



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการฤทธิ์การยับยั้งของไนซินและสารต้านจุลินทรีย์จากพืชต่อ
เซลล์ปกติและสปอร์ของแบคทีเรีย และผลกระทบจาก
องค์ประกอบในอาหาร

(Inhibitory effect of nisin and plant-derived antimicrobials on
vegetative and spore forms of bacteria and the interaction
with food constituents)

โดย นางสาววรรณพร คลังเพชร

กันยายน 2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการฤทธิ์การยับยั้งของไนซินและสารต้านจุลินทรีย์จากพืชต่อ
เซลล์ปกติและสปอร์ของแบคทีเรีย และผลกระทบจาก
องค์ประกอบในอาหาร

(Inhibitory effect of nisin and plant-derived antimicrobials on
vegetative and spore forms of bacteria and the interaction
with food constituents)

ผู้วิจัย นางสาววรรณพร คลังเพชร สังกัด มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ
มหาวิทยาลัยนเรศวร

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5880052

ชื่อโครงการ: ฤทธิ์การยับยั้งของไนซินและสารต้านจุลินทรีย์จากพืชต่อเซลล์ปกติและสปอร์ของแบคทีเรีย และผลกระทบจากองค์ประกอบในอาหาร

ชื่อนักวิจัย: นางสาววรรณพร คลังเพชร มหาวิทยาลัยนเรศวร

E-mail Address: wannapornk@nu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

คำหลัก: ไนซิน สารต้านเชื้อจากพืช ประสิทธิภาพร่วม แบคทีเรียก่อโรคในอาหาร สปอร์ องค์ประกอบอาหาร

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อศึกษาประสิทธิภาพและกลไกในการต้านเชื้อของไนซินและสารต้านเชื้อจากพืช ได้แก่ ซินนามาลดีไฮด์และคาร์วาครอลต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารทั้งในรูปแบบของเซลล์ปกติและสปอร์ ก่อนอื่นได้ทำการหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านเชื้อแต่ละชนิดเมื่อใช้เดี่ยว ๆ และใช้ร่วมกัน ต่อการยับยั้งเซลล์ปกติของแบคทีเรีย พบว่าเมื่อใช้ในซินร่วมกับซินนามาลดีไฮด์สามารถลดความเข้มข้นของสารต้านเชื้อแต่ละชนิดได้ถึง 2-64 เท่า โดยมีการออกฤทธิ์ตามแบบของซินนามาลดีไฮด์ เมื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ พบว่าเกิดการรั่วไหลของสารภายในเซลล์รวมถึง ATP นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงโปรไฟล์ของโปรตีนจากการทำ SDS-PAGE อีกด้วย ในระบบอาหารจำลองพบว่าความเข้มข้นของสารอาหารมีผลต่อประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อ โปรตีนที่เพิ่มขึ้นได้ส่งผลให้ประสิทธิภาพของซินนามาลดีไฮด์เพิ่มสูงขึ้นในขณะที่ประสิทธิภาพของไนซินยังคงที่หรือลดลงเล็กน้อย แป้งและไขมันทำให้ประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อจะมีค่าลดลง และเมื่อเพิ่มความเป็นกรดของระบบอาหารจำลองพบว่าประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อเพิ่มสูงขึ้น ส่วนในระบบอาหารจริงซึ่งใช้แซนดีวิชสเปรดมาทดสอบ พบว่าประสิทธิภาพร่วมในการต้านเชื้อสูงชันอย่างชัดเจน ไนซินและซินนามาลดีไฮด์ต่างก็มีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์และยับยั้งการเจริญหลังการงอกของสปอร์ *Bacillus cereus* โดยในการยับยั้งการเจริญหลังการงอกของสปอร์ เมื่อใช้ร่วมกันจะสามารถลดปริมาณของไนซินและซินนามาลดีไฮด์ได้ถึง 40 และ 8 เท่าตามลำดับ สำหรับการยับยั้งการงอก เมื่อใช้ร่วมกันจะสามารถลดความเข้มข้นของไนซินและซินนามาลดีไฮด์ได้ถึง 16 และ 32 เท่าตามลำดับ เมื่อศึกษากลไกการยับยั้งการงอก พบว่าสารสองชนิดนี้ได้ไปยับยั้งการปลดปล่อย DPA และลดสมบัติการย้อมติดสีของ DAPI อีกด้วย ผลงานวิจัยนี้ได้ชี้ให้เห็นถึงความสามารถในการลดระดับความเข้มข้นของสารต้านเชื้อแต่ละชนิด ส่งผลในการลดความเสี่ยงในการดื้อยาของแบคทีเรีย รวมถึงการลดต้นทุนการผลิตได้

Abstract

Project Code: TRG5880052

Project Title: Inhibitory effect of nisin and plant-derived antimicrobials on vegetative and spore forms of bacteria and the interaction with food constituents

Investigator: Miss Wannaporn Klangpetch, Naresuan University

E-mail Address: wannapornk@nu.ac.th

Project Period: 2 years

Keywords: Nisin, Plant-derived antimicrobial, Synergistic effect, Food-borne pathogenic bacteria, Spore, Food constituents

This research aims to investigate the combination efficiency of Nisin with Cinnamaldehyde and Carvacrol, plant-derived antimicrobials on vegetative and spore forms of food-borne pathogenic bacteria. Firstly, the Minimum Inhibitory Concentrations of the antimicrobials when used singly as well as in combination were determined. The results showed that applying in combination reduced the concentrations from 2-64 folds. The combined antimicrobial dynamic was in a good relation with that of Cinnamaldehyde. Bacterial intracellular cell damages occurred during treating with the antimicrobials were cytoplasmic membrane leakage, intracellular ATP depletion and change in total protein profile evaluated by SDS-PAGE. In complex food system, the concentration of ingredients directly affected the efficiency of the antimicrobials. Increasing protein increased Cinnamaldehyde's ability while decreased that of Nisin. Starch and oil decreased both antimicrobials' ability. Reducing pH value increased both antimicrobials' ability. The combination effect was also showed even in the Sandwich spread used as a representative of real food system. Nisin and Cinnamaldehyde showed the ability to inhibit the outgrowth and germination of *Bacillus cereus* spores. Combining these antimicrobials could reduce the minimum concentrations to 40 and 8 fold, respectively for anti-outgrowth and to 16 and 32 fold, respectively for anti-germination. The mechanisms were proved to be the abilities to inhibit the DPA release and DAPI staining properties of the spores. These results successfully suggested the synergistic effects of Nisin and plant-derived antimicrobials that could reduce the amount of each antimicrobial leading to safe the production cost as well as solve the problem on antimicrobial resistance of the pathogenic bacteria.

วัตถุประสงค์

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายหลักเพื่อศึกษาประสิทธิภาพร่วมของไนซินและสารต้านเชื้อจากพืชต่อเซลล์ปกติและสปอร์ของแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร ซึ่งจะทำให้สามารถลดระดับความเข้มข้นของสารต้านเชื้อแต่ละชนิด และลดความเสี่ยงในการดื้อยาของแบคทีเรีย ส่งผลในการลดต้นทุนในเรื่องของการจัดหาสารต้านเชื้อได้ โดยมีรายละเอียดของวัตถุประสงค์ดังนี้

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพร่วมของไนซินและสารต้านเชื้อจากธรรมชาติต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคในอาหารที่อยู่ในรูปแบบของเซลล์ปกติและสปอร์ และประสิทธิภาพต่อการงอกและการฆ่าสปอร์
2. เพื่อศึกษากลไกการต้านเชื้อแบคทีเรียของไนซิน สารต้านเชื้อจากธรรมชาติ และสารผสม
3. เพื่อศึกษาผลของสารอาหาร ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน รวมถึงค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่อประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียของไนซินและสารต้านเชื้อจากธรรมชาติ และการประยุกต์ใช้ในอาหารจริง

วิธีทดลอง

วิธีการทดลองในงานวิจัยนี้ได้แบ่งออกเป็นสองส่วน ได้แก่ ส่วนที่หนึ่ง การศึกษาประสิทธิภาพของ ไนซินร่วมกับซินนามาลดีไฮด์และ ไนซินร่วมกับคาร์วาครอล ต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ปกติของ แบคทีเรีย รวมถึงการงอกของสปอร์ และส่วนที่สอง ประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อดังกล่าวเมื่ออยู่ในโมเดล อาหารและอาหารจริง

Part I: การทดสอบประสิทธิภาพการต้านเชื้อของ ไนซิน -ซินนามาลดีไฮด์ และ ไนซิน -คาร์วาครอล ต่อเซลล์ปกติและสปอร์ของแบคทีเรีย

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและสปอร์และการเตรียมสารต้านเชื้อ

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่

แบคทีเรียแกรมบวก

Bacillus cereus NBRC 13494

Staphylococcus aureus TISTR 118

แบคทีเรียแกรมลบ

Escherichia coli TISTR 117

Salmonella Typhimurium NBRC105726 TIS

1.1 เซลล์ปกติของแบคทีเรีย

บ่มเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่ 30°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยง ที่ 6,000 rpm, 4°C เป็นเวลา 10 นาที และล้างเซลล์ด้วย 0.85% w/v Saline สามครั้ง จากนั้นปรับจำนวนเชื้อเริ่มต้นให้เป็น 10^6 CFU/ml เพื่อทำการทดลองต่อไป

1.2 สปอร์ของแบคทีเรีย

ทำการเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียสร้างสปอร์อ้างอิงวิธีการของผู้วิจัย (Klangpetch et al., 2013) กล่าวคือ นำเซลล์ปกติของ *B. cereus* ที่เตรียมไว้ใน 1.1 มาสเปรตบน Nutrient Agar (NA; Sigma-Aldrich Chemicals, Germany) โดยปรับความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น 80% และนำไปบ่มที่ 30°C นำส่วนหนึ่งของตัวอย่างมาสังเกตการสร้างสปอร์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase contrast (BX 50, Olympus Co., Tokyo, Japan) มากกว่า ทุกวันจนกว่าจะพบว่าเกิดการสร้างสปอร์ 90% (ใช้เวลาประมาณ 4 วัน) จากนั้นทำการรวบรวมสปอร์ที่ผลิตได้โดยใส่น้ำกลั่นที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อลงไปในงานเพาะเชื้อและเกลี่ยรวบรวม

สปอร์ จากนั้นทำการล้างสปอร์โดยทำการปั่นเหวี่ยงที่ 9,500x g ที่ 4°C เป็นระยะเวลา 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อสามครั้ง

1.3 การเตรียมสารต้านเชื้อ

สารต้านเชื้อที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีสามชนิด ได้แก่ ไนซิน ซินนามาลดีไฮด์ และคาร์วาครอล เตรียมไนซิน (Nisin; Sigma Aldrich from *Lactococcus lactis*, potency $\geq 1,000,000$ per IU/g, CAS Number 1414-45-5) โดยละลายใน 0.02 N HCl ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านฟิลเตอร์ 0.22 μm ที่ระดับความเข้มข้น 10^4 IU/ml เตรียมซินนามาลดีไฮด์ (Cinnamaldehyde; Sigma Aldrich, from cassia oil, purity $\geq 95\%$, natural and food grade, CAS Number 104-55-2) และคาร์วาครอล (Carvacrol; Sigma Aldrich, purity 99%, natural and food grade, CAS Number 499-75-2) โดยละลายในเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 50 mg/ml (Rajkovic et al., 2005; Ye et al., 2013)

2. การศึกษาประสิทธิภาพการต้านเชื้อของ ไนซิน -ซินนามาลดีไฮด์ และ ไนซิน -คาร์วาครอล ต่อเซลล์ปกติของแบคทีเรีย

2.1 การวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration; MIC)

ทำการวิเคราะห์ MIC ของสารต้านเชื้อแต่ละชนิดเมื่อใช้เดี่ยว ๆ และเมื่อใช้ร่วมกัน โดยใช้วิธี micro-broth dilution assay (Nedorostova et al., 2009) มีรายละเอียดดังนี้ ผสมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB) ปริมาตร 50 μl ใน 96-well plate ผสมกับสารต้านเชื้อแต่ละชนิดที่เจือจางขั้นละสองเท่า (2-fold dilution) ใน MHB ที่ความเข้มข้นดังนี้ ไนซิน : 5,000 – 39.06 IU/ml ซินนามาลดีไฮด์และคาร์วาครอล: 5-0.04 mg/ml ในปริมาณเดียวกัน หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ 35°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 nm (OD_{630}) ก่อนและหลังบ่ม และวิเคราะห์ MIC (Oh et al., 2011)

2.2 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพร่วมของ ไนซิน-ซินนามาลดีไฮด์ และ ไนซิน-คาร์วาครอล

ทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพร่วมของ ไนซิน -ซินนามาลดีไฮด์ และ ไนซิน -คาร์วาครอล โดยวิธี Checkerboard test (Fadli et al., 2012; Ma et al., 2013; Mackay et al., 2000) โดยมีวิธีการดังนี้ ผสมสารต้านเชื้อสองชนิดที่กำหนดความเข้มข้นที่แน่นอน (2MIC - MIC/64) โดยไล่ความเข้มข้นจากมากไปหาน้อยในแนวตั้งและแนวนอนของไมโครเพลท (column/ row) โดยกำหนดปริมาตรของสารแต่ละชนิดที่ 25 μl จากนั้นเติมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 50 μl และนำไปบ่มตามสภาวะข้างต้น ทำการวัดค่า OD_{630} ก่อนและหลังบ่ม และคำนวณหาค่า Fraction inhibitory concentration index (FIC_i) ตามสูตร

$$FIC_1 = \frac{MIC_{A/B}}{MIC_A} + \frac{MIC_{B/A}}{MIC_B}$$

เมื่อ

MIC_A - MIC ของสารต้านเชื้อ A

MIC_B - MIC ของสารต้านเชื้อ B

$MIC_{A/B}$ - MIC ของสารต้านเชื้อ A เมื่อผสมกับ B

$MIC_{B/A}$ - MIC ของสารต้านเชื้อ B เมื่อผสมกับ A

โดยมีการแปรผลดังนี้

Total synergism ($FIC_1 \leq 0.5$), partial synergism ($0.5 < FIC_1 \leq 0.75$), no effect ($0.75 < FIC_1 \leq 2$) or antagonism ($FIC_1 > 2$)

2.3 การวิเคราะห์ Antibacterial dynamic ของสารต้านจุลินทรีย์

ทำการวิเคราะห์ Antibacterial dynamic โดยวิธี liquid culture inhibition assay Hancock and Lehrer, 1998) โดยมีวิธีการเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ MIC แต่ทำการวัดค่า OD_{630} ทุก 2 ชั่วโมงของการบ่ม และคำนวณตามสูตรด้านล่าง

$$U = \sqrt{\frac{A_0 - A}{A_0}}$$

เมื่อ

U – Antibacterial dynamic

A_0 – ค่า OD_{630} ของตัวอย่างก่อนบ่ม

A – ค่า OD_{630} ของตัวอย่างหลังบ่ม ณ เวลาต่าง ๆ

3. การทดสอบกลไกการต้านเชื้อของสารต้านเชื้อจุลินทรีย์

ความเข้มข้นของสารต้านเชื้อแต่ละชนิดเมื่อใช้เดี่ยว ๆ และใช้ร่วมกันในการทดลองนี้ได้เลือกจากผลการทดลองในข้อ 2

