



วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารแบคเทอริโอซิน  
เพื่อใช้ในการควบคุม *Listeria monocytogenes* ในแตงกวาสด

Selection of Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria  
as Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Fresh Cucumber

โดย

นางสาวสุธิดา เชื้อพานิช

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2553

ศุธิดา เชื้อพานิช 2553: การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารแบคทีเรียโอซิน เพื่อใช้ในการควบคุม *Listeria monocytogenes* ในแตงกวาสด วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สาขา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณา มาลาพันธุ์, Ph.D. 151 หน้า

การควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารโดยชีววิธีเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการทดแทนการใช้สารเคมีที่อาจก่อให้เกิดปัญหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์ จากการศึกษาสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างผักและผลไม้สดได้ทั้งหมด 769 ไอโซเลต ในจำนวนนี้พบว่า *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้งประเภทแบคทีเรียโอซิน ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคชนิด *Listeria monocytogenes* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การสร้างสารแบคทีเรียโอซิน โดยเชื้อ *P. pentosaceus* KU-F2 มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเชื้อและมีผลกระทบจากหลายปัจจัย เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณเกลือ และปริมาณกลูโคส โดยการเจริญในอาหารเหลว MRS ที่มีค่าพีเอช 5.8, ปริมาณกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณเกลือ 0-2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้สูงถึง 12,800 AU/ml และประสิทธิภาพการยับยั้งจะมีความเสถียรต่อค่าพีเอชต่ำ (pH 2-8) และความร้อนในระดับสเตอริไลส์ (121 องศาเซลเซียส 15 นาที) และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 เดือน แต่จะสูญเสียประสิทธิภาพอย่างสมบูรณ์ ในสภาวะที่มีเอนไซม์ย่อยโปรตีน

สารแบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก *P. pentosaceus* KU-F2 มีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหารชีวภาพในผักสด โดยเฉพาะในขั้นตอนการล้างผัก จากการทดลองการปนเปื้อนเทียมเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 บนแตงกวาสดในปริมาณ  $10^2$  CFU/g พบว่า สารแบคทีเรียโอซิน ที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้ง 512 AU/ml ก็เพียงพอที่จะทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ถ้ามีการปนเปื้อนสูงในปริมาณ  $10^5$  CFU/g สารแบคทีเรียโอซิน ที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้ง 512 และ 1,024 AU/ml จะลดปริมาณเชื้อได้เพียง 2 Log cycle เท่านั้น นอกจากนี้แตงกวาที่ผ่านการล้างในสารละลายที่เติมสารแบคทีเรียโอซิน ยังสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นได้นานถึง 7 วัน โดยปริมาณเชื้อที่ปนเปื้อนไม่เพิ่มขึ้นแต่อย่างใด

ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์สารแบคทีเรียโอซิน ที่สร้างจาก *P. pentosaceus* KU-F2 เป็นสารฆ่าเชื้อในน้ำล้างผัก เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่อาจปนเปื้อนมาในระหว่างการเพาะปลูกหรือระหว่างการรักษาผักสด

Suthida Chueapanich 2010: Selection of Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria as Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Fresh Cucumber. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Assistant Professor Wanna Malaphan, Ph.D. 151 pages.

Biocontrol of pathogenic microorganism in foods is an alternative way to replace the chemical sanitizers that may leave any residue in foods. In this study 769 isolates of lactic acid bacteria were screened from fresh vegetables and fruits. Among these, *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 was capable of producing bacteriocin substance which efficiently inhibit *Listeria monocytogenes*.

Bacteriocin production by *P. pentosaceus* KU-F2 was associated with growth and affected by various factors such as temperature, pH, NaCl and glucose concentrations. Growth in MRS broth pH 5.8, as well as in 2% glucose or 0-2% NaCl, incubated at 37°C exhibited a good condition for producing bacteriocin with highest antilisterial activity at 12,800 AU/ml. Its antilisterial activity was stable at pH 2-8 and at 121°C for 15 min and also stable at -20°C for 10 months but completely destroyed by proteolytic enzymes.

Bacteriocin produced by *P. pentosaceus* KU-F2 appears to have a potential to be use as a biopreservative in fresh produces especially in the washing steps. From this study, fresh cucumber artificially contaminated with *L. monocytogenes* DMST 17303 at 10<sup>2</sup> CFU/g was completely inhibited by bacteriocin at 512 AU/ml whereas only 2 Log cycle reduction was noticed in the presence of 10<sup>5</sup> CFU/g for both 512 and 1,024 AU/ml. Furthermore, the shelf-life of bacteriocin treated cucumber was extended for 7 days at 7-10 °C without any increasing number of contaminants.

The result demonstrated a potential to apply bacteriocin produced by *P. pentosaceus* KU-F2 as a sanitizing agent in fresh produces to inhibit pathogenic bacteria that may contaminate during pre/postharvest.

/ /

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. วรรณ มาลาพันธุ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนให้คำปรึกษาและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. ปทุมพร ฉิมอเนก กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก รศ.ดร. นิพนธ์ ทวีชัย กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง และ รศ.ดร. วรรณ ดุ้ยเต็มวงศ์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย และ รศ.ดร. อภรณ์ วงษ์วิจารณ์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. สุกฤดี ประเทืองวงศ์ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์เพื่องานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้ความรู้แก่ข้าพเจ้า ขอขอบคุณ คุณนิสา ร่มสั่มซ่า คุณปกรณ์ ตาลสุข และคุณกิตติขามาศ ศิริไชย รวมถึงเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านที่มีส่วนช่วยและเป็นกำลังในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณคุณอวยพร และ คุณลำดวง เชื้อพานิช ซึ่งเป็นคุณพ่อและคุณแม่ของข้าพเจ้า และทุกคนในครอบครัวที่ให้ความช่วยเหลือ คอยเป็นกำลังใจและสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนด้านเงินทุนวิจัย และขอขอบพระคุณบริษัท Merck Ltd-Thailand ที่ให้ความอนุเคราะห์อาหารเลี้ยงเชื้อ Chromocult-Listeria Agar ในงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบความดีและประโยชน์ที่พึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้แก่บิดา มารดา ผู้มีพระคุณสูงสุด และคณาจารย์ผู้ประสาทวิชาความรู้ทุกท่านตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน

สุธิดา เชื้อพานิช

มีนาคม 2553

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	41
อุปกรณ์	41
วิธีการ	45
ผลและวิจารณ์	58
สรุปและข้อเสนอแนะ	103
สรุป	103
ข้อเสนอแนะ	104
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	105
ภาคผนวก	117
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายเคมี	118
ภาคผนวก ข การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก	125
ภาคผนวก ค ข้อมูลการทดลองและกราฟการเจริญ	128
ประวัติการศึกษา และทำงาน	151

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลต่าง ๆ	9
2	ความแตกต่างระหว่างสารแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะ	15
3	ประเภทและคุณสมบัติของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก	16
4	แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกลุ่มแกรมบวก	19
5	การประยุกต์สารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร	23
6	จุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในตัวอย่างผักสดประเภทต่าง ๆ	29
7	วิธีการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ในผักสด	37
8	จุลินทรีย์เป้าหมายหรือจุลินทรีย์ทดสอบ (target strains) ที่ใช้ทดสอบการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซิน	42
9	ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในผักสด ผักสลัดพร้อมบริโภค ผลไม้ และดอกไม้	59
10	แบคทีเรียกรดแลคติกที่แสดงการยับยั้งต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี Spot on lawn	63
11	ค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่างๆ ต่อแบคทีเรียทดสอบชนิดต่าง ๆ	64
12	ค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ KU-F2 ต่อแบคทีเรียก่อโรค	65
13	ค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซินที่สกัดได้ในขั้นตอนต่างๆ	79
14	ความเสถียรของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ต่อความร้อนระดับต่าง ๆ	83
15	การปนเปื้อนของเชื้อ <i>Listeria</i> spp. ในผักสลัดพร้อมบริโภคชนิดต่าง ๆ	87

## สารบัญตาราง (ต่อ)

## ตารางผนวกที่

ค1	สัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากผัก ผลไม้ และผักสลัดพร้อมบริโภครวม	129
ค2	การยับยั้งที่เกิดจากแบคทีเรียกรดแลคติกกับเชื้อแบคทีเรียทดสอบ โดยวิธี Direct spot	134
ค3	ค่าการเจริญ (LogOD 600 nm) ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อและค่ากิจกรรมการยับยั้งของ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 เมื่อเจริญในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง	138
ค4	ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ในอาหารเหลว MRS	139
ค5	ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการเจริญและการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ในอาหารเหลว MRS	140
ค6	ผลของปริมาณกลูโคสต่อการเจริญและการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ในอาหารเหลว MRS	141
ค7	ผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ในอาหารเหลว MRS	142
ค8	การทำลายเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ในอาหารเหลว TSBYE เมื่อเติมสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2	143
ค9	การยับยั้งการเจริญของ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ในอาหารเหลว TSBYE ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้น $10^2$ CFU/ml และเติม สารแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมต่าง ๆ	143
ค10	การยับยั้งการเจริญของ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ในอาหารเหลว TSBYE ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นต่างกัน และเติมสารแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรม 512 AU/ml	144

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค11 การเจริญของเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ในอาหารเหลว TSBYE และน้ำคั้นแตงกวา เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	144
ค12 การศึกษาประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นระดับต่ำ ในน้ำแตงกวาปลอดเชื้อ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-10 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส)	145
ค13 การศึกษาประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นระดับสูง ในน้ำแตงกวาปลอดเชื้อ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-0 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส)	146
ค14 ปริมาณเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ที่ยึดเกาะบนผิวแตงกวาสดเมื่อแช่ในสารละลายเซลล์ความเข้มข้นต่าง ๆ	147
ค15 ประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 บนผิวแตงกวาสดที่ระยะเวลาการแช่ต่างๆ	147
ค16 ประสิทธิภาพการของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 บนผิวแตงกวาสดที่มีการปนเปื้อนเทียม ในระดับต่ำ (Low contamination) และสูง (High contamination)	147
ค17 การศึกษาผลของสารแบคทีเรียโอซินต่ออายุการเก็บรักษาของแตงกวาสดที่มีการปนเปื้อนเทียมของเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ในระดับต่ำและระดับสูง เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-10 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน	148
ค18 การประยุกต์สารแบคทีเรียโอซินในน้ำประปาเพื่อยับยั้งเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 บนผิวแตงกวาสดที่ระยะเวลาต่าง ๆ	149

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	Unrooted phylogenetic tree ของแบคทีเรียกรดแลคติก และแบคทีเรียแกรมบวก อื่นๆที่อยู่ในกลุ่ม low-G+C	5
2	รูปแบบการหมักกลูโคสของแบคทีเรียกรดแลคติก A) Homolactic fermentation (Glycolysis, Embden-Meyerhof-Parnas Pathway); B) Heterolactic fermentation (6-phosphogluconate/phosphoketolase pathway).	7
3	แบบจำลองการทำให้เกิดรูที่เชื่อมหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยแบคทีเรียโอซินที่สร้าง จากแบคทีเรียกรดแลคติก	18
4	วงจรการปนเปื้อนของเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> ในผักสด	34
5	จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากตัวอย่างผัก ผลไม้ ดอกไม้ และผักสลัดพร้อมบริโภคที่เจริญในสภาวะต่าง ๆ	61
6	เปรียบเทียบลำดับเบสบน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ KU-F2 (เส้นบน) และ <i>Pediococcus pentosaceus</i> strain SH 740 (เส้นล่าง)	66
7	การติดสีแกรมบวก รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์แบบ 4 เซลล์ (Tetrad) ของ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2	67
8	การเจริญของ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 บนอาหารแข็ง MRS ที่เติม bromocresol purple indicator	67
9	การเจริญและการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง	69
10	การเจริญและการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ในอาหารเหลว MRS เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ในสภาวะนิ่ง	71
11	ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการเจริญและการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของ เชื้อ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง	73
12	ผลของปริมาณกลูโคสต่อการเจริญและการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง	75

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	ผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง	77
14	การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซินโดยวิธี critical dilution assay	79
15	ความเสถียรของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ต่อค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ	81
16	ความเสถียรของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ	82
17	รูปแบบการทำลายเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TSBYE และเติมสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2	85
18	ลักษณะเฉพาะของโคโลนี <i>Listeria monocytogenes</i> บนอาหาร Chromocult - Listeria Agar	88
19	การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ในอาหารเหลว TSBYE ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้น $10^2$ CFU/ml และเติมสารแบคทีเรียโอซินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ	89
20	การยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นระดับต่างๆ และเติมสารแบคทีเรียโอซินที่ความเข้มข้น 512 AU/ml เป็นเวลา 0 และ 5 นาที	90
21	การเจริญของเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ในอาหาร TSBYE และ น้ำแดงกวาปลดเชื้อ ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ	91
22	ประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซิน ความเข้มข้น 512 AU/ml ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ในน้ำแดงกวาปลดเชื้อที่มีปริมาณ เซลล์เริ่มต้นในระดับ $2 \log$ CFU/ml (ต่ำ, A) และ $5 \log$ CFU/ml (สูง, B) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-10 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส)	93

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23	การยิดเกาะของเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 บนผิวแดงกวาสด เมื่อแช่ในสารละลายเซลล์ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกัน	94
24	ประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซินความเข้มข้น 512 AU/ml ในการยับยั้งเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ที่ปนเปื้อนเทียมบนผิวแดงกวาสดที่ระยะเวลาการแช่ต่างๆ	96
25	ประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการยับยั้งเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 บนผิวแดงกวาสด ที่มีการปนเปื้อนในระดับต่ำ/ระดับสูง	98
26	ผลของสารแบคทีเรียโอซิน ต่ออายุการเก็บรักษาของแดงกวาสดที่ปนเปื้อนเทียมด้วย <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ในระดับต่ำ (A) และระดับสูง (B) เมื่อเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 7 วัน	100
27	ประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซินเมื่อละลายในน้ำประปา ต่อการยับยั้งเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ที่ปนเปื้อนเทียมบนผิวแดงกวาสด ที่ระยะเวลาการเก็บต่างๆ	102
<b>ภาพผนวกที่</b>		
ค1	การเจริญของเชื้อ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU F2 ในอาหารเหลว MRS เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ในสถานะนิ่ง A) optical density OD 600 nm และ B) Log OD 600 nm	150

การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารแบคเทอริโอซิน  
เพื่อใช้ในการควบคุม *Listeria monocytogenes* ในแตงกวาสด

**Selection of Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria  
as Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Fresh Cucumber**

คำนำ

ปัจจุบันการรับประทานอาหารประเภทผักและผลไม้สด รวมทั้งผักสลัดพร้อมบริโภค ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะผักปลอดสารพิษ เนื่องจากผู้บริโภคเล็งเห็นถึงความเสี่ยงจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนจากสารฆ่าแมลงหรือสารปราบวัชพืช ซึ่งนอกจากจะเป็นผลเสียต่อสุขภาพแล้วยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมด้วย อีกทั้งผู้บริโภคเองก็ให้ความสำคัญต่อสุขภาพและตระหนักถึงคุณค่าทางโภชนาการของผักและผลไม้สดที่ผ่านการแปรรูปเพียงเล็กน้อย ซึ่งจะมีค่าใกล้เคียงกับธรรมชาติมากที่สุด และสะดวกต่อการรับประทาน อย่างไรก็ตามผักปลอดสารพิษอาจก่อให้เกิดความเสี่ยงได้จากแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophilla*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* และ *Clostridium sporogenes* (Sagoo *et al.*, 2003) ที่อาจปนเปื้อนมากับปุ๋ยอินทรีย์ที่ใช้ หรือจากดินและน้ำ ดังนั้นถ้าการปฏิบัติในระหว่างการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การแปรรูป และการเก็บรักษาไม่ถูกต้องหลักสุขาภิบาล หรือไม่ได้ใช้ Good Agricultural Practices (GAP) และ Good Manufacturing Practices (GMP) เข้ามาช่วย หรือไม่มีวิธีการใดๆในการลดจำนวนจุลินทรีย์ปนเปื้อนตั้งแต่เริ่มต้น ก็อาจก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพได้

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารหลายๆประเภท มีการประยุกต์สารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกหลายๆชนิดในการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนในอาหาร ซึ่งนอกจากจะใช้เพื่อทดแทนสารเคมีหลายๆ ชนิดแล้ว สารแบคเทอริโอซินโดยเฉพาะนิซิน (nisin) ยังได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยา (FDA) (Eckner, 1992) และ FAO/WHO (Schillinger *et al.*, 1996) ว่ามีความปลอดภัยต่อการบริโภค (Generally Recognized As Safe หรือ GRAS) ไม่ก่อให้เกิดสารตกค้างในอาหาร และมีการใช้ในประเทศต่างๆ มากกว่า 70 ประเทศทั่วโลก ส่วนแบคเทอริโอซินชนิดอื่นที่สำคัญได้แก่ Diplococcin, Acidophilin, Bulgaricin, Helveticin, Lacticin, Plantaricins และ Pediocin (Nettles and Barefoot, 1993) ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิจัยอย่างแพร่หลาย เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารแบคเทอริโอซินชนิดใหม่ ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้อย่างมี

ประสิทธิภาพ โดยงานวิจัยส่วนใหญ่การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจะทำการคัดแยกจากตัวอย่างอาหารประเภทเนื้อสัตว์หมัก นมหมัก และผักหมัก แต่จากผักและผลไม้สด ยังมีการศึกษากันน้อยมาก

ในยุคสมัยที่มีความเร่งรีบ ผู้บริโภคที่มีความใส่ใจสุขภาพมักต้องการอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายและง่ายต่อการรับประทาน ดังนั้นอาหารประเภทผักสลัดพร้อมบริโภค (ready to eat salads) จึงได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย แต่อาหารประเภทนี้มักพบปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อ *Listeria monocytogenes* ซึ่งได้มีรายงาน ผู้ป่วย 41 ราย เสียชีวิต 18 ราย เกิดจากการรับประทาน coleslaw ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* (Bell and Kyriakides, 2005) ดังนั้นในกระบวนการผลิตจึงต้องผ่านวิธีการที่ทำให้มั่นใจได้ว่า ผลิตภัณฑ์มีความสะอาด ปราศจากจุลินทรีย์ปนเปื้อน ไร้สิ่งเจือปน ปลอดภัยต่อผู้บริโภค คงคุณภาพของอาหารและสามารถมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน

ในการศึกษานี้ ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคทีริโอซินจากผักและผลไม้สด รวมทั้งศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการสร้างสารแบคทีริโอซิน และคุณสมบัติของสารแบคทีริโอซิน เพื่อให้สามารถนำมาประยุกต์เป็นสารถนอมอาหารชีวภาพในผักและผลไม้สดพร้อมบริโภคต่อไป

## วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคทีริโอซินจากแหล่งอาหาร โดยเฉพาะผักและผลไม้
2. ศึกษาประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซิน ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค
3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารแบคทีริโอซิน
4. ศึกษาคุณสมบัติของสารแบคทีริโอซินที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น
5. นำสารแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกไปใช้ควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผักสลัดพร้อมบริโภค

## การตรวจเอกสาร

### 1. แบคทีเรียกรดแลคติก

#### 1.1 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกจัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลมหรือท่อน ไม่สร้างสปอร์และเอนไซม์อะมัยเลส ไม่พบไซโตโครม ไม่ต้องการอากาศในการเจริญแต่ทนในสภาวะที่มีอากาศได้ (aerotolerant) ทนกรด (acid tolerant) มีกระบวนการหมักอย่างแท้จริง (strictly fermentative) โดยมีการสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในระหว่างกระบวนการหมักน้ำตาล นอกจากนี้มีความต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนและสมบูรณ์ (fastidious) เช่น ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีสารเร่งการเจริญเติบโต (growth factor) และวิตามินหลายชนิด เช่น ไบโอติน (biotin) ไรโบฟลาวิน (riboflavin) (Prescott and Dunn, 1995) และส่วนใหญ่ต้องการสารอินทรีย์ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม และ ฟอสฟอรัส (Trittsler *et al.*, 1952) แบคทีเรียกรดแลคติกพบได้ทั่วไปในแหล่งที่มีสารอาหารสมบูรณ์ เช่น นม เนื้อสัตว์ และอาหารหมักต่างๆ เป็นต้น (นภา, 2534) บางชนิดเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในร่างกายมนุษย์ เช่น ปาก ลำไส้ เป็นต้น (Axelsson and Holck, 2004)

#### 1.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

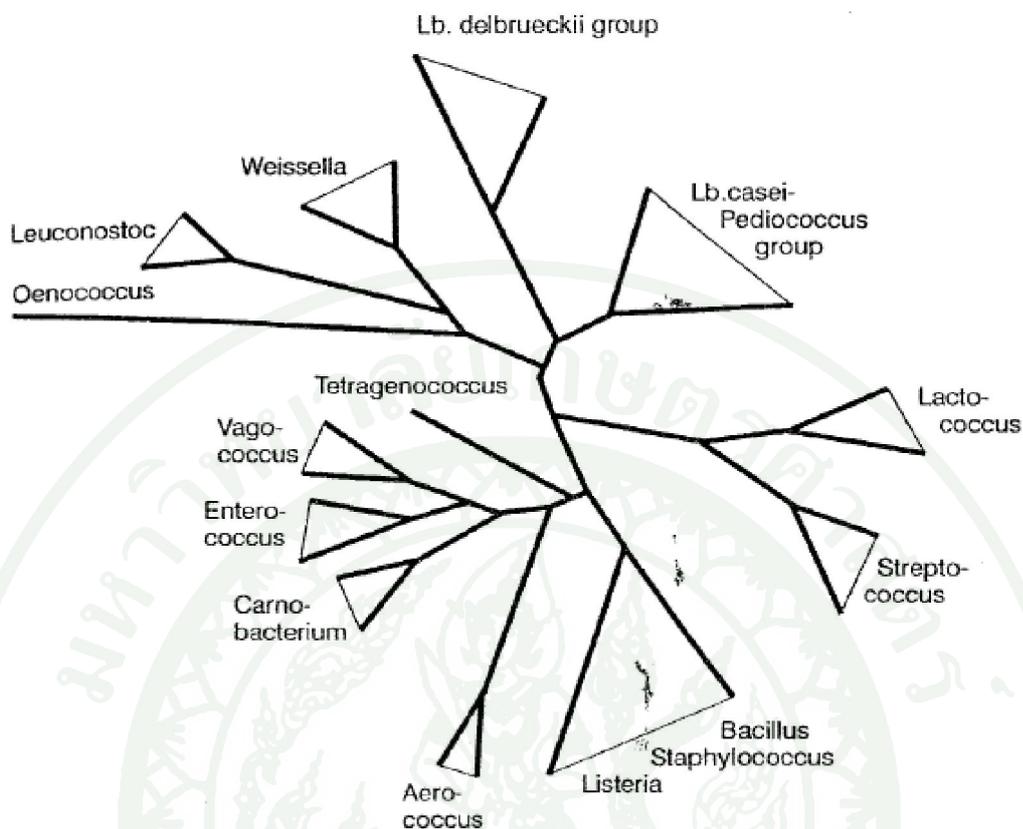
Kingdom: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Order: Lactobacillales

Family Lactobacillaceae

จากการศึกษาวิวัฒนาการของแบคทีเรีย โดยวิธี Oligonucleotide cataloguing พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจะอยู่ในกลุ่ม low-G+C ซึ่งในกลุ่มนี้ออกเหนือจากแบคทีเรียกรดแลคติกแล้วพบว่ายังประกอบด้วยแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มที่มีความจำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญ (aerