisin or lysozyme. *Journal of Dairy Science* 86: 3075-3081.
- Louise Meyera R, Zhoua X, Tanga L, Arpanaia A, Kingshotta P & Besenbachera F (2010) Immobilisation of living bacteria for AFM imaging under physiological conditions. *Ultramicroscopy* 110: 1349-1357.
- Lu X, Rasco BA, Kang DH, Jabal JMF, Aston DE & Konkel ME (2011) Infrared and Raman spectroscopic studies of the antimicrobial effects of garlic concentrates and diallyl constituents on foodborne pathogens. *Analytical Chemistry* 83: 4137-4146.
- Maisnear-Patin S, Deschamp N, Tatini SR & Richard J (1992) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait* 72: 249-263.
- Masschalck B, Van Houdt R & Miciels C (2001) High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *International Journal of Food Microbiology* 64: 325-332.

- Meincken M, Holroyd DL & M. R (2005) Atomic Force Microscopy Study of the Effect of Antimicrobial Peptides on the Cell Envelope of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 4085–4092.
- Meira SMM, Zehetmeyer G, Scheibel JM, Werner JO & Brandelli A (2016) Starch-halloysitenanocomposites containing nisin: Characterization and inhibition of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *LWT - Food Science and Technology* 68: 226-234.
- Meletiadiis J, Pournaras S, Roilides E & Walsh TJ (2010) Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, monte carlo simulation analysis, and in vitro-in vivo correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54: 602–609.
- Meyer RL, Zhou X, Tang L, Arpanaei A, Kingshott P & Besenbacher F (2010) Immobilisation of living bacteria for AFM imaging under physiological conditions. *Ultramicroscopy* 1-9.
- Millette M, Smoragiewicz W & Lacroix M (2004) Antimicrobial potential of immobilized *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 against selected bacteria. *Journal of Food Protection* 67: 1184-1189.
- Orange D, Knitile E, Farber D & Williams Q (1996) Raman spectroscopy of crude oils and hydrocarbon fluid inclusions: A feasibility study. *The Geochemical Society Special Publication* 5: 65-81.
- Palonpon AF, Sodeoka M & Fujita K (2013) Molecular imaging of live cells by Raman microscopy. *Current Opinion in Chemical Biology* 17: 708–715.
- Pawley J (1997) The development of field-emission scanning electron microscopy for imaging biological surfaces. *Journal of Scanning* 324-336.
- Pelling AE, Li Y, Shi W & Gimzewski JK (2005) Nanoscale visualization and characterization of *Myxococcus xanthus* cells with atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 6484-6489.

- Perumalla AVS & Hettiarachchy NS (2011) Green tea and grape seed extracts-Potential applications in food safety and quality. *Food Research International* 44: 827–839.
- Petrocci AN (1977) *Quaternary ammonium compounds*. Philadelphia, In disinfection, sterilization, and preservation, edited by S.S.Block. Lea and Febiger.
- Pohlman FW, Stivarius MR, McElyea KS & Waldroup AL (2002) Reduction of *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium, coliforms, aerobic bacteria, and improvement of ground beef color using trisodium phosphate or cetylpyridinium chloride before grinding. *Meat science* 60: 349-356.
- Ponce E, Pla R, Sendra E, Guamis B & Mor-Mur M (1998) Combined effect of nisin and high hydrostatic pressure on destruction of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* in liquid whole egg. *International Journal of Food Microbiology* 43: 15-19.
- Roberts CM & Hoover DG (1996) Sensitivity of *Bacillus coagulans* spores to combinations of high hydrostatic pressure, heat, acidity and nisin. *Journal of applied bacteriology* 81: 363-368.
- Schar-Zammaretti P & Ubbink J (2003) The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. *biophysical journal* 85: 4076-4092.
- Shin JM, Ateia I, Paulus JR, Liu H, Fenno JC, Rickard AH & Kapila YL (2015) Antimicrobial nisin acts against saliva derived multi-species biofilms without cytotoxicity to human oral cells. *Frontiers in Microbiology* 6: 617.
- Singh M, Gill V, Thippareddi H, Phebus RK, Marsden JL, Herald T & Nutsch AL (2005) Antimicrobial activity of cetylpyridinium chloride against *Listeria monocytogenes* on frankfurters and subsequent effect on quality attributes. *Journal of Food Protection*® 68: 1823-1830.
- Song J, Kong H & J. J (2011) Bacterial adhesion inhibition of the quaternary ammonium functionalized silica nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 82: 651-656.
- Stukalov O, Korenevsky A, Beveridge TJ & Dutcher JR (2008) Use of atomic force microscopy and transmission electron microscopy for correlative studies of bacterial capsules. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 5457-5465.

- Suganthi V, Selvarajan E, Subathradevi C & Mohanasrinivasan V (2012) Lantibiotic nisin: Natural preservative from *Lactococcus lactis*. *International research journal of pharmacy* 3: 13-19.
- Sun S, Birke RL & J.R. L (1990) Surface-enhanced Raman spectroscopy of surfactants on silver electrodes. *Journal of Physical Chemistry* 94: 2005-2010.
- Sureshkumar S, Kalaikannan A, Dushyanthan K & Venkataramanujam V (2010) Effect of Nisin and butylated hydroxyl anisole on stage stability of buffalo meat sausage. *Journal of food science and technology* 47: 358-363.
- Szymanska-Chargot M, Pieczywek PM, Chylinska M & Zdunek A (2016) Hyperspectral image analysis of Raman maps of plant cell walls for blind spectra characterization by nonnegative matrix factorization algorithm. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 151: 136-145.
- Taylor S & Somers E (1987) Evaluation of the antibotulinal effectiveness of nisin in bacon. *Journal of Food protection* 48: 949-952.
- Thongbai B, Waites WM & Gasaluck P (2005) The susceptibility of bioluminescent *Salmonella* Typhimurium contaminating chicken carcasses to cetylpyridinium chloride and nisin. *Kasetsart Journal (Natural Science)* 39: 622 – 632.
- Thongbai B, Gasaluck P & Waites WM (2006) Morphological changes of temperature- and pH-stressed *Salmonella* following exposure to cetylpyridinium chloride and nisin. *LWT - Food Science and Technology* 39: 1180-1188.
- Vadillo-Rodriguez V, Beveridge TJ & Dutcher JR (2008) Surface viscoelasticity of individual gram-negative bacterial cells measured using atomic force microscopy. *Journal of Bacteriology* 190: 4225-4232.
- Vahabi S, Nazemi Salman B & A. J (2013) Atomic force microscopy application in biological research: A Review Study. *Iran Journal of Medical Science* 38: 76-83.
- Velegol SB & Tilton RD (2002) Specific counterion effects on the competitive co-adsorption of polyelectrolytes and ionic surfactants. *Journal of colloid and interface science* 249: 282-289.
- Vernon-Parry KD (2000) Scanning Electron Microscopy: an introduction. *Ill-Vs Review* 13: 40-44.

- Wang H, Li Y & Slavik MF (2001) Efficacy of cetylpyridinium chloride in immersion treatment for reducing populations of pathogenic bacteria on fresh-cut vegetables. *Journal of Food Protection* 64: 2071-2074.
- Wang W-C, Li Y, Slavik MF & Xiong H (1997) Trisodium phosphate and cetylpyridinium chloride spraying on chicken skin to reduce attached *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Food Protection*® 60: 992-994.
- Wiedemann I, Breukink E, Van Kraaij C, Kuipers OP, Bierbaum G, De Kruijff B & Sahl HG (2001) Specific binding of nisin to peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J Biol Chem* 276: 1772-1779.
- Willey JM & Van Der Donk WA (2007) Antibiotics: Peptides of diverse structure and function. *Annual Review of Microbiology* 61: 477-501.
- Yang H, Cheng Y, Swem BL & Li Y (2003) Efficacy of cetylpyridinium chloride on *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 in immersion spray treatment of fresh-cut lettuce. *Journal of Food Science* 68: 1008-1012.
- Zendo T, Fukao M, Ueda K, Higuchi T, Nakayama J & 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. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 67: 1616-1619.
- Zhang Y, Hong H & Cai W (2010) Imaging with Raman Spectroscopy. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 11: 654-661.
- กุลวัฒนศาล ห (2008) การเตรียมไนซินในรูปอนุภาคนาโนแบบไขมันแข็งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ. วิทยานิพนธ์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ทองใบ บ (2010) ผลของเซทิลไพริดีเนียมคลอไรด์และกรดแลคติกต่อการยับยั้ง *Escherichia coli* O157:H7 บนถั่วงอก. ว วิทยาศาสตร์เกษตร 41: 83-86.
- ขอไพบูลย์ ป (2548) ผลของ Cetylpyridinium chloride , Potassium sorbate และ Trisodium phosphate และการใช้สารร่วมกันต่อการยับยั้งเชื้อ *Escherichia Coli* บนผิวเนื้อสุกร. รายงานประชุมวิชาการ สาขาสัตวบาล/สัตวศาสตร์/สัตวแพทย์ ครั้งที่ 5 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อ้างอิงเว็บไซต์

Henderson, C. Electronic Gun Configurations for Scanning Electronic Microscopes [Internet]. Semitracks, Inc., USA. 2015 [cited May 30, 2016]. Available from: <http://www.semitracks.com/blog>

JPK Instrument. Atomic Force Microscopy: QI™ Mode [Internet]. Germany. 2016 [cited May 30, 2016]. Available from: <http://www.jpk.com/qi-advanced.665.en.html>

Nada, M.H. Scanning Electron Microscopy [Internet]. Department of Chemistry, University of Iowa, USA. 2015 [cited May 30, 2016]. Available from: <http://bioaccent.org/microbiology/microbiology05.php>

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=16219761, Nisin from *Lactococcus Lactis* [Internet]. USA. 2016 [cited May 30, 2016]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/162197>

Perio-Expertise. Cetylpyridiniumchloride [Internet]. Dentaïd, Spain. 2015 [cited May 30, 2016]. Available from: www.perioexpertise.com/en/cetylpyridinium-chloride-cpc

Research Group Electrochemical and Surface Engineering. Raman spectroscopy [Internet]. Vrije Universiteit Brussel, Belgium. 2016 [cited May 30, 2016]. Available from: <http://www.surfgroup.be/raman>

The Prashant Kamat Laboratory. Spectroscopic Characterization: Raman Spectroscopy [Internet]. University of Notre Dame, Indiana, USA. 2012 [cited May 30, 2016]. Available from: https://www3.nd.edu/~kamatlab/facilities_spectroscopy.html



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหาร TSB (Tryptic Soy Broth) แบบสำเร็จรูปซึ่งมีส่วนประกอบเป็น (กรัม/ลิตร)

Casein Digest Peptone	17.0	กรัม
Papaic Digest of Soybean Meal	3.0	กรัม
ไดโซเดียมฟอสเฟต	2.5	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม

นำ 30 กรัม มาผสมกับน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้ได้ประมาณ 7.0 และปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

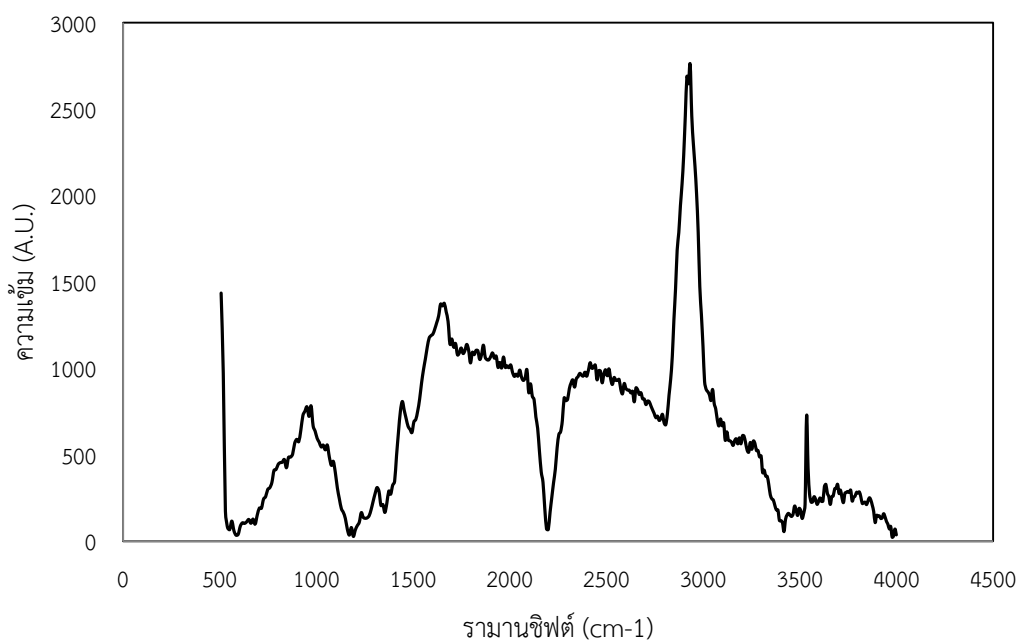
สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 7.4 ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร ประกอบด้วย

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.24	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.44	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม

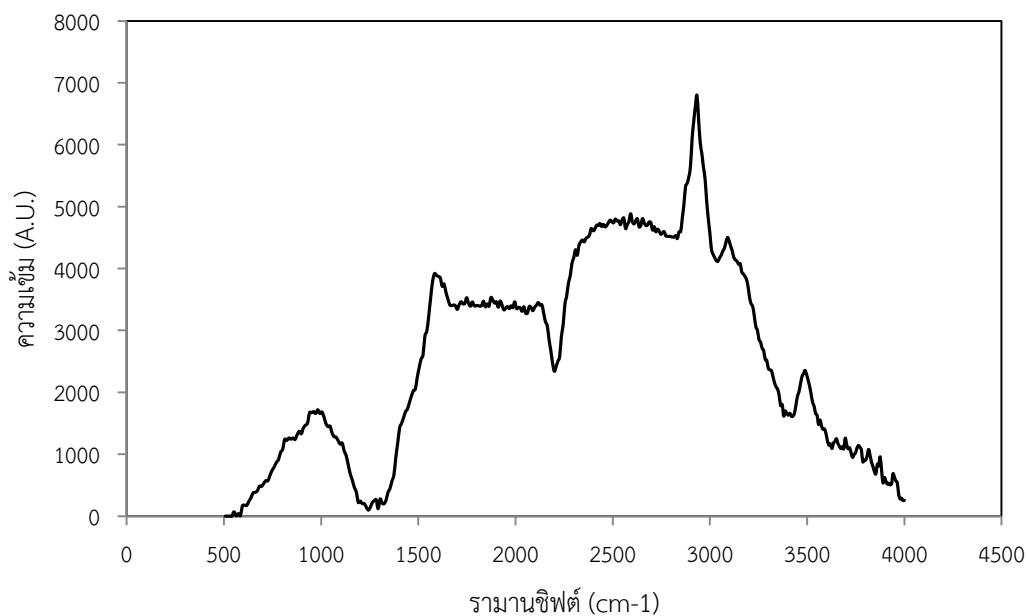
ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และไฮโดรคลอริก

ภาคผนวก ข

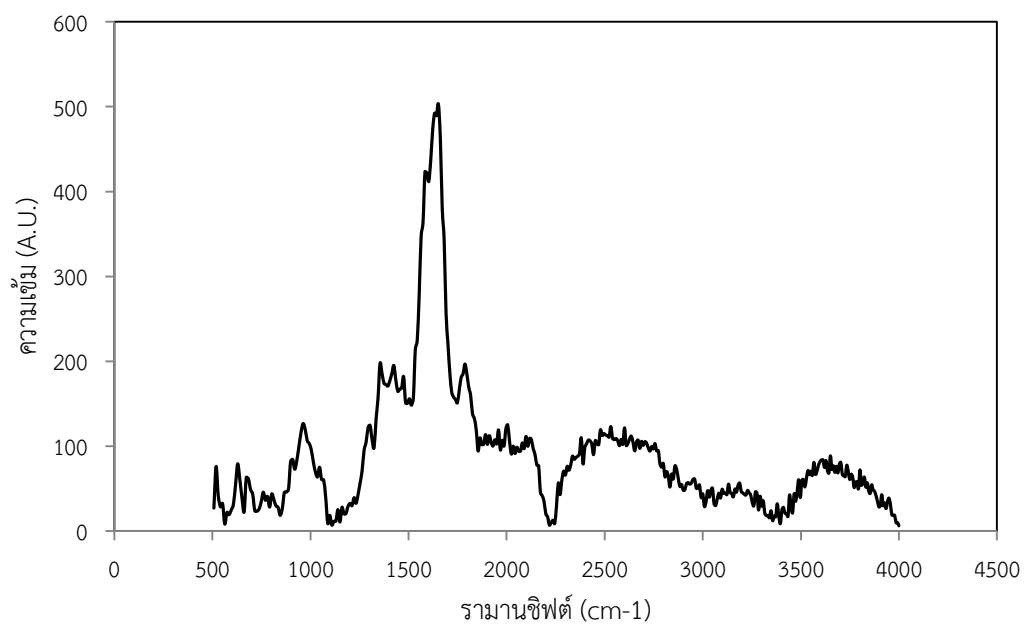
ผลการกระเจิงแสงแบบรามานจากเครื่องรามานสเปกโตรมิเตอร์และค่าการดูดกลืนแสงของ *L. monocytogenes* และ *E. coli* ที่ถูกยับยั้งด้วยไนซินและ CPC



รูปที่ ข1 กราฟสเปกตรัมรามานของ *E. coli* ATCC 25922 โดยใช้เทคนิค SERS ด้วยซิลเวอร์นาโน ที่ 532 นาโนเมตร



รูปที่ ข2 กราฟสเปกตรัมรามานของไนซินโดยใช้เทคนิค SERS ด้วยซิลเวอร์นาโน ที่ 532 นาโนเมตร



รูปที่ ข3 กราฟสเปกตรัมรามานของ CPC โดยใช้เทคนิค SERS ด้วยซิลเวอร์นาโน ที่ 532 นาโนเมตร



ตารางที่ ข1 ค่าดูดกลืนแสง (OD₄₅₀) ของ *L. monocytogenes* ที่ถูกยับยั้งด้วยโนซิน ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น CPC (µg/ml)	การทดลอง			ค่าเฉลี่ย	SD*	เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น CPC (µg/ml)	การทดลอง			ค่าเฉลี่ย	SD*
		1	2	3					1	2	3		
0	250.0	0.075	0.072	0.072	0.073	0.0017	24	250.0	0.069	0.065	0.064	0.066	0.0026
	150.0	0.074	0.073	0.069	0.072	0.0026		150.0	0.063	0.066	0.066	0.065	0.0017
	125.0	0.072	0.073	0.071	0.072	0.0010		125.0	0.066	0.065	0.067	0.066	0.0010
	100.0	0.071	0.075	0.073	0.073	0.0020		100.0	0.352	0.347	0.348	0.349	0.0026
	62.5	0.075	0.075	0.072	0.074	0.0017		62.5	0.386	0.381	0.379	0.382	0.0036
6	250.0	0.074	0.073	0.072	0.073	0.0010	30	250.0	0.067	0.065	0.066	0.066	0.0010
	150.0	0.070	0.071	0.075	0.072	0.0026		150.0	0.063	0.066	0.063	0.064	0.0017
	125.0	0.071	0.071	0.074	0.072	0.0017		125.0	0.072	0.069	0.069	0.070	0.0017
	100.0	0.075	0.070	0.074	0.073	0.0026		100.0	0.336	0.34	0.341	0.339	0.0026
	62.5	0.073	0.072	0.077	0.074	0.0026		62.5	0.358	0.36	0.359	0.359	0.0010
18	250.0	0.074	0.074	0.071	0.073	0.0017	48	250.0	0.067	0.065	0.063	0.065	0.0020
	150.0	0.073	0.072	0.071	0.072	0.0010		150.0	0.063	0.065	0.064	0.064	0.0010
	125.0	0.072	0.071	0.073	0.072	0.0010		125.0	0.072	0.076	0.077	0.075	0.0026
	100.0	0.210	0.211	0.215	0.212	0.0026		100.0	0.364	0.359	0.36	0.361	0.0026
	62.5	0.386	0.389	0.389	0.388	0.0017		62.5	0.506	0.507	0.505	0.506	0.0010

*SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

ตารางที่ ๗2 ค่าดูดกลืนแสง (OD₄₅₀) ของ *L. monocytogenes* ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น CPC (µg/ml)	การทดลอง			ค่าเฉลี่ย	SD*	เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น CPC (µg/ml)	การทดลอง			ค่าเฉลี่ย	SD*
		1	2	3					1	2	3		
0	12.50	0.073	0.074	0.072	0.073	0.0010	24	12.50	0.067	0.065	0.066	0.066	0.0010
	6.25	0.072	0.072	0.072	0.072	0.0000		6.25	0.062	0.066	0.066	0.067	0.0026
	3.17	0.073	0.072	0.071	0.072	0.0010		3.17	0.067	0.064	0.067	0.066	0.0017
	1.50	0.071	0.074	0.074	0.073	0.0017		1.50	0.075	0.074	0.07	0.073	0.0026
	0.75	0.073	0.075	0.074	0.074	0.0010		0.75	0.074	0.075	0.073	0.075	0.0010
	12.50	0.073	0.073	0.073	0.073	0.0000		12.50	0.065	0.067	0.066	0.066	0.0010
6	6.25	0.073	0.073	0.07	0.072	0.0017	30	6.25	0.062	0.066	0.066	0.064	0.0020
	3.17	0.071	0.073	0.072	0.072	0.0010		3.17	0.07	0.071	0.069	0.070	0.0010
	1.50	0.072	0.072	0.075	0.073	0.0017		1.50	0.068	0.071	0.068	0.069	0.0017
	0.75	0.073	0.075	0.074	0.074	0.0010		0.75	0.073	0.074	0.075	0.074	0.0010
	12.50	0.073	0.074	0.072	0.073	0.0010		12.50	0.065	0.064	0.066	0.065	0.0010
	6.25	0.073	0.071	0.072	0.072	0.0010		6.25	0.063	0.066	0.063	0.064	0.0017
18	3.17	0.072	0.072	0.072	0.072	0.0000	48	3.17	0.073	0.074	0.078	0.075	0.0026
	1.50	0.073	0.07	0.073	0.072	0.0017		1.50	0.069	0.072	0.072	0.071	0.0017
	0.75	0.074	0.075	0.073	0.075	0.0010		0.75	0.069	0.069	0.069	0.069	0.0000

*SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

ตารางที่ ข3 ค่าดูดกลืนแสง (OD₄₅₀) ของ *E. coli* ที่ถูกยับยั้งด้วยโนซิน ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น CPC (µg/ml)	การทดลอง			ค่าเฉลี่ย	SD*	เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น CPC (µg/ml)	การทดลอง			ค่าเฉลี่ย	SD*
		1	2	3					1	2	3		
0	30,000	0.252	0.252	0.255	0.253	0.0017	24	30,000	0.225	0.225	0.225	0.225	0.0000
	20,000	0.165	0.163	0.164	0.164	0.0010		20,000	0.409	0.412	0.412	0.411	0.0017
	15,000	0.181	0.185	0.183	0.183	0.0020		15,000	0.608	0.610	0.609	0.609	0.0010
	10,000	0.194	0.194	0.197	0.195	0.0017		10,000	0.614	0.612	0.613	0.613	0.0010
	5,000	0.144	0.142	0.143	0.143	0.0010		5,000	0.549	0.553	0.551	0.551	0.0020
6	30,000	0.257	0.258	0.256	0.257	0.0010	30	30,000	0.296	0.298	0.297	0.297	0.0010
	20,000	0.218	0.218	0.215	0.217	0.0017		20,000	0.537	0.539	0.541	0.539	0.0020
	15,000	0.230	0.235	0.234	0.233	0.0026		15,000	0.629	0.628	0.630	0.629	0.0010
	10,000	0.221	0.224	0.221	0.222	0.0017		10,000	0.631	0.634	0.631	0.632	0.0017
	5,000	0.137	0.139	0.138	0.138	0.0010		5,000	0.557	0.557	0.557	0.557	0.0000
18	30,000	0.297	0.299	0.298	0.298	0.0010	48	30,000	0.316	0.315	0.317	0.316	0.0010
	20,000	0.436	0.440	0.441	0.439	0.0026		20,000	0.751	0.754	0.751	0.752	0.0017
	15,000	0.565	0.566	0.570	0.567	0.0026		15,000	0.794	0.794	0.797	0.795	0.0017
	10,000	0.609	0.612	0.612	0.611	0.0017		10,000	0.762	0.761	0.766	0.763	0.0026
	5,000	0.549	0.549	0.546	0.548	0.0017		5,000	0.675	0.671	0.673	0.673	0.0020

*SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

ตารางที่ ๗4 ค่าดูดกลืนแสง (OD₄₅₀) ของ *E. coli* ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น CPC (µg/ml)	การทดลอง			ค่าเฉลี่ย	SD*	เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น CPC (µg/ml)	การทดลอง			ค่าเฉลี่ย	SD*
		1	2	3					1	2	3		
0	12.50	0.101	0.103	0.102	0.102	0.0010	24	12.50	0.155	0.155	0.155	0.155	0.0000
	6.25	0.163	0.165	0.164	0.164	0.0010		6.25	0.162	0.159	0.162	0.161	0.0017
	3.17	0.143	0.143	0.143	0.143	0.0000		3.17	0.168	0.17	0.169	0.169	0.0010
	1.50	0.195	0.194	0.196	0.195	0.0010		1.50	0.612	0.615	0.612	0.613	0.0017
	0.75	0.144	0.143	0.142	0.143	0.0010		0.75	0.55	0.552	0.551	0.551	0.0010
6	12.50	0.185	0.188	0.188	0.187	0.0017	30	12.50	0.198	0.195	0.198	0.197	0.0017
	6.25	0.128	0.126	0.127	0.127	0.0010		6.25	0.16	0.158	0.159	0.159	0.0010
	3.17	0.134	0.135	0.13	0.133	0.0026		3.17	0.227	0.23	0.23	0.229	0.0017
	1.50	0.221	0.223	0.222	0.222	0.0010		1.50	0.611	0.614	0.614	0.632	0.0017
	0.75	0.139	0.137	0.138	0.138	0.0010		0.75	0.556	0.556	0.559	0.557	0.0017
18	12.50	0.197	0.199	0.198	0.198	0.0010	48	12.50	0.177	0.177	0.174	0.176	0.0017
	6.25	0.138	0.138	0.141	0.139	0.0017		6.25	0.152	0.151	0.153	0.152	0.0010
	3.17	0.166	0.169	0.166	0.167	0.0017		3.17	0.214	0.217	0.214	0.215	0.0017
	1.50	0.609	0.612	0.612	0.611	0.0017		1.50	0.762	0.764	0.763	0.763	0.0010
	0.75	0.547	0.55	0.547	0.548	0.0017		0.75	0.673	0.674	0.672	0.673	0.0010

*SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

ตารางที่ 15 ค่าดูดกลืนแสง (OD₄₅₀) ของ *L. monocytogenes* ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้น 0.75 µg/ml และในชั้นที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น CPC (µg/ml)	การทดลอง			SD*	เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น CPC (µg/ml)	การทดลอง			ค่าเฉลี่ย	SD*
		1	2	3				1	2	3		
0	125.00	0.075	0.079	0.080	0.078	24	125.00	0.074	0.075	0.079	0.076	0.0026
	62.50	0.075	0.078	0.078	0.077		62.50	0.073	0.073	0.076	0.074	0.0017
	31.25	0.081	0.079	0.080	0.080		31.25	0.076	0.079	0.076	0.077	0.0017
	15.60	0.074	0.079	0.078	0.077		15.60	0.391	0.392	0.387	0.390	0.0026
	7.80	0.075	0.073	0.077	0.075		7.80	0.367	0.370	0.370	0.369	0.0017
6	125.00	0.073	0.076	0.076	0.075	32	125.00	0.075	0.078	0.078	0.077	0.0017
	62.50	0.072	0.077	0.076	0.075		62.50	0.072	0.072	0.075	0.073	0.0017
	31.25	0.075	0.079	0.080	0.078		31.25	0.077	0.077	0.077	0.077	0.0000
	15.60	0.074	0.076	0.075	0.075		15.60	0.324	0.323	0.319	0.322	0.0026
	7.80	0.085	0.084	0.080	0.083		7.80	0.335	0.340	0.336	0.337	0.0026
18	125.00	0.075	0.078	0.075	0.076	42	125.00	0.075	0.074	0.079	0.076	0.0026
	62.50	0.072	0.072	0.078	0.074		62.50	0.074	0.072	0.076	0.074	0.0020
	31.25	0.080	0.077	0.077	0.078		31.25	0.076	0.079	0.079	0.078	0.0017
	15.60	0.418	0.417	0.419	0.418		15.60	0.304	0.303	0.299	0.302	0.0026
	7.80	0.421	0.423	0.419	0.421		7.80	0.322	0.317	0.318	0.319	0.0026

*SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

ตารางที่ ๖ ค่าดูดกลืนแสง (OD₄₅₀) ของ *E. coli* ที่ถูกยับยั้งด้วย CPC ที่ความเข้มข้น 3.175 µg/ml และโนนินที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น CPC (µg/ml)	การทดลอง			ค่าเฉลี่ย	SD*	เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น CPC (µg/ml)	การทดลอง			ค่าเฉลี่ย	SD*
		1	2	3					1	2	3		
0	30,000	0.385	0.381	0.38	0.382	0.0026	24	30,000	0.395	0.394	0.39	0.393	0.0026
	20,000	0.227	0.227	0.221	0.225	0.0035		20,000	0.792	0.795	0.792	0.793	0.0017
	15,000	0.137	0.140	0.137	0.138	0.0017		15,000	0.757	0.761	0.762	0.760	0.0026
6	10,000	0.117	0.117	0.114	0.116	0.0017	32	10,000	0.669	0.668	0.664	0.667	0.0026
	30,000	0.355	0.360	0.359	0.358	0.0026		30,000	0.326	0.322	0.321	0.323	0.0026
	20,000	0.245	0.248	0.245	0.246	0.0017		20,000	0.873	0.875	0.874	0.874	0.0010
18	15,000	0.190	0.200	0.180	0.190	0.0100	42	15,000	0.854	0.855	0.853	0.854	0.0010
	10,000	0.204	0.203	0.199	0.202	0.0026		10,000	0.847	0.846	0.842	0.845	0.0026
	30,000	0.407	0.408	0.412	0.409	0.0026		30,000	0.342	0.343	0.344	0.343	0.0010
	20,000	0.471	0.471	0.477	0.473	0.0035		20,000	0.877	0.877	0.874	0.876	0.0017
	15,000	0.489	0.486	0.489	0.488	0.0017		15,000	0.833	0.836	0.836	0.835	0.0017
	10,000	0.535	0.538	0.535	0.536	0.0017		10,000	0.844	0.841	0.841	0.842	0.0017

*SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวฉัตรนภา อินทนนท์ เกิดเมื่อวันอังคารที่ 23 มกราคม พ.ศ. 2533 กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมจากโรงเรียนเตรียมอุดมศึกษา สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโทบัณฑิต ในสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555

ผลงานเผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมนำเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference : TSB 2015 ระหว่างวันที่ 17-20 พฤศจิกายน 2558 ณ โรงแรมแมนดาริน กรุงเทพมหานคร ในหัวข้อเรื่อง Investigation of nisin and cetylpyridinium chloride treated Escherichia coli using FE-SEM and Raman spectroscopy