3.1 การประเมินการรั่วของผนังเซลล์แบคทีเรีย

เนื่องจากมีรายงานถึงกลไกเบื้องต้นของการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารต้านเชื้อจากพืชว่าเป็นการรบกวนหรือทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรีย (Juven et al., 1994; Ultee et al., 1999) จึงได้ทำการประเมินการรั่วของผนังเซลล์แบคทีเรียโดยวัดการรั่วไหลของของเหลวภายในเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีการของผู้วิจัย (Klangpetch et. al, 2011) ทำโดยนำสารแขวนลอยแบคทีเรียก่อนบ่มและหลังบ่มร่วมกับสารต้านเชื้อ

มากรองผ่านฟิลเตอร์ขนาด 0.22 μm จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Thermo Scientific, Genesys, USA)

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณ ATP ภายในเซลล์ (Intracellular ATP; ATP_{in})

ทำการวิเคราะห์ปริมาณ ATP_{in} ของเชื้อแบคทีเรียก่อนบ่มและหลังบ่มร่วมกับสารต้านเชื้อตามวิธีของผู้วิจัย (Klangpetch et. al, 2011) โดยใช้ CheckLite™ 250 Plus kit (Kikkoman, Chiba, Japan) มีวิธีการดังนี้ เพื่อให้ปริมาณของ ATP ภายในเซลล์กระทบกับผลการทดลอง จึงได้ทำการกำจัด ATP ภายในเซลล์ ทำโดยผสมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 1 ml กับสารละลาย CheckLite™ ATP Eliminating Kit ปริมาตร 100 μl จากนั้น 30 นาที ได้แบ่งสารผสมดังกล่าวในปริมาตร 100 μl เติมด้วย ATP releasing agent ปริมาตร 100 μl ผสมให้เข้ากันเป็นระยะเวลา 20 วินาที จากนั้นเติมสารละลาย luciferin-luciferase reagent ปริมาตร 100 μl ผสมให้เข้ากัน และวัดการปลดปล่อยลูมิเนสเซนส์ด้วยเครื่อง Lumitester (C-110; Kikkoman, Japan) แสดงผลเป็นค่า Relative light units (RLU) สร้างกราฟมาตรฐานโดยหาความสัมพันธ์ของ RLU ของสาร ATP มาตรฐานที่ความเข้มข้น 10^{-12} – 10^{-7} M ตามขั้นตอนวิเคราะห์ข้างต้น

3.3 การวิเคราะห์โปรไฟล์โปรตีนทั้งหมด

ทำการเปรียบเทียบโปรไฟล์ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์แบคทีเรียก่อนบ่มและหลังบ่มร่วมกับสารต้านเชื้อ โดยทำการสกัดโปรตีน เริ่มจากการเติม protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich Inc., MO, USA) และ glass beads ลงไปในสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นทำการเขย่าอย่างรุนแรงเป็นระยะเวลา 30 นาที และกรองผ่านฟิลเตอร์ขนาด 0.22 μm ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารสกัดโปรตีนที่ได้ไปศึกษาโปรไฟล์โดยใช้การแยกโดย Sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

4. ประสิทธิภาพการต้านเชื้อของ ไนซิน -ซินนามาลดีไฮด์ และ ไนซิน-คาร์วาครอล ต่อสปอร์ของ *B. cereus*

4.1 การประเมินผลต่อการงอกของสปอร์

4.1.1 การวิเคราะห์อัตราเร็วในการงอกของสปอร์ (germination rate)

ในการศึกษาผลของสารต้านเชื้อต่อการงอกของสปอร์ *B. cereus* หลังผ่านการกระตุ้นด้วยความร้อน (Heat activation) ที่ 85°C เป็นระยะเวลา 15 นาที ตามวิธีของ Aouadhi et al. (2013) โดยกำหนดให้ OD₆₃₀ ของสปอร์อยู่ที่ 0.6-0.7 ขั้นต้นได้ทำการทดลองเพื่อเลือกใช้สารเร่งการงอกที่เหมาะสมที่สุดเพื่อเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Germination media) จากทั้งหมด 6 ชนิดดังนี้ L-alanine (A), L-asparagine (Asp), D-glucose (G), D-fructose (F), potassium ions (K) และสารผสมของ L-asparagine, D-glucose, D-fructose และ potassium ions (AGFK) โดยเติมสารเหล่านี้ที่ความเข้มข้น 10 mM ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่

มีสปอร์อยู่ และวัด OD₆₃₀ จากนั้นนำมาคำนวณหา %OD reduction เพื่อวิเคราะห์อัตราเร็วในการงอกของสปอร์ ณ เวลาต่าง ๆ ระหว่างการบ่มในช่วงระยะเวลา 60 นาที เทียบกับค่า OD₆₃₀ ก่อนบ่ม

4.1.2 การวิเคราะห์สมบัติการย้อมติดสี 4', 6-diamidino-2-phenylindole ของสปอร์ (DAPI staining properties)

เมื่อสปอร์เกิดการงอกจะทำให้น้ำและสารต่าง ๆ รวมถึงสารเรืองแสง 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ โดยสามารถศึกษาสมบัติในการย้อมติดสีของ DAPI ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนส์ ตามวิธีของ Yamashita et al. (2011) เริ่มจากการเตรียมสารละลาย DAPI ในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 1 mg/ml และทำการเจือจาง 1,000 เท่า ด้วยเมทานอล หลังจากปั่นเหวี่ยงที่ 7,000× g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 min ทำการผสมสารละลาย DAPI ที่เตรียมไว้ลงไปในตะกอนของสปอร์ ทำการบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อสามครั้ง และทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนส์ (BX50; Olympus Co., Tokyo, Japan) ที่ประกอบด้วยอุปกรณ์ชุดฟลูออเรสเซนส์ (BH2-RFL-T3, U-ULS100HG and BX-KLA; Olympus)

4.1.3 การวิเคราะห์สมบัติการปลดปล่อย Dipicolinic acid (DPA releasing properties)

ขณะที่เกิดการงอก สปอร์จะปลดปล่อย DPA ออกมานอกเซลล์ซึ่งส่งผลต่อการลดลงของความสามารถในการต้านทานความร้อนของสปอร์ ทำการวิเคราะห์ปริมาณ DPA โดยอ้างอิงวิธีการของ Shibata et al. (1993) เริ่มจากการปั่นเหวี่ยงสารแขวนลอยสปอร์ที่ 9,500× g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 min นำส่วนใสปริมาตร 100 µl เติมด้วยสารละลาย TbCl₃ 1 mM ปริมาตร 100 µl และสารละลาย Tris-HCl 25 mM (pH 7.5) ปริมาตร 800 µl ทำการผสมให้เข้ากัน และนำไปวัดความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์ โดยกำหนด Excitation wavelength ที่ 282 nm ความกว้างของ Slit ที่ 5 nm และ emission wavelength ที่ 544 nm ความกว้างของ Slit ที่ 10 nm คำนวณหาปริมาณ DPA จากกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์ของสาร DPA มาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0-5 µg/ml

4.2 การวิเคราะห์ผลต่อการต้านการเจริญเป็นเซลล์ปกติของสปอร์ (Spore outgrowth)

ในการศึกษาผลของสารต้านเชื้อต่อสปอร์ของ *B. cereus* ได้เริ่มจากการศึกษาผลในการยับยั้ง outgrowth ของสปอร์ โดยใช้สปอร์ที่ความเข้มข้นต่ำ (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 nm; OD₆₃₀ = 0.3) และทำการทดลองเพื่อวิเคราะห์ค่า MIC ดังที่แสดงในข้อ 1.4.1 และ 1.4.2

Part II: ประสิทธิภาพการต้านเชื้อของ ไนซิน -ซินนามาลดีไฮด์ และ ไนซิน -คาร์วาครอล ในแบบจำลองอาหาร (Model media) และอาหารจริง

5. การประเมินผลของสารอาหารชนิดต่าง ๆ และค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่อประสิทธิภาพการต้านเชื้อ

ทดสอบผลของสารอาหารชนิดต่าง ๆ ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน และค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่อประสิทธิภาพการต้านเชื้อ (ใช้ระดับความเข้มข้นตามผลการทดลองค่า MIC) ตามวิธีของ Gutierrez's method (Gutierrez et al., 2008) โดยดัดแปลงเล็กน้อยดังนี้ กำหนดแบบจำลองอาหารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ (i) แป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้ (Sigma-Aldrich) ความเข้มข้น 0, 1, 5 และ 10% ใน MHB; (ii) Beef extract ความเข้มข้น 1.5, 3, 6 และ 12% ในน้ำกลั่น และ (iii) น้ำมันเมล็ดทานตะวัน ความเข้มข้น 0, 1, 5 or 10% ใน MHB แบบจำลองอาหารที่มีแป้งและ Beef extract ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อก่อนใช้ ส่วนน้ำมันเมล็ดทานตะวันจะทำให้ปลอดเชื้อก่อนผสมในอาหารที่ปลอดเชื้อโดยใช้ Tween 80 ความเข้มข้น 0.1% เพื่อทำให้อิมัลชันคงตัว และได้ปรับระดับค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่ 7 สำหรับการศึกษาค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ได้ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างของ MHB ที่ 4-7 โดยสารละลายกรดซัลฟูริก ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่าโดยการวัดค่า OD₆₃₀ ก่อนและหลังการบ่มตามสภาวะข้างต้น

6. การประเมินการประยุกต์ใช้ในระบบอาหารจริง

ระบบอาหารจริงที่เลือกใช้ในการทดลองนี้ คือ แชนด์วิชสเปรดที่ประกอบด้วย มายองเนส ปลาทูน่า แครอท หอมหัวใหญ่ และแตงกวา มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่ 4.5 และไม่ใส่วัตถุกันเสีย

เติมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียสองสายพันธุ์ (ตัวแทนจากแบคทีเรียชนิดแกรมบวกและแกรมลบ อย่างละหนึ่งสายพันธุ์) ปริมาตร 1 ml ลงในแชนด์วิชสเปรดปริมาณ 25 กรัม ให้ได้จำนวนเชื้อเริ่มต้นที่ 10⁴ CFU/g เติมสารต้านจุลินทรีย์ในปริมาณที่อ้างอิงจากผลการทดลอง MIC จากนั้นทำการปิดผนึกขวดบรรจุและเก็บไว้ที่ 4°C ทำการตรวจวัดจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดโดยวิธีมาตรฐาน ทุก 2 วันของระยะเวลาเก็บรักษา เป็นเวลาทั้งหมด 14 วัน

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทุกการทดลองได้ทำการวิเคราะห์สามซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป กำหนดค่านัยสำคัญที่ $P < 0.05$

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

Part I: ประสิทธิภาพการต้านเชื้อของ ไนซิน -ซินนามาลดีไฮด์ และ ไนซิน -คาร์วาครอล ต่อเซลล์ปกติและสปอร์ของแบคทีเรีย

1. ผลต่อเซลล์ปกติของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

งานวิจัยในส่วนแรกคือการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่ได้รับการรับรอง GRAS จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ ไนซิน (Nis) คาร์วาครอล (Car) และซินนามาลดีไฮด์ (Cin) ต่อแบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* NBRC 13494 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* TISTR 117 และ *Salmonella Typhimurium* NBRC105726 โดยการหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibition concentration; MIC) ของสารต้านเชื้อแต่ละชนิดโดยวิธี Broth microdilution (ดัดแปลงวิธีของ Nedorostova et al., 2009) ในขั้นต้น จากนั้นทำการประเมินการเสริมฤทธิ์กันของ Nis-Cav และ Nis-Cin โดยการหาค่าดัชนีสัดส่วนความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (Fractional inhibition concentration index; FIC_i) โดยวิธี Checkerboard test (ดัดแปลงจากวิธีของ Fadli et al., 2012)

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 1 พบว่า MIC ของ Nis ต่อแบคทีเรียแกรมลบทั้งสองชนิดที่นำมาทดสอบมีค่าอยู่ที่ 10,000 IU/ml ในขณะที่ในแบคทีเรียแกรมบวกทั้งสองชนิด พบค่า MIC ของ Nis เป็น 2,500 IU/ml ในส่วนของ Cin พบว่ามี MIC ต่อแบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *E. coli* และ *S. Typhimurium* อยู่ที่ 1.56 mg/ml และ 6.25 mg/ml ตามลำดับ และแบคทีเรียแกรมบวกทั้งสองชนิดอยู่ที่ 0.78 mg/ml Cav มี MIC ต่อ *E. coli* และ *S. Typhimurium* อยู่ที่ 0.78 และ 1.56 mg/ml ตามลำดับ และมีค่า 3.13 mg/ml ต่อเชื้อที่เหลืออีกสองชนิด

ตาราง 1 และตาราง 2 แสดงค่า FIC_i เมื่อทดสอบฤทธิ์ร่วมของ Nis-Cin และ Nis-Cav จากผลการทดลอง พบว่า Nis-Cin มีฤทธิ์เสริมกันแบบ Partial synergism ต่อ *E. coli* และ *S. aureus* และมีฤทธิ์เสริมกันอย่างโดดเด่นแบบ Total synergism ต่อ *S. Typhimurium* และ *B. cereus* โดยพบว่าการยับยั้งการเจริญของ *S. Typhimurium* โดยใช้ Cin และ Nis ร่วมกันนั้น สามารถลดความเข้มข้นของ Nis และ Cin ลงได้สี่เท่าและในการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* สามารถลดความเข้มข้นของ Nis และ Cin ลงได้ 64 และ 2 เท่าตามลำดับ ในส่วนของ Nis-Cav พบว่ามีผลไม่โดดเด่นนักต่อแบคทีเรียแกรมลบ กล่าวคือมีฤทธิ์เสริมกันแบบ Partial synergism ต่อ *S. Typhimurium* และไม่มีฤทธิ์เสริมกันต่อ *E. coli* ในทางกลับกันกลับพบฤทธิ์เสริมกันอย่างโดดเด่นแบบ Total synergism ต่อแบคทีเรียแกรมบวกทั้งสองชนิดโดยพบว่าการยับยั้งการเจริญของ *S. Typhimurium* และ *E. coli* โดยใช้ Car และ Nis ร่วมกันนั้น สามารถลดความเข้มข้นของ Nis และ Car ได้ 16 และ 4 เท่า ตามลำดับ (ตาราง 3)

Table 1 MIC values of Nisin (Nis), Cinnamaldehyde (Cin) and Carvacrol (Cav) against target food-borne bacteria

| Bacteria | MIC | | |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| | Nis (iu/ml) | Cin (mg/ml) | Cav (mg/ml) |
| <i>E. coli</i> | 10000 | 1.56 | 0.78 |
| <i>S. Typhimurium</i> | 10000 | 6.25 | 1.56 |
| <i>S. aureus</i> | 2500 | 0.78 | 3.13 |
| <i>B. cereus</i> | 2500 | 0.78 | 3.13 |

Table 2 Combination of Nisin and Cinnamaldehyde

| Bacteria | Combination MIC | FIC _i | Conclusion |
|-----------------------|-------------------------|------------------|-------------------|
| | Nis (iu/ml)/Cin (mg/ml) | | |
| <i>E. coli</i> | 5000/0.39 | 0.75 | Partial synergism |
| <i>S. Typhimurium</i> | 1250/1.56 | 0.50 | Total synergism |
| <i>S. aureus</i> | 39/1.56 | 0.52 | Partial synergism |
| <i>B. cereus</i> | 39/0.39 | 0.25 | Total synergism |

Table 3 Combination of Nisin and Carvacrol

| Bacteria | Combination MIC | | FIC _i | Conclusion |
|-----------------------|-------------------------|--|------------------|-------------------|
| | Nis (iu/ml)/Car (mg/ml) | | | |
| <i>E. coli</i> | 10000/0.78 | | 2.00 | No effect |
| <i>S. Typhimurium</i> | 2500/0.78 | | 0.75 | Partial synergism |
| <i>S. aureus</i> | 156/0.78 | | 0.31 | Total synergism |
| <i>B. cereus</i> | 156/0.78 | | 0.31 | Total synergism |

Total synergism ($FIC_i \leq 0.5$) / Partial synergism ($0.5 < FIC_i \leq 0.75$) / No effect ($0.75 < FIC_i \leq 2$) / Antagonism ($FIC_i > 2$)

Table 4 Conclusions of MIC and MIC when combined (MIC#)

| Bacteria | Cin (mg/ml) | | Nis (iu/ml) | |
|-----------------------|-------------|------|-------------|------|
| | MIC | MIC# | MIC | MIC# |
| <i>B. cereus</i> | 0.78 | 0.39 | 2500 | 39 |
| <i>S. Typhimurium</i> | 3.12 | 1.56 | 10000 | 2500 |

จากผลการทดลองข้างต้น จึงเลือก Cin เป็นตัวแทนสารต้านเชื้อจากพืชในการศึกษาฤทธิ์ร่วมกับ Nis ต่อแบคทีเรียก่อโรคเป้าหมายชนิดแกรมลบและแกรมบวกได้แก่ *S. Typhimurium* และ *B. cereus* ตามลำดับ

2. Antibacterial dynamic ของสารต้านจุลินทรีย์

Antimicrobial dynamic ของสารต้านเชื้อทั้งที่ใช้เพียงชนิดเดียวและใช้ร่วมกันสองชนิด ได้ถูกทดสอบและรายงานเป็น Activity (U) ระหว่าง 0 – 24 ชั่วโมงในการบ่มร่วมกับเชื้อที่ไวต่อสารมากที่สุด โดยได้เลือกแบคทีเรียแกรมลบ *S. Typhimurium* และ แบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* และความเข้มข้นของสารต้านเชื้อที่ใช้ได้อ้างอิงจากค่า MIC ของสารแต่ละชนิดเมื่อใช้ร่วมกัน

ภาพ 1 แสดง Antimicrobial dynamic ของสารต้านเชื้อ Nis (1,250 IU/ml), Cin (1.56 mg/ml) และ Nis+Cin (1,250 IU/ml+1.56 mg/ml) ต่อเชื้อ *S. Typhimurium* ระหว่างการบ่ม ที่ 30 °C เป็นเวลา 0 - 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อใช้เดี่ยว Cin มี Antimicrobial dynamic ที่โดดเด่นกว่า Nis และมีค่าสูงที่สุดที่ 8 ชั่วโมง เช่นเดียวกับเมื่อใช้สารสองชนิดร่วมกัน โดยที่เมื่อใช้ร่วมกันแล้ว Antimicrobial dynamic ที่จุดนี้มีค่าสูงขึ้นถึงอย่างเห็นได้ชัด โดยมีแนวโน้มที่อิงตาม Cin มากกว่า Nis

ภาพ 2 แสดง Antimicrobial dynamic ของสารต้านเชื้อ Nis (39 IU/ml), Cin (0.39 mg/ml) และ Nis+Cin (39 IU/ml+0.39 mg/ml) ต่อเชื้อ *B.cereus* ระหว่างการบ่ม ที่ 30 °C เป็นเวลา 0 - 24 ชั่วโมง พบว่าในระยะต้น Nis+Cin มีแนวโน้มของ Antimicrobial dynamic ที่ใกล้เคียงกับ Nis กล่าวคือมีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็วระหว่าง 0-4 ชั่วโมง ต่อมาพบว่ามีแนวโน้มที่อิงตาม Cin โดยไม่พบการลดลงของ Activity ดังเช่น Nis แต่พบการคงตัวของระดับ Activity ซึ่งอาจจะเป็นอิทธิพลจาก Cin ที่ค่า Activity ได้ไต่ระดับสูงขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่ช่วง 12-18 ชั่วโมงและยังคงตัวต่อไปจนครบ 24 ชั่วโมง

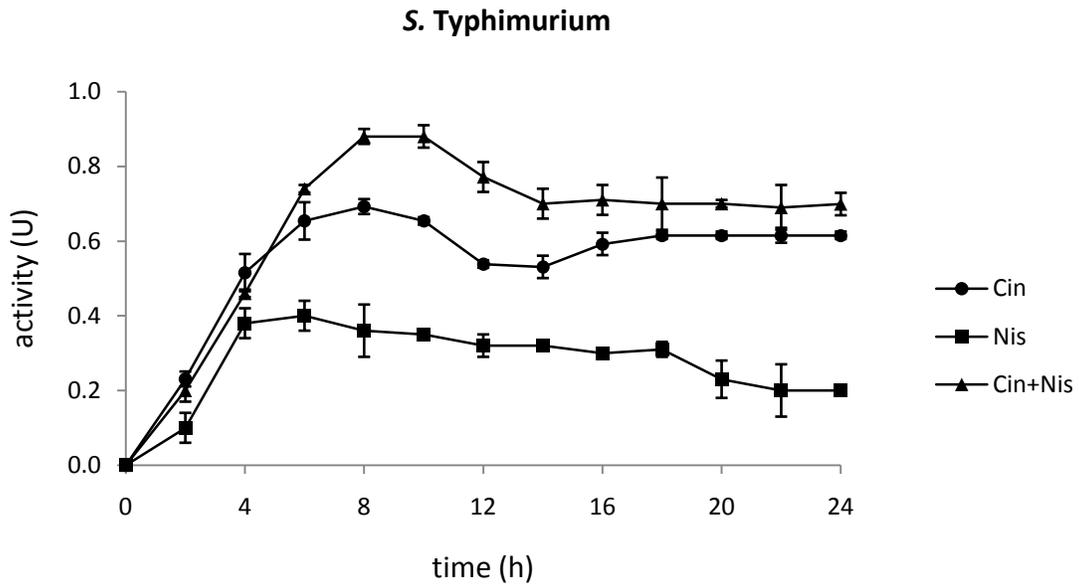


Fig. 1 Antimicrobial dynamic of Nis (1,250 IU/ml), Cin (1.56 mg/ml) and Nis-Cin (1,250 IU/ml-1.56 mg/ml) against *S. Typhimurium* during incubation at 30 °C for 0 - 24 h

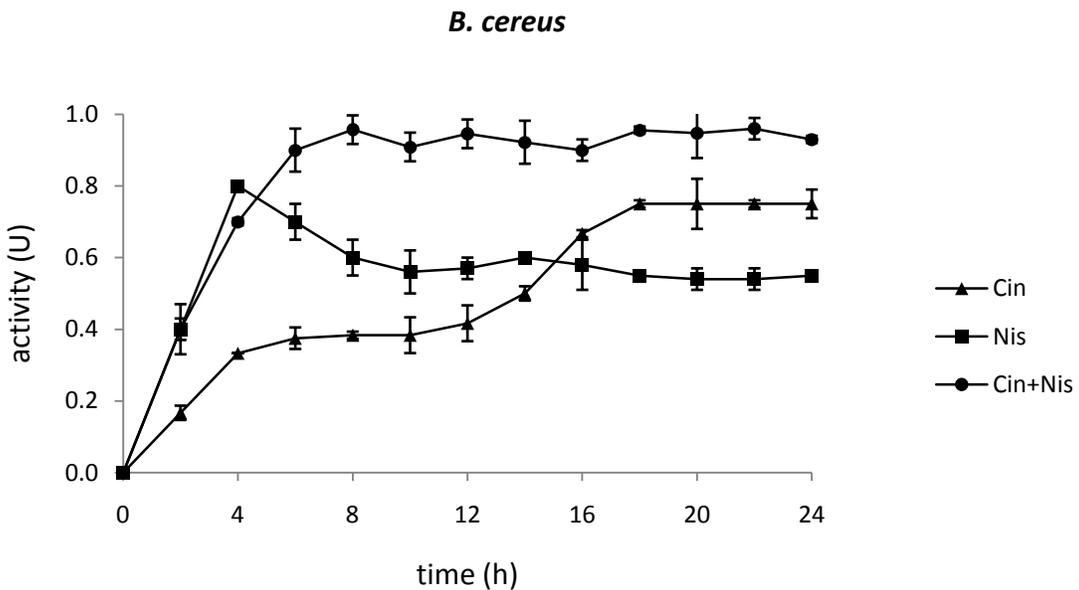


Fig. 2 Antimicrobial dynamic of Nis (39 IU/ml), Cin (0.39 mg/ml) and Nis-Cin (39 IU/ml-0.39 mg/ml) against *B. cereus* during incubation at 30 °C for 0 - 24 h

3. อิทธิพลขององค์ประกอบในอาหารและระบบอาหารจริงต่อประสิทธิภาพการต้านเชื้อ

ผลขององค์ประกอบในอาหาร ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน และผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ต่อประสิทธิภาพการต้านเชื้อของ Cin และ Nis ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ร่วมกัน ได้วิเคราะห์จาก Lag phase (λ) และ maximum specific growth rate (μ_{max}) ของ *S. Typhimurium* และ *B. cereus* เมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านเชื้อระหว่าง 24 ชั่วโมง

3.1 ผลของโปรตีน

ผลของโปรตีนต่อประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อ ได้ทดสอบภายใต้โมเดลอาหารที่ประกอบด้วย Beef extract ความเข้มข้น 0, 1, 5 และ 10% จากตารางที่ 4 และตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่า Lag phase ของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดที่มีการเติม Cin และ Nis มีระยะที่ยาวนานกว่าชุดควบคุม และสำหรับ Cin เมื่อมีปริมาณโปรตีนอยู่ในโมเดลอาหารเพิ่มขึ้นจะพบมีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะที่ระดับความเข้มข้นของ Beef extract ระหว่าง 5-10% เช่นเดียวกับ maximum specific growth rate ที่พบว่ามียอดราที่ลดลงเมื่อเติม Cin ในโมเดลอาหารที่มีความเข้มข้นของโปรตีนสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโปรตีนได้ทำให้ค่า Hydrophobicity ของ Cin สูงขึ้นจนสามารถยึดเกาะหรือผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ง่ายขึ้น (Gutierrez et al., 2008) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของ Nis มีแนวโน้มคงที่หรือลดลงเล็กน้อยเมื่อเพิ่มปริมาณโปรตีน

3.2 ผลของคาร์โบไฮเดรต

ผลของคาร์โบไฮเดรตต่อประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อ ได้ทดสอบภายใต้โมเดลอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำได้ที่ความเข้มข้น 0, 1, 5 และ 10% จากตารางที่ 4 และตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้ง ประสิทธิภาพของสารต้านจะมีค่าลดลง โดยสังเกตได้จากค่า Lag phase และ Specific growth rate ที่เพิ่มขึ้นและลดลงตามลำดับ โดยเฉพาะเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งเป็น 5-10%

3.3 ผลของไขมัน

ผลของไขมันต่อประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อ ได้ทดสอบภายใต้โมเดลอาหารที่ประกอบด้วย น้ำมันเมล็ดทานตะวันที่มีความเข้มข้น 0, 1, 5 และ 10% จากตารางที่ 4 และตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่า Lag phase และ Specific growth rate ของเชื้อแบคทีเรียมีค่าลดลงและเพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Sunflower oil โดยเฉพาะในระบบที่มีการเติม Cin ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ Cin ได้ถูกละลายในชั้นของน้ำมันไปบางส่วน ประสิทธิภาพในการจับกับเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียจึงลดลง (Gutierrez et al., 2008)

3.4 ผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่าง

ผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่างได้ถูกทดสอบในอาหาร MHB ที่ปรับระดับ pH ที่ 4, 5, 6 และ 7 จากตารางที่ 4 และตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่าค่า pH ที่ลดลงส่งผลในการเพิ่มประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อ โดยเฉพาะเมื่อค่า pH ต่ำถึง 4-5 ไม่พบการเจริญของเชื้อทั้งสองชนิด การลดลงของค่า pH ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ของแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบการหายใจ เนื่องจากโดยปกติจะมี กลไกการรักษาสมดุลของโปรตอนภายในเซลล์ โดยการปั๊มเอาโปรตอนที่มีสะสมอยู่มากเกินไปภายในเซลล์ออกสู่ภายนอก เซลล์ด้วย Proton pump บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยใช้แหล่งพลังงานจากการสลาย ATP เมื่อค่า pH ลดลงจนทำให้มีการสะสมของโปรตอนภายในเซลล์มากเกินไป Proton pump ดังกล่าวจึงทำงานหนักกว่าในสภาวะปกติ จนนำไปให้เกิดการลดลงของแหล่งพลังงาน และเกิดความเสียหายต่อเซลล์ในที่สุด (Klangpetch et al., 2011)

3.5 ประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อเมื่ออยู่ภายใต้ระบบอาหารจริง

จากภาพที่ 3 และ 4 จะเห็นได้ว่า Cin และ Nis มีผลในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดในระบบอาหาร โดย Cin จะมีผลชัดเจนกว่า โดยสามารถลดจำนวน *S. Typhimurium* ใน Sandwich spread ที่มีระดับค่า pH ที่ 5 ได้ทั้งหมด (6-log order) ในการเก็บรักษาที่ 12 วัน ซึ่งพบว่าเป็นผลที่สอดคล้องกับผลการทดลองในเรื่องอิทธิพลขององค์ประกอบในอาหารและระบบอาหารจริงต่อประสิทธิภาพการต้านเชื้อข้างต้น และพบว่าการเติม Cin ร่วมกับ Nis ได้ทำให้ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อสูงขึ้นอย่างชัดเจน ดังจะเห็นได้ ณ วันที่ 8-14 ในการเก็บรักษา สำหรับ *B. cereus* พบว่ามีจำนวนลดลง 2-log order ระหว่างการเก็บรักษาในช่วงสองวันแรก อย่างไรก็ตามก็ตีกลับพบการเพิ่มขึ้นของเชื้อแบคทีเรียเมื่อเก็บรักษานานขึ้นทั้งในตัวอย่างที่ใช้สารต้านเชื้อเดี่ยว ๆ และใช้ร่วม ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการคงอยู่ของสปอร์ของ *B. cereus* ที่มีสมบัติทนต่อสภาวะความเป็นกรดและสารต้านเชื้อชนิดต่าง ๆ

Table 4 Lag phase (λ) and maximum specific growth rate (μ_{max}) of *S. Typhimurium* grown in model media containing Cinnamaldehyde (1.56 mg/ml) or Nisin (1,250 IU/ml)

| Model media | λ (h) | | | μ_{max} (h ⁻¹) | | |
|-------------------------|---------------|------|---------|--------------------------------|------|---------|
| | Cin | Nis | Control | Cin | Nis | Control |
| Beef extract (%) | | | | | | |
| 0 | 4.1 | 4.9 | 4.12 | 0.19 | 0.28 | 0.33 |
| 1 | 3.33 | 3.48 | 3.11 | 0.21 | 0.29 | 0.31 |
| 5 | 6.13 | 4.11 | 2.91 | 0.16 | 0.39 | 0.42 |
| 10 | 6.89 | 4.09 | 2.88 | 0.08 | 0.33 | 0.48 |
| Starch media (%) | | | | | | |
| 0 | 13.01 | 5.34 | 3.32 | 0.23 | 0.28 | 0.32 |
| 1 | 11.21 | 5.11 | 3.51 | 0.28 | 0.28 | 0.29 |
| 5 | 9.13 | 4.42 | 3.46 | 0.29 | 0.31 | 0.31 |
| 10 | 4.11 | 4.01 | 3.67 | 0.28 | 0.33 | 0.26 |
| Sunflower oil media (%) | | | | | | |
| 0 | 12.9 | 5.43 | 4.01 | 0.21 | 0.19 | 0.31 |
| 1 | 12.1 | 5.67 | 3.89 | 0.22 | 0.22 | 0.29 |
| 5 | 8.71 | 5.53 | 3.98 | 0.2 | 0.21 | 0.27 |
| 10 | 5.12 | 5.11 | 3.88 | 0.21 | 0.21 | 0.22 |
| pH | | | | | | |
| 4 | 0 | 0 | 10.91 | 0 | 0 | 0.07 |
| 5 | 0 | 0 | 8.75 | 0 | 0 | 0.18 |
| 6 | 12.09 | 5.52 | 2.85 | 0.18 | 0.21 | 0.24 |
| 7 | 11.12 | 5.11 | 2.81 | 0.22 | 0.24 | 0.34 |

Table 5 Maximum specific growth rate (μ_{\max}) of *B. cereus* grown in model media containing Cinnamaldehyde (0.39 mg/ml) or Nisin (39 IU/ml)

| Model media | λ (h) | | | μ_{\max} (h^{-1}) | | |
|--------------------------|---------------|-------|---------|----------------------------------|------|---------|
| | Cin | Nis | Control | Cin | Nis | Control |
| Beef extract (%) | | | | | | |
| 0 | 6.38 | 5.98 | 6.01 | 0.12 | 0.18 | 0.08 |
| 1 | 9.02 | 7.13 | 5.88 | 0.13 | 0.16 | 0.2 |
| 5 | 10.55 | 6.78 | 4.98 | 0.06 | 0.15 | 0.17 |
| 10 | 12.01 | 6.12 | 4.33 | 0.04 | 0.15 | 0.19 |
| Starch (%) | | | | | | |
| 0 | 15.91 | 7.02 | 8.02 | 0.06 | 0.19 | 0.18 |
| 1 | 13.9 | 7 | 7.68 | 0.2 | 0.16 | 0.16 |
| 5 | 10.2 | 7.23 | 7.99 | 0.16 | 0.2 | 0.17 |
| 10 | 8.96 | 7.98 | 8.25 | 0.1 | 0.17 | 0.16 |
| Sunflower oil (%) | | | | | | |
| 0 | 14.33 | 13.09 | 6.77 | 0.06 | 0.15 | 0.19 |
| 1 | 14.21 | 13.01 | 6.53 | 0.08 | 0.14 | 0.18 |
| 5 | 9.88 | 9.35 | 6.6 | 0.16 | 0.18 | 0.18 |
| 10 | 8.11 | 9 | 6.24 | 0.18 | 0.18 | 0.17 |
| pH | | | | | | |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.05 |
| 5 | 0 | 0 | 4.44 | 0 | 0 | 0.08 |
| 6 | 9.67 | 6.01 | 5.45 | 0.06 | 0.14 | 0.17 |
| 7 | 12.11 | 6.67 | 5.33 | 0.13 | 0.16 | 0.19 |

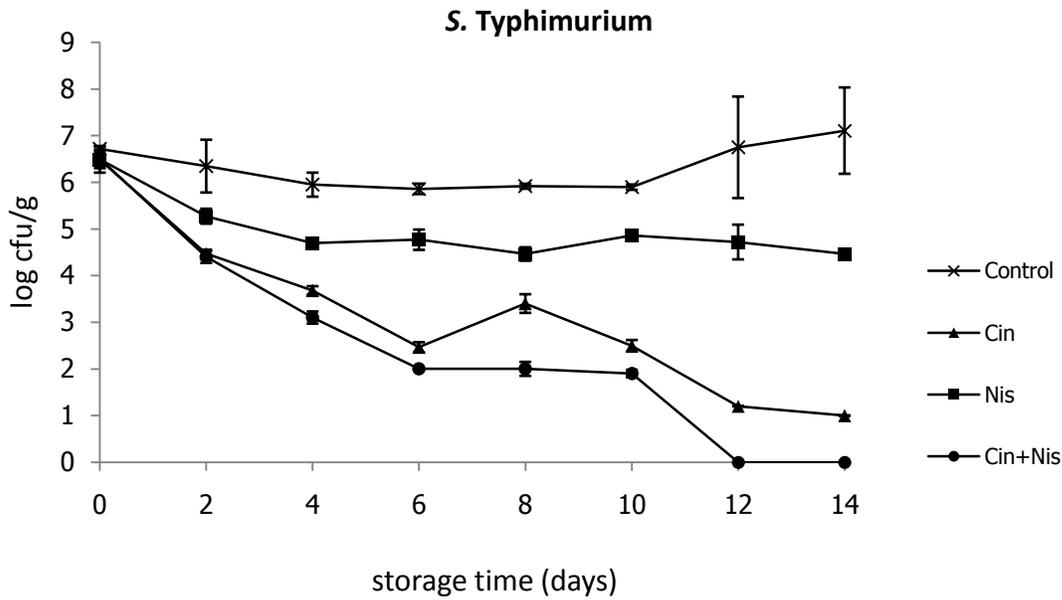


Fig 3 Effect of Cinnamaldehyde (1.56 mg/ml) or Nisin (1,250 IU/ml), and combination of Cinnamaldehyde and Nisin on *S. Typhimurium* viable count during storage (4°C) of Sandwich spread.

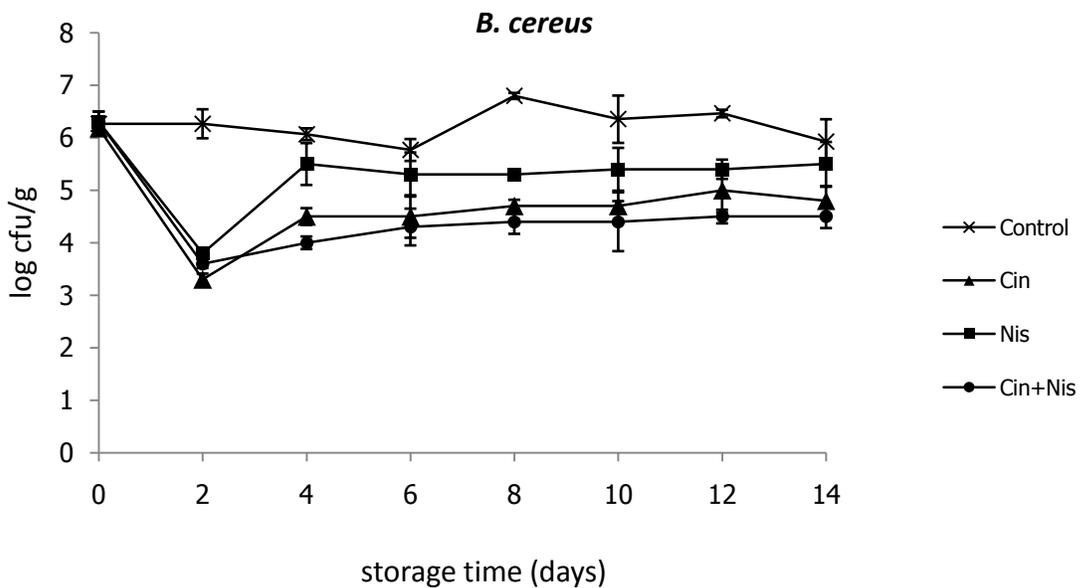


Fig 4 Effect of Cinnamaldehyde (0.39 mg/ml) or Nisin (39 IU/ml), and combination of Cinnamaldehyde and Nisin on *B. cereus* viable count during storage (4°C) of Sandwich spread.

4. กลไกการต้านเชื้อของไนซินและซินนามาลดีไฮด์ต่อเซลล์ปกติของ *B. cereus* และ *S. Typhimurium*

4.1 ผลการประเมินการรั่วไหลของสารภายในเซลล์ออกนอกเซลล์

จากการศึกษากลไกการต้านเชื้อแบคทีเรียของ Cin และ Nis โดยเริ่มศึกษาจากผลต่อการเปลี่ยนแปลงบริเวณผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์จนอาจทำให้สมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านสูญเสียไป โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ของ supernatant ของแบคทีเรียก่อนและหลังการเติมสารต้านเชื้อ เพื่อทำนายการรั่วไหลของกรดนิวคลีอิกและโพรตีนออกนอกเซลล์นั้น พบว่า ในการทดสอบกับ *S. Typhimurium* เมื่อใช้ Cin ที่ระดับความเข้มข้น MIC (0.78 mg/ml) พบระดับ A260 และ A280 สูงที่สุด ซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงสภาพของผนังเซลล์ ในขณะที่เดียวกันเมื่อใช้ Nis ที่ระดับ MIC (2,500 IU/ml) กลับไม่พบการรั่วไหลดังกล่าว เมื่อใช้ Cin+Nis ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (0.39 mg/ml+39 IU/ml) ยังคงพบการรั่วไหลออกนอกเซลล์ของกรดนิวคลีอิกและโพรตีนที่ระดับเดียวกับการใช้ Cin ที่ความเข้มข้นสูง โดยผลที่ได้จากการทดสอบ *B. cereus* ก็มีแนวโน้มเดียวกัน (ภาพ 5)

4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ ATP ภายในและภายนอกเซลล์

จากการศึกษากลไกการต้านเชื้อแบคทีเรียของ Cin และ Nis ในแง่ของผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ ATP ภายในและภายนอกเซลล์ พบว่าสัดส่วนระดับ ATP ภายในต่อภายนอกเซลล์ มีค่าลดลงเมื่อเติมสารต้านเชื้อแต่ละชนิด โดย Cin แสดงการลดลงที่ชัดเจนกว่า Nis และเมื่อใช้สารสองชนิดรวมกันที่ระดับความเข้มข้นต่ำ พบว่าการลดลงของสัดส่วนนี้เป็นผลอิงตามอิทธิพลของ Cin และมีผลเสริมกันโดยให้ค่าที่ลดลงในระดับมากกว่าการใช้สารเดี่ยว ๆ ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิด (ภาพ 6)

มีงานวิจัยที่ยืนยันถึงกลไกการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของไนซินต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย โดยไนซินจะเข้าไปสร้างพันธะต่อส่วนของไขมัน รบกวนโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์จนเกิดรูทำให้เกิดการรั่วไหลของสารภายในเซลล์ เช่น ATP กรดอะมิโน เป็นต้น นอกจากนี้ยังส่งผลถึงการทำลายสมดุลต่าง ๆ ภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ตายได้ (Tong et. al, 2014)

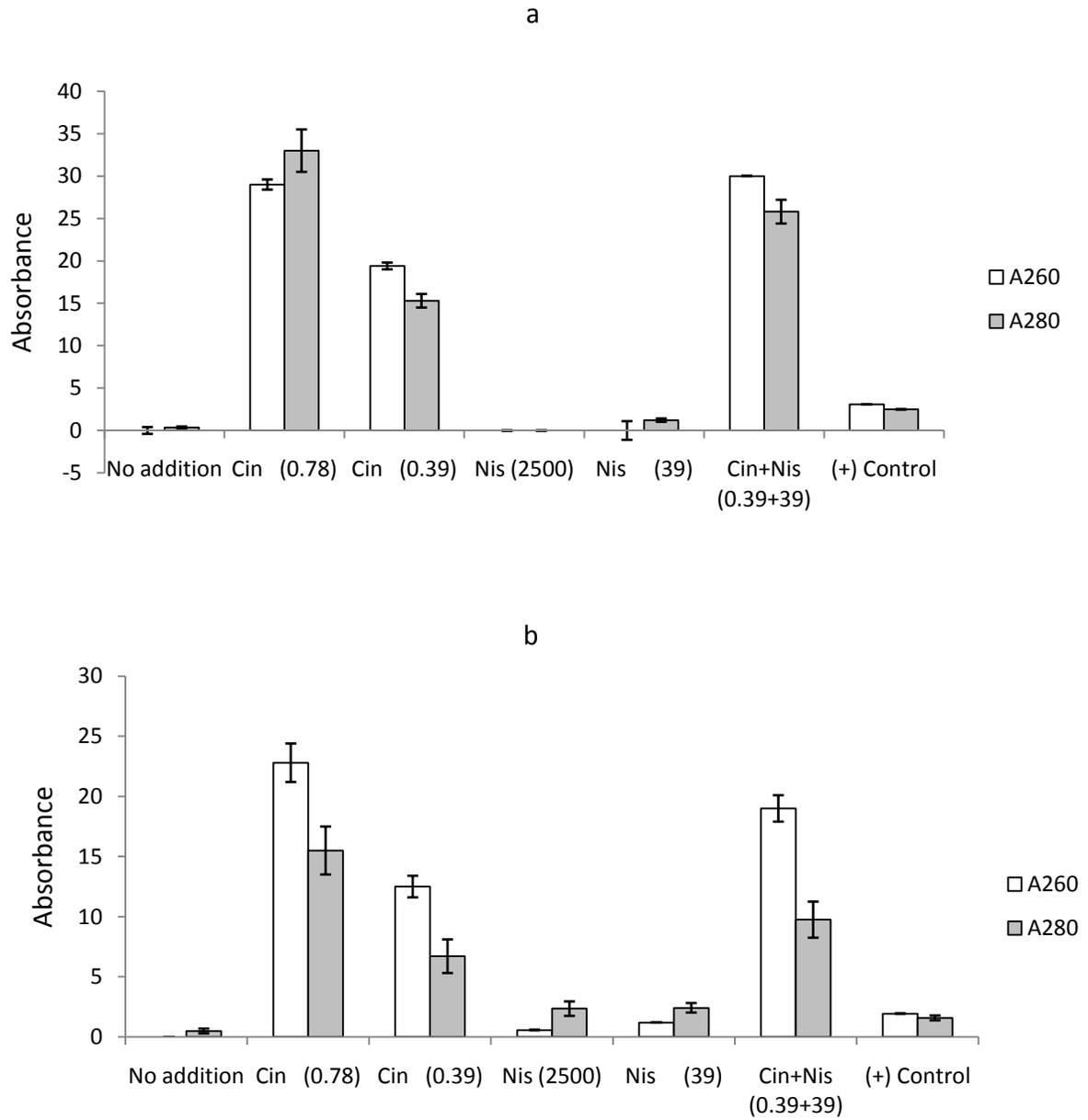


Fig. 5 Absorbance at 260 and 280 nm of bacterial supernatant of *S. Typhimurium* (a) and *B. cereus*(b) after treated with Cin and Nis

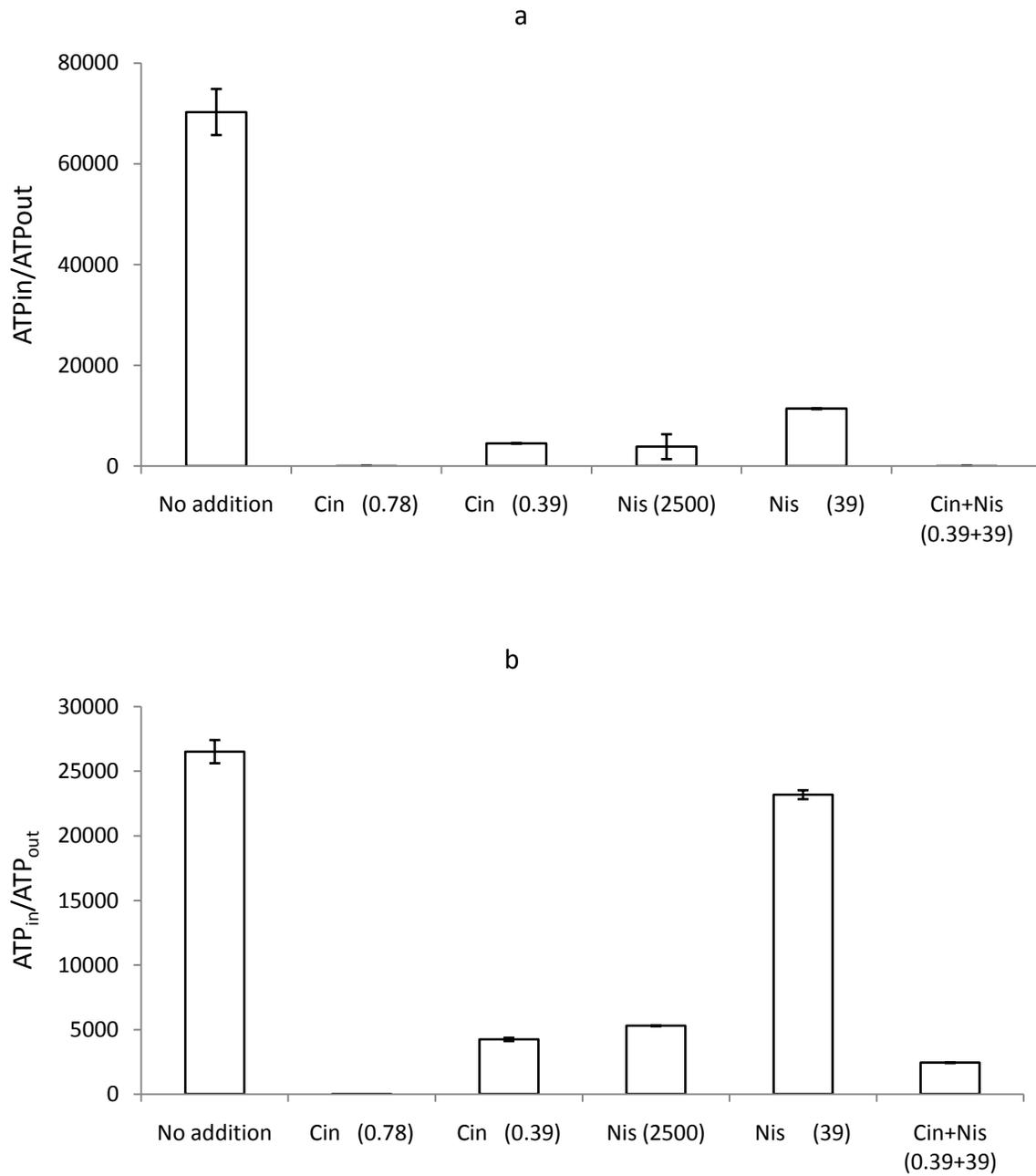
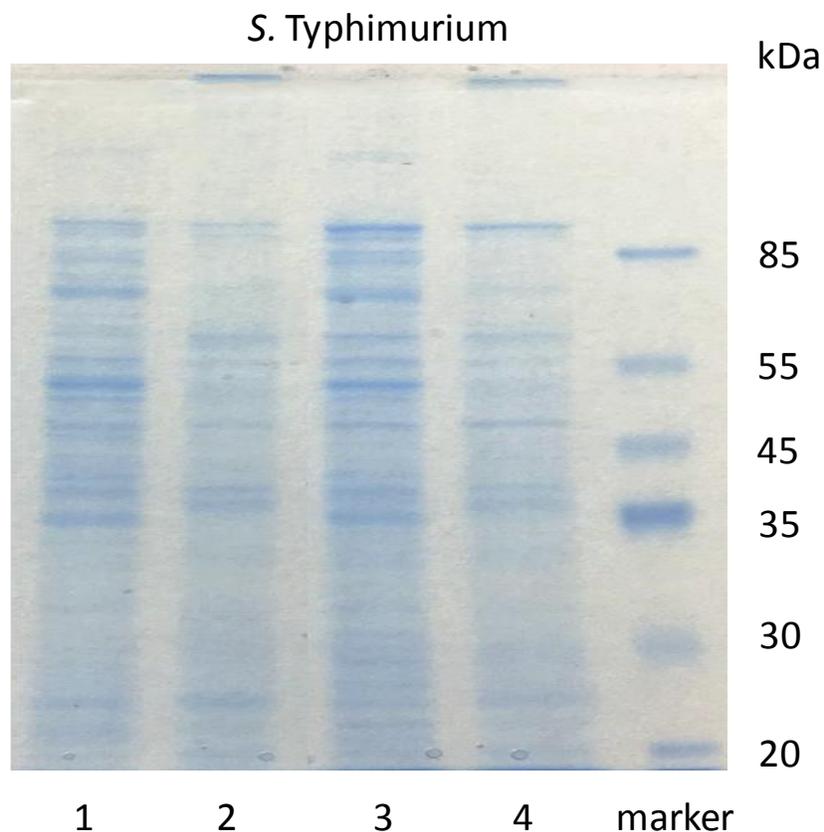


Fig. 6 ATP_{in}/ATP_{out} of *S. Typhimurium* (a) and *B. cereus*(b) after treated with Cin and Nis

4.3 การเปลี่ยนแปลงของโพรไฟล์ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์แบคทีเรีย

จากการศึกษาการตกตะกอนด้วยวิธีของ Cin และ Nis ต่อการเปลี่ยนแปลงโพรไฟล์ของโปรตีน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเติมสารต้านเชื้อเดี่ยว ๆ โดยเมื่อเติม Cin พบว่าโปรตีนที่สกัดได้ได้เกาะตัวกันอยู่บริเวณด้านบนของเจล จึงทำให้แบนของโปรตีนที่แยกได้ปรากฏไม่ชัดเจนนัก อย่างไรก็ตาม ใน *S. Typhimurium* พบว่ามีการสลายของโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 55-85 kDa, 35-45 kDa และ 35 kDa ในขณะที่เดียวกันเมื่อเติม Nis พบลักษณะ profile ที่คล้ายคลึงกับตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารใด ๆ และพบว่าการสังเคราะห์โปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 44-55 kDa ในระดับที่ลดลง และเมื่อใช้สารสองชนิดร่วมกัน พบว่า profile ของโปรตีนมีลักษณะอิงตามการเปลี่ยนแปลงโดย Cin มากกว่า Nis โดยพบการเปลี่ยนแปลงนอกเหนือจากการใช้สารเดี่ยว ๆ ได้แก่ การลดลงของการสังเคราะห์โปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล >85 kDa และการเพิ่มขึ้นของการสังเคราะห์โปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 45-55 kDa

ในส่วนของ *B. cereus* พบการเกาะตัวของโปรตีนเช่นเดียวกับ *S. Typhimurium* เมื่อเติม Cin นอกจากนี้ยังพบการสลายของโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล >85 kDa และ 45-85 kDa และการเพิ่มขึ้นของการสังเคราะห์โปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 20-30 kDa ในขณะที่เดียวกันเมื่อเติม Nis พบว่ามีการสังเคราะห์โปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 20-30 kDa ในระดับที่เพิ่มขึ้น และเมื่อใช้สารสองชนิดร่วมกัน พบว่า profile ของโปรตีนมีลักษณะอิงตามการเปลี่ยนแปลงโดย Cin มากกว่า Nis (ภาพ 7)



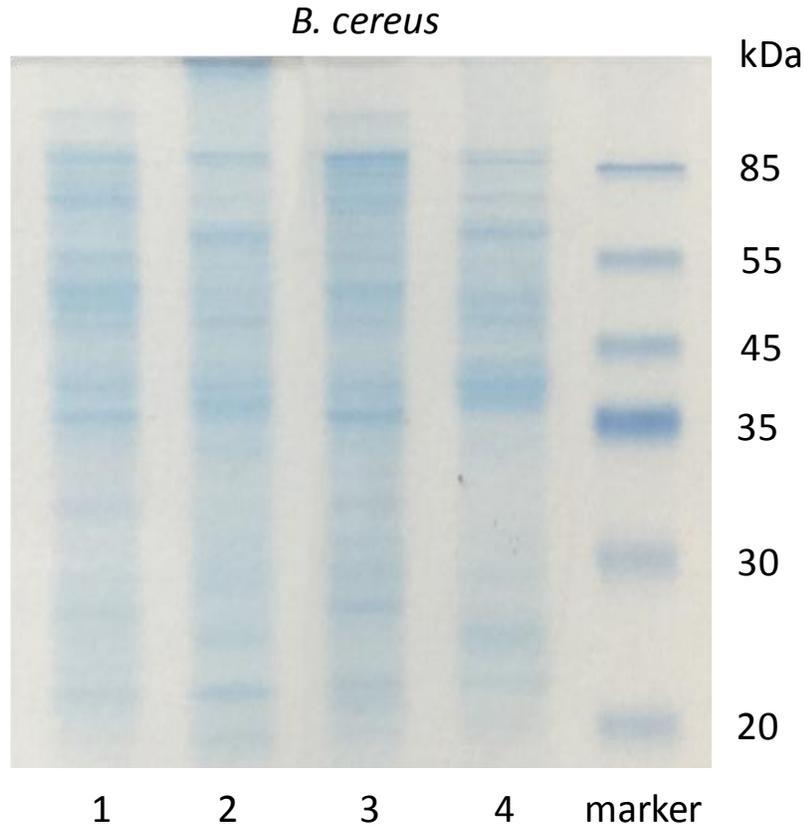


Fig. 7 Bacterial protein separation profiles by SDS-PAGE (Lane 1; No addition, Lane 2; Cin 0.39 mg/ml, Lane 3; Nis 39 IU/ml, Lane 4; Cin+Nis 0.39 mg/ml+39 IU/ml, Lane 5; Marker)

จากผลการทดลองส่วนนี้ จึงอาจสรุปกลไกของสารต้านเชื้อสองชนิดนี้เมื่อใช้ร่วมกันต่อเชื้อแบคทีเรีย กล่าวคือ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของผนังเซลล์แบคทีเรีย โดยทำให้สมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านเปลี่ยนแปลง จนอาจเกิดรูทำให้สารในเซลล์ไหลออกนอกเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังทำให้ปริมาณ ATP ภายในเซลล์ลดลง และภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้น จนมีปริมาณใกล้เคียงกัน และยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโพर्फิลของโปรตีนอีกด้วย

Part II: ผลของไนซินและซินนามาลดีไฮด์ต่อสปอร์ของ *B. cereus*

5. ผลของ ไนซินและซินนามาลดีไฮด์ต่อการเจริญหลังงอกของ *B. cereus* spore (Outgrowth)

แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีอิทธิพลในอุตสาหกรรมอาหารเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถสร้างสปอร์ที่มีคุณสมบัติทนต่อความร้อน รังสี การสั่นสะเทือน สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ และภาวะกดดันจากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ คุณสมบัติดังกล่าวนี้ทำให้แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีผลต่อกระบวนการแปรรูปอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการทั่วไปที่อาศัยความร้อนในการทำให้อาหารปราศจากเชื้อ โดยปกติการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียจะเกิดขึ้นในช่วงปลายของ logarithmic phase ทั้งนี้เนื่องจากการขาดแคลนสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญหรือการสะสมผลิตภัณฑ์ ในช่วงของการเปลี่ยนจากสภาวะเซลล์ปกติ (vegetative cell) ไปเป็นสปอร์จะเกิดสะสมแคลเซียมไดออกไซด์ และมีการสร้าง dipicolinic acid (DPA) บริเวณ Spore cortex ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการทนความร้อนของสปอร์ นอกจากนี้แล้วเนื่องจากสปอร์จะมีสภาพที่สะท้อนแสง (refractile) ซึ่งถูกนำมาใช้ในการตรวจหาสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เมื่อสภาวะแวดล้อมเปลี่ยนไปจนเกิดความเหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำให้สปอร์เปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์ปกติ หรือที่เรียกว่าการงอก สปอร์จะเกิดการปล่อย DPA ออกมานอกเซลล์ (ภาพ 8) ในขณะเดียวกัน การเกิดการไหลของน้ำรอบ ๆ สปอร์เข้าสู่ภายในสปอร์ ส่งผลให้ความสามารถในการทนความร้อนของสปอร์ลดลง และสปอร์จะเปลี่ยนจาก phase bright เป็น phase dark (ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำลง) อย่างไรก็ตาม การงอกของสปอร์เป็นผลให้เกิด Outgrowth ของเซลล์ปกติอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการยับยั้งการงอกของสปอร์จึงส่งผลต่อเนื่องถึงการยับยั้งการ Outgrowth ของสปอร์ กล่าวคือเป็นการป้องกันการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของเซลล์ปกติที่สามารถสร้างสารพิษที่ก่อให้เกิดอันตรายในอาหารต่อไปได้

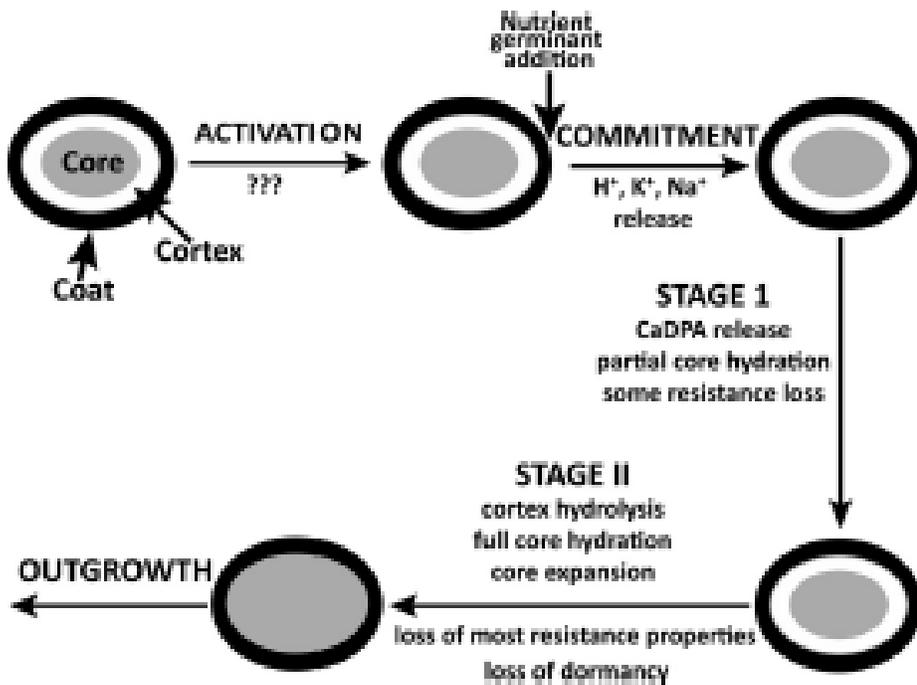


Fig. 8 Germination process of bacterial spore

ในการศึกษาผลของสารต้านเชื้อต่อการยับยั้งการเจริญหลังการงอกของสปอร์ของ *B. cereus* ได้เริ่มจากการศึกษาผลในการยับยั้ง Outgrowth ของสปอร์ โดยใช้สปอร์ที่ความเข้มข้นต่ำ (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 nm; OD₆₃₀ = 0.3) พบว่าค่า MIC ของ Nis และ Cin เมื่อใช้เดี่ยว ๆ อยู่ที่ 5,000 IU/ml และ 1.56 mg/ml ตามลำดับ และเมื่อใช้ร่วมกันพบว่ามีค่าอยู่ที่ 1,250 IU/ml และ 0.2 mg/ml ตามลำดับโดยมีความสัมพันธ์แสดงการออกฤทธิ์ร่วมกันแบบ Total synergism (ตาราง 6) แสดงให้เห็นว่าการใช้สารสองชนิดนี้ร่วมกัน สามารถลดปริมาณของ Nis และ Cin ได้ถึง 40 และ 8 เท่าตามลำดับ

Table 6 Conclusions of MIC and MIC when combined (MIC#) of Nisin and Cinnamaldehyde against target *Bacillus cereus* spore outgrowth (diluted spore suspension; initial OD = 0.3)

| MIC | | MIC# | FIC _i | Conclusion |
|-------------|-------------|-------------------------|------------------|-----------------|
| Nis (iu/mL) | Cin (mg/mL) | Nis (iu/mL)/Cin (mg/mL) | | |
| 5000 | 1.56 | 1250/0.2 | 0.38 | Total synergism |

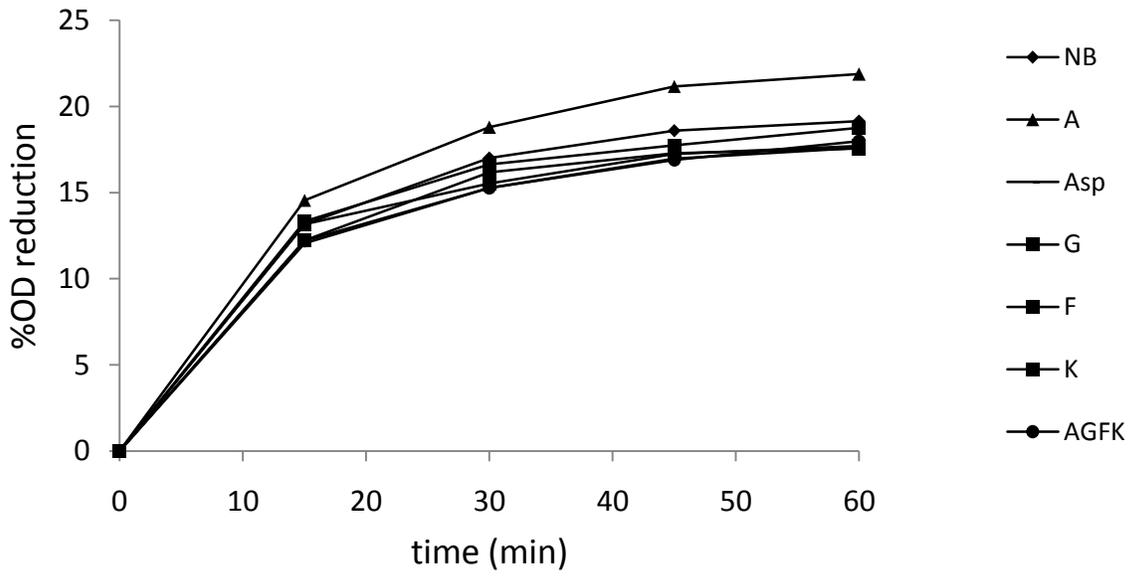
6. ผลของ ไนซินและซินนามาลดีไฮด์ต่อการงอกของ *B. cereus* spore

6.1 พฤติกรรมการงอกของสปอร์

ในการศึกษาผลของสารต้านเชื้อทั้งสองชนิดต่อการงอกของสปอร์ *B. cereus* หลังผ่านการกระตุ้นด้วยความร้อนที่ 85°C เป็นระยะเวลา 15 นาที โดยกำหนดให้ OD₆₃₀ ของสปอร์อยู่ที่ 0.6-0.7 ขึ้นต้นได้ทำการทดลองเพื่อเลือกใช้สารเร่งการงอกที่เหมาะสมที่สุดเพื่อเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Germination media) จากทั้งหมด 6 ชนิดดังนี้ L-alanine (A), L-asparagine (Asp), D-glucose (G), D-fructose (F), potassium ions (K) และสารผสมของ L-asparagine, D-glucose, D-fructose และ potassium ions (AGFK) โดยเติมสารเหล่านี้ที่ความเข้มข้น 10 mM ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่มีสปอร์อยู่ และวัด OD₆₃₀ จากนั้นนำมาคำนวณหา %OD reduction เพื่อวิเคราะห์ระดับการงอกของสปอร์ในช่วงระยะเวลา 60 นาที จากผลการทดลอง พบว่า ถึงแม้ว่า L-alanine สามารถเร่งการงอกของสปอร์ได้ดีที่สุด แต่ยังไม่พบเพียงที่ระดับ 22% เท่านั้น (ภาพ 9a) จึงได้ทดลองเพิ่มความเข้มข้นของสารชนิดนี้เป็น 100 mM และเติม D-glucose หรือ Inosine ร่วมด้วย พบว่าเมื่อใช้ L-alanine เดี่ยว ๆ ถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นเป็นสิบเท่า ก็เพิ่มระดับการงอกของสปอร์ได้เป็น 25% เท่านั้น แต่เมื่อเติม Inosine ลงไป กลับพบว่าระดับการงอกของสปอร์มีค่าสูงที่สุดถึง 50% และเมื่อเติม D-glucose (AG) ลงไปก็มีค่าสูงขึ้นในระดับรองลงมาจึงเลือกใช้ L-alanine ร่วมกับ Inosine ใน Germination media (AI) (ภาพ 9b)

เมื่อศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของ Cin และ Nis เมื่อใช้เดี่ยว ๆ ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ *B. cereus* พบว่า Cin ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/mL (C8) และ Nis ที่ความเข้มข้น 625 IU/ml (N5) เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้เกิดการลดลงของ OD₆₃₀ น้อยที่สุดที่ 18% และ 27% จนสิ้นสุดระยะเวลาการบ่ม กล่าวคือสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ในระดับที่โดดเด่นที่สุด (ภาพ 10)

a



b

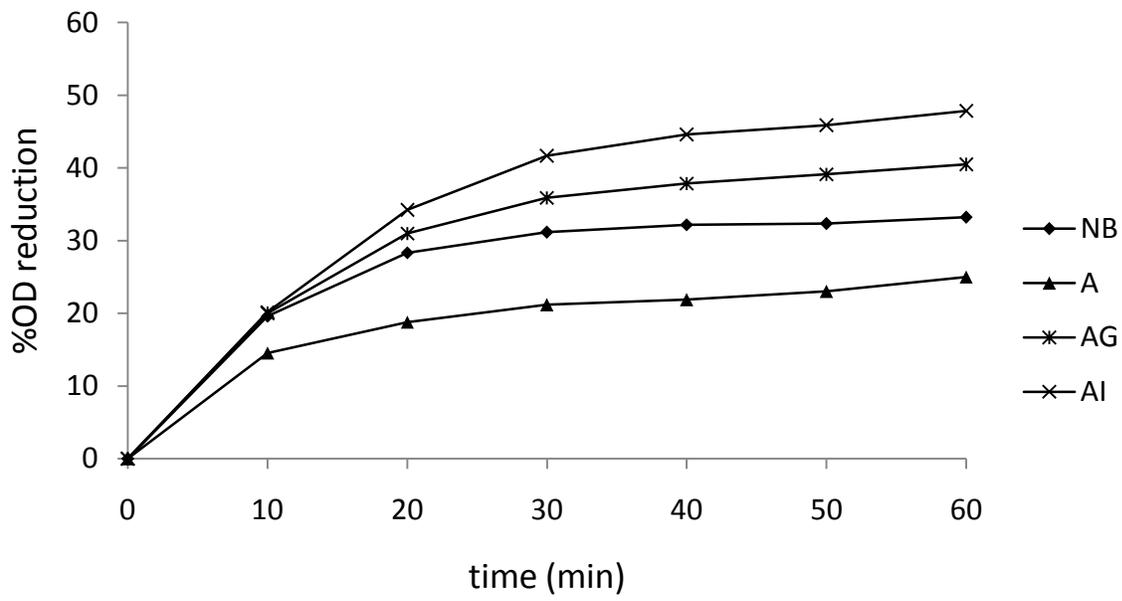


Fig. 9 Germination behaviors of *Bacillus cereus* spore induced by various germination media

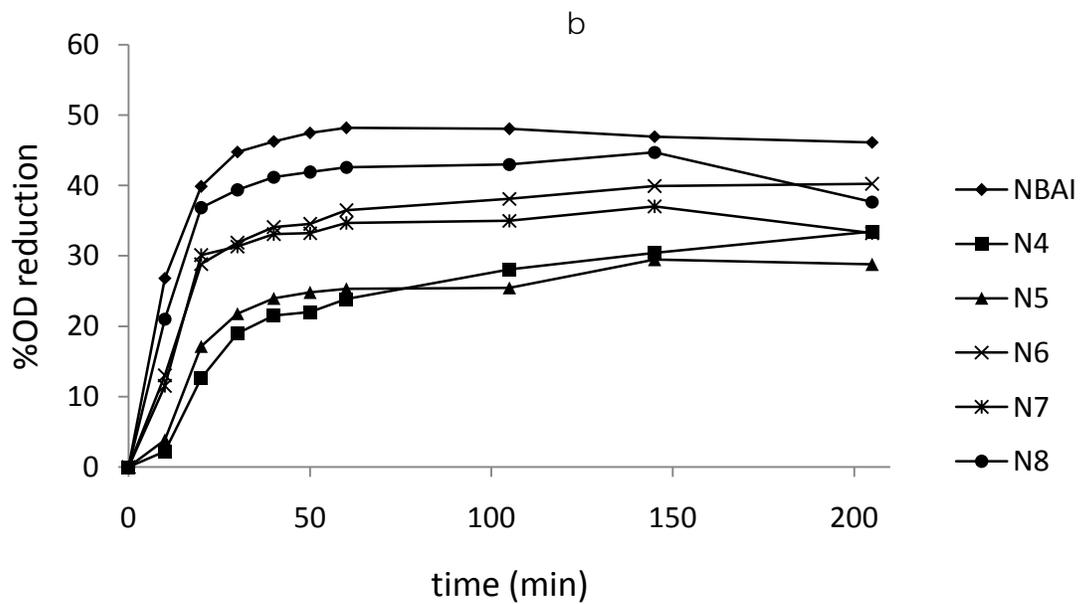
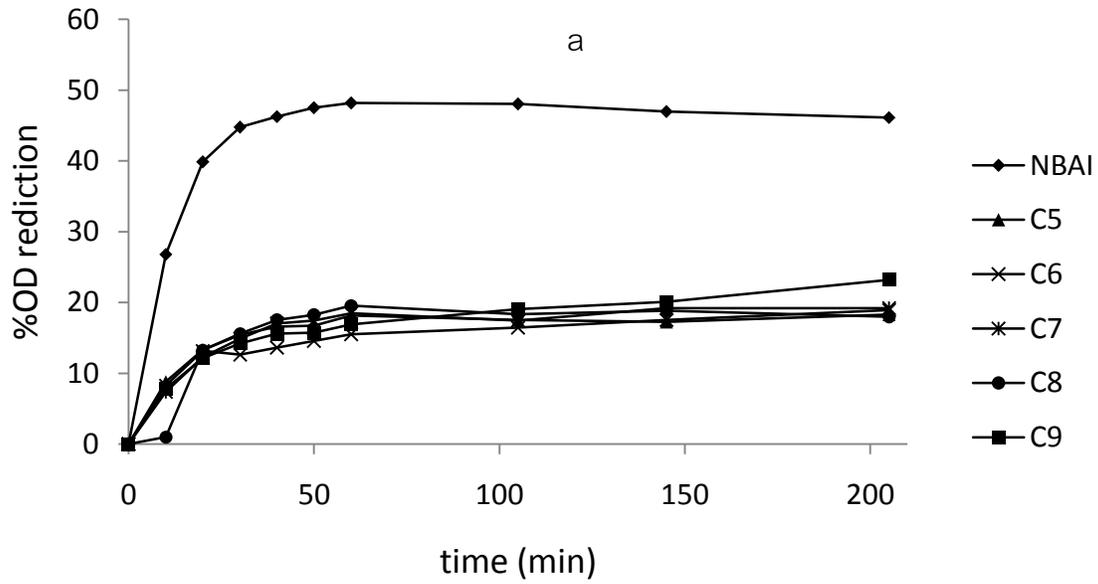
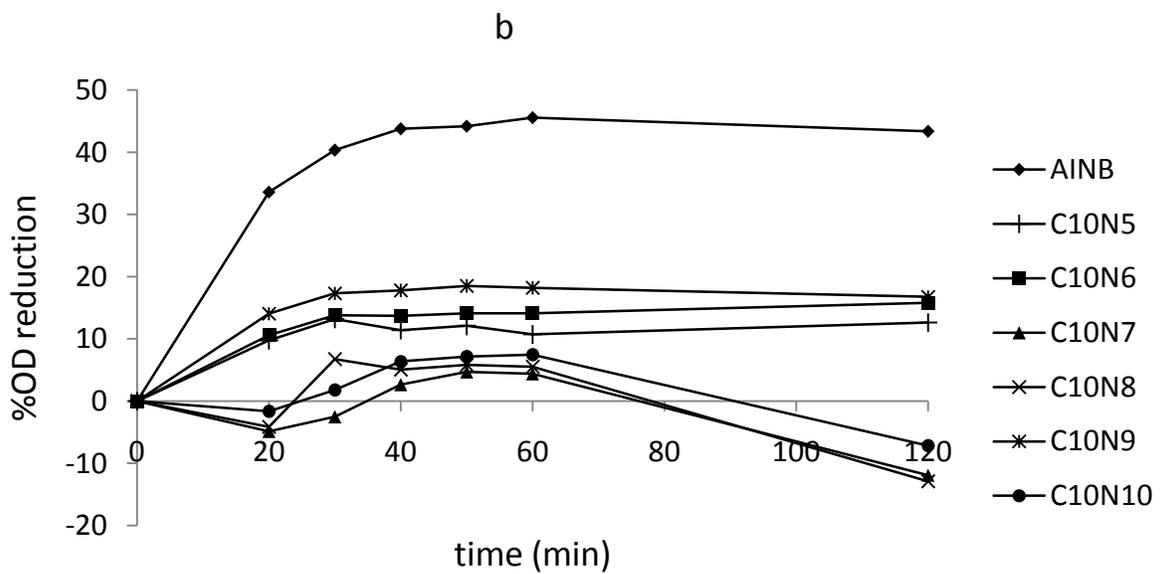
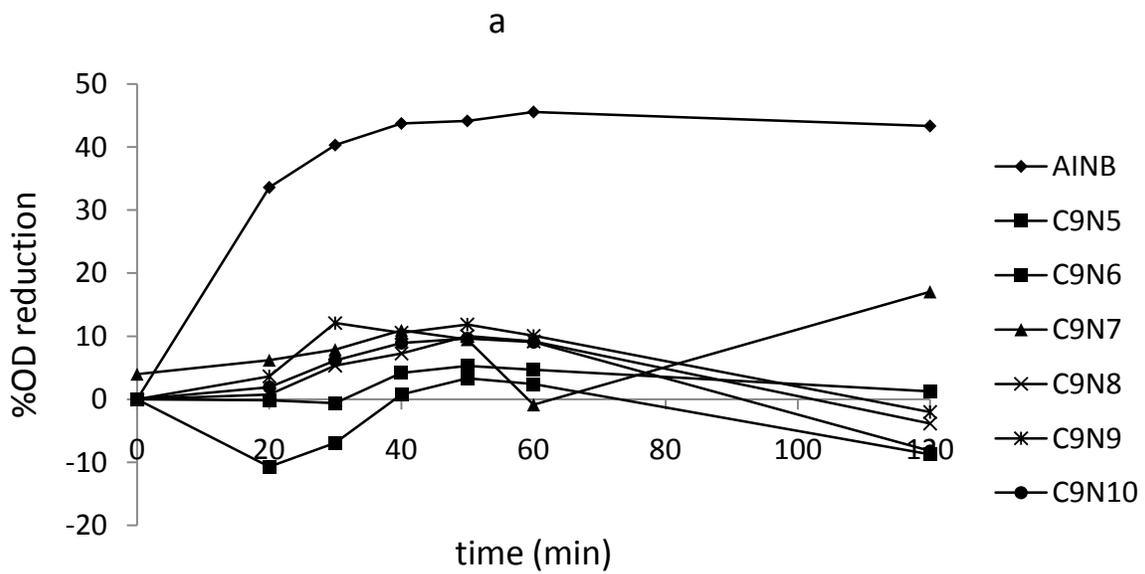
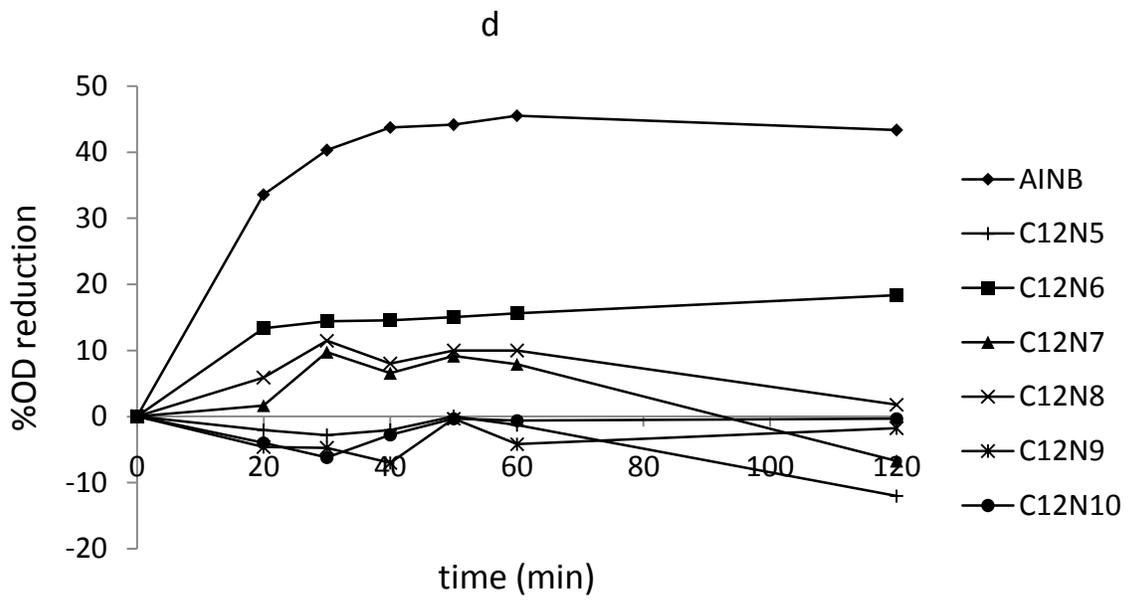
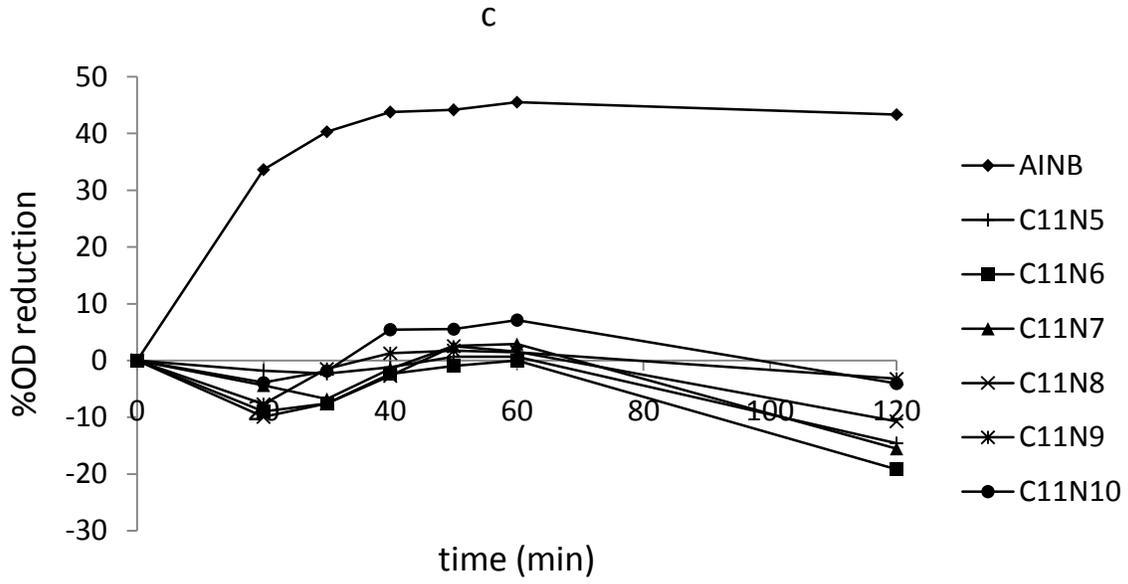


Fig. 10 Effect of concentration of Cinnamaldehyde (a) and Nisin (b) on germination behaviors of heat-activated *Bacillus cereus* spore induced by L-Alanine (100 mg/mL) combined with inosine (2.5 mg/mL) NBAI: L-Alanine 100 mg/mL+Inosine 2.5 mg/mL in NB

Cin: Cinnamaldehyde; C4 = 1.56, C5 = 0.78, C6 = 0.39, C7 = 0.2, C8 = 0.1 mg/mL
 Nis : Nisin; N4 = 1250, N5 = 625, N6 = 312.5, N7 = 156.25, N8 = 78.13 IU/mL

เมื่อศึกษาผลของระดับสารต้านเชื้อทั้งสองชนิดเมื่อใช้ร่วมกันต่อการงอกของสปอร์ *B. cereus* พบว่าการใช้ Cin ที่ความเข้มข้น 0.006 mg/mL (C12) และ Nis ที่ความเข้มข้น 20 IU/ml (N10) เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสง กล่าวคือสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ (ภาพ 11)





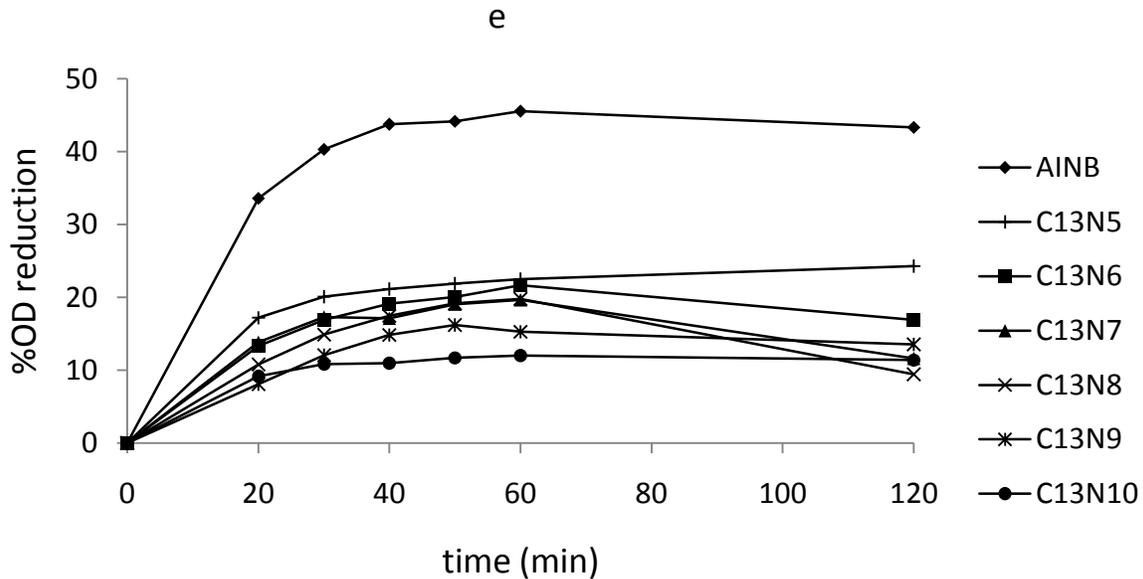


Fig. 11 Effect of Cinnamaldehyde (C) combined with Nisin (N) on germination behaviors of heat-activated *B. cereus* spore induced by L-Alanine (100 mg/mL) combined with inosine (2.5 mg/mL)

Cin: Cinnamaldehyde; C9 = 0.05, C10 = 0.025, C11 = 0.013, C12 = 0.006, C13 = 0.003 mg/mL
 Nis : Nisin; N5 = 625, N6 = 312.5, N7 = 156.25, N8 = 78.13, N9 = 39, N10 = 20 IU/mL

จากผลข้างต้น จึงสามารถสรุปค่าความเข้มข้นของสารต้านเชื้อเพื่อใช้ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ดังนี้ เมื่อใช้เดี่ยว Cin และ Nis มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ 0.1 mg/ml และ 625 IU/ml ตามลำดับ และเมื่อใช้ร่วมเป็น 0.006 mg/ml (ลดลง 16 เท่า) และ 20 IU/ml (ลดลง 32 เท่า) ตามลำดับ โดยพบว่าความสัมพันธ์ของสารต้านเชื้อสองชนิดนี้เมื่อใช้ร่วมกันในการต้านการงอกของสปอร์เป็นแบบ Total Synergism (ตาราง 7)

Table 7 Conclusions of MIC and MIC when combined (MIC#) of Nisin and Cinnamaldehyde against *B. cereus* spore germination

| MIC | | MIC# | FIC _i | Conclusion |
|-------------|-------------|-------------------------|------------------|-----------------|
| Nis (iu/mL) | Cin (mg/mL) | Nis (iu/mL)/Cin (mg/mL) | | |
| (N5) | (C8) | N10/C12 | 0.092 | Total synergism |
| 625 | 0.1 | 20/0.006 | | |

6.2 สมบัติการติดสีย้อม DAPI

เมื่อสปอร์เกิดการงอกจะทำให้หน้าและสารต่าง ๆ รวมถึงสารเรืองแสง 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ผ่านเข้าสู่ภายในได้ เมื่อศึกษาสมบัติในการย้อมติดสีของ DAPI โดยสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนส์ พบว่ามีตัวอย่างสปอร์ที่ย้อมติด ได้แก่ สปอร์ที่มีการเติม Cin และ Nis เดี่ยว ๆ ที่ความเข้มข้นต่ำ (0.006 mg/ml และ 20 IU/ml ตามลำดับ) เช่นเดียวกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสาร ในขณะที่ในตัวอย่างที่เติม Cin และ Nis ในความเข้มข้นนี้ร่วมกัน พบว่าไม่พบการย้อมติดสี เช่นเดียวกับตัวอย่างที่เติมสารสองชนิดนี้เดี่ยว ๆ ที่ความเข้มข้นสูงกว่า (0.1 mg/ml และ 625 IU/ml ตามลำดับ) จึงเป็นการยืนยันผลร่วมของสารสองชนิดที่ความเข้มข้นต่ำในการยับยั้งการงอกของสปอร์ (ภาพ 12)

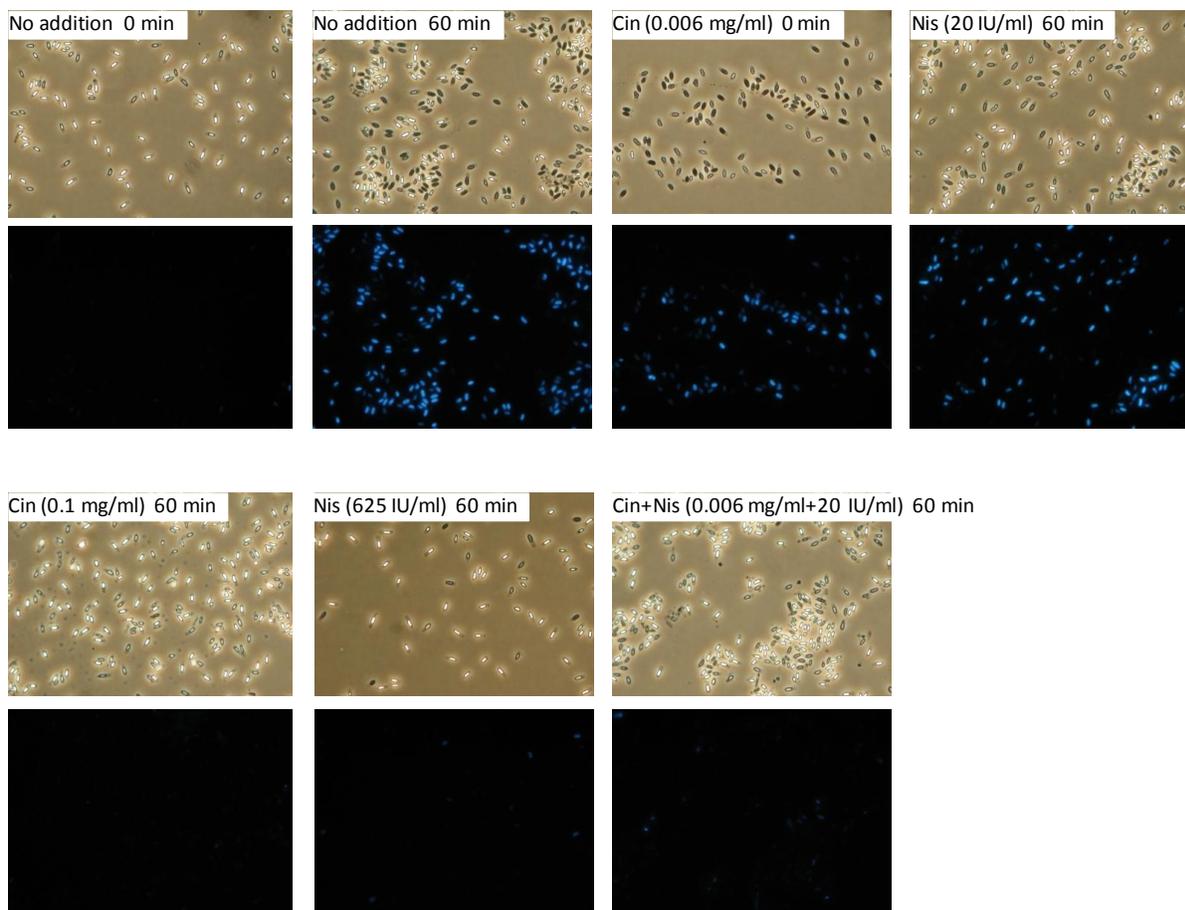


Fig. 12 ลักษณะของสปอร์

6.3 สมบัติการปลดปล่อย DPA

ขณะที่เกิดการงอกสปอร์จะเกิดการปล่อย DPA ออกมานอกเซลล์ซึ่งส่งผลต่อการลดลงของความสามารถในการต้านทานความร้อนของสปอร์ จากผลการทดลอง พบว่าในตัวอย่างที่มีการเติม Cin และ Nis เดี่ยว ๆ ในความเข้มข้นต่ำ พบการปลดปล่อย DPA ออกมาภายนอกสปอร์ในปริมาณสูงเทียบเท่ากับตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสาร แสดงถึงการดำเนินของกระบวนการ Germination ในขณะที่ตัวอย่างที่มีการเติม Cin และ Nis ร่วมกันในความเข้มข้นต่ำพบการปลดปล่อยของ DPA ที่น้อยในระดับเทียบเท่ากับการเติม Cin และ Nis เดี่ยว ๆ ที่ความเข้มข้นสูง การปลดปล่อย DPA ออกนอกสปอร์ในระดับที่มากกว่าตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารใด ๆ ในที่นี้อาจเป็นผลจากการเหนี่ยวนำการงอกโดย AI

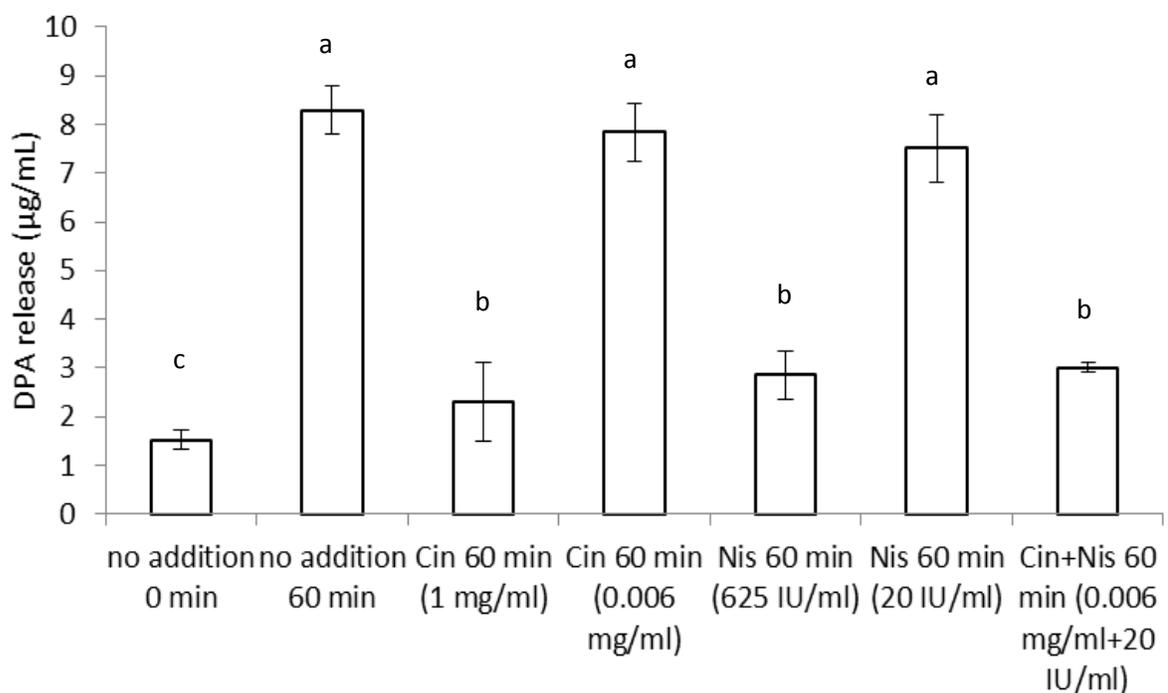


Fig. 13 DPA releasing properties of *B. cereus* spores treated by Cin and Nis

จากผลการทดลองข้างต้น จึงสามารถสรุปได้ว่า Cin และ Nis ต่างก็มีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ *B. cereus* ถึงแม้ว่าจะมีสารเร่งการงอก L-alanine และ Inosine ยิ่งไปกว่านั้น สารสองชนิดนี้ยังมีฤทธิ์เสริมกันแบบ Total synergism โดยเมื่อใช้ร่วมกันจะสามารถลดความเข้มข้นของ Cin และ Nis ได้ถึง 16 และ 32 เท่า ตามลำดับ สารสองชนิดนี้ได้ไปยับยั้งการปลดปล่อย DPA และลดสมบัติการย้อมติดสีของ DAPI อีกด้วย สำหรับผลของการใช้สารสองชนิดนี้ร่วมกันต่อการยับยั้ง outgrowth ของสปอร์นั้น พบว่าสารสองชนิดนี้แสดงการออกฤทธิ์ร่วมกันแบบ Total synergism สามารถลดความเข้มข้นของ Cin และ Nis ได้ถึง 8 และ 40 เท่าตามลำดับ

สรุป

ผลจากงานวิจัยนี้ได้ชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพร่วมแบบออกฤทธิ์เสริมกันของไนซินและสารต้านเชื้อจากพืช ได้แก่ ซินนามาลดีไฮด์และคาร์วาครอล ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ โดยเมื่อใช้ในซินร่วมกับซินนามาลดีไฮด์สามารถลดความเข้มข้นของสารต้านเชื้อแต่ละชนิดได้ถึง 2-64 เท่า สำหรับแนวโน้มการออกฤทธิ์ระหว่างการบ่มเชื้อร่วมกับสารต้านเชื้อนั้นพบว่าจะอิงตามการออกฤทธิ์ของซินนามาลดีไฮด์ กลไกของสารต้านเชื้อสองชนิดนี้เมื่อใช้ร่วมกันต่อเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ การทำให้สมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านของผนังเซลล์แบคทีเรียเปลี่ยนแปลง จนทำให้สารในเซลล์ไหลออกนอกเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังทำให้ปริมาณ ATP ภายในเซลล์ลดลงในขณะที่ ATP ภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้นจนมีปริมาณใกล้เคียงกัน และยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโพรไฟล์ของโปรตีนอีกด้วย

การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นโปรตีนในระบบจำลองอาหารได้ส่งผลให้ประสิทธิภาพของซินนามาลดีไฮด์เพิ่มสูงขึ้นในขณะที่ประสิทธิภาพของไนซินยังคงที่หรือลดลงเล็กน้อย เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งและไขมันพบว่าประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อจะมีค่าลดลง และเมื่อเพิ่มความเป็นกรดของระบบอาหารจำลองพบว่าประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อเพิ่มสูงขึ้น ส่วนในระบบอาหารจริงซึ่งใช้แซนดีวิชสเปรตมาทดสอบพบว่าการใช้ไนซินร่วมกับซินนามาลดีไฮด์ทำให้ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อสูงขึ้นอย่างชัดเจน โดยเฉพาะผลต่อ *S. Typhimurium*

ในการศึกษาผลของสารต้านเชื้อต่อการยับยั้งการเจริญหลังการงอกของสปอร์ *B. cereus* พบว่าไนซินและซินนามาลดีไฮด์มีประสิทธิภาพที่โดดเด่น โดยเมื่อใช้ร่วมกันจะสามารถลดปริมาณของไนซินและซินนามาลดีไฮด์ได้ถึง 40 และ 8 เท่าตามลำดับ

ไนซินและซินนามาลดีไฮด์ต่างก็มีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ *B. cereus* ถึงแม้ว่าจะอยู่ภายใต้สภาพแวดล้อมที่มีสารเร่งการงอก ยิ่งไปกว่านั้นสารสองชนิดนี้ยังมีฤทธิ์เสริมกันแบบ Total synergism โดยเมื่อใช้ร่วมกันจะสามารถลดความเข้มข้นของไนซินและซินนามาลดีไฮด์ได้ถึง 16 และ 32 เท่าตามลำดับ เมื่อศึกษากลไกการยับยั้งการงอก พบว่า สารสองชนิดนี้ได้ไปยับยั้งการปลดปล่อย DPA และลดสมบัติการย้อมติดสีของ DAPI อีกด้วย

จากผลงานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพร่วมและกลไกในการต้านเชื้อของไนซินและสารต้านเชื้อจากพืชคือซินนามาลดีไฮด์ต่อเซลล์ปกติและสปอร์ของแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ที่พบมากในอาหารทั้งในระบบของอาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารจริง เป็นผลให้สามารถลดความเข้มข้นในการใช้สารต้านเชื้อแต่ละชนิดลงได้อย่างโดดเด่น ส่งผลต่อการลดต้นทุนในการผลิตอาหารได้ นอกจากนี้ยังสามารถคาดคะเนสัดส่วนของสารอาหารที่อาจมีผลต่อประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อได้อีกด้วย

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ผลจากงานวิจัยนี้อาจนำไปต่อยอดสู่การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการใช้สารต้านเชื้อร่วรร่วมกับกระบวนการแปรรูปอาหารทั้งประเภทใช้ความร้อนและไม่ใช้ความร้อน และอาจศึกษาถึงเป้าหมายแบคทีเรียที่มีความต้านทานต่อความร้อน เช่น *Geobacillus stearothermophilus* เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- Aouadhi, C., Simonin, H., Mejri, S., Maaroufi, A. 2013. The combined effect of nisin, moderate heating and high hydrostatic pressure on the inactivation of *Bacillus sporothermodurans* spores. *J. Appl. Microbiol.* 115: 147-155.
- Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N. E., Pages, J. M. 2012. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection-bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine.* 19: 464-471.
- Gutierrez, J. C. Barry-Ryan, Bourke, P. 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int. J. Food Microbiol.* 124: 91–97.
- Hancock, R. E., Lehrer, R. 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.*, 16: 82-88.
- Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Appl. Bacteriol.* 76, 626–631.
- Klangpetch, W., Nakai T., Noma S., Igura, N., Shimoda, M. 2013. Combined effects of carbonation with heating and fatty acid esters on inactivation and growth inhibition of various *Bacillus* spores, *J. of Food Prot.* 76: 1568-1574.
- Klangpetch, W, Noma S., Igura, N., Shimoda, M. 2011. The effect of low pressure carbonation on the heat inactivation of *Escherichia coli*. *Biosci. Biotech. and biochem.* 75, 1945-1950.
- Ma, Q., Davidson, P. M., Zhong, Q. 2013. Antimicrobial properties of lauric arginate alone or in combination with essential oils in tryptic soy broth and 2% reduced fat milk. *Int. J. Food Microbiol.* 166: 77-84.
- Mackay, M., Milne, K., & Gould, I. 2000. Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. *Int. J. Antimicrob. Agents* 15: 125-129.
- Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., Pulkrabek, J. 2009. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control.* 20: 157-160.
- Oh, I., Yang, W. Y., Park, J., Lee, S., Mar, W., Oh, K. B. 2011. In vitro Na/K ATPase inhibitory activity and antimicrobial activity of sesquiterpenes isolated from *Thujopsis dolabrata*. *Arch. Pharmacal Res.* 34: 2141-2147.
- Rajkovic, A., M. Uyttendaele, T. Courtens and J. Debevere. 2005. Antimicrobial effect of nisin and carvacrol and competition between *Bacillus cereus* and *Bacillus circulans* in vacuum packed potato puree. *Food Microbiol.* 22: 189-197.
- Shibata H, Adachi S, Hirose Y, Ike M, Tani I, Hashimoto T. 1993. Role of calcium in biphasic germination of *Bacillus cereus* T Spores Sensitized to Lysozyme. *Microbiol*

Immunol. 37:187–194.

Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4606–4610.

Ye, H., Shen, S., Xu, J., Lin, S. Yuan, Y., Jones, G.S. 2013. Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria. *Food Control.* 34, 619-623.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ
“Synergistic effect of nisin and plant-derived antimicrobials against *Bacillus cereus* spores” ร่างบทความสำหรับตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Food Protection หรือที่เกี่ยวข้อง
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงพาณิชย์
สามารถนำผลงานวิจัยที่ได้ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียทั้งในรูปเซลล์ปกติและสปอร์ โดยประสิทธิภาพร่วมของสารต้านเชื้อที่ได้ค้นพบในงานวิจัยนี้ทำให้สามารถลดปริมาณความเข้มข้นของสารต้าน นำไปสู่การลดต้นทุนการผลิตได้
 - เชิงวิชาการ
นำผลงานวิจัยที่ได้ไปเป็นข้อมูลประกอบการสอนในรายวิชา 108381 หลักจุลชีววิทยาอาหาร และรายวิชา 108392 หัวข้อเฉพาะทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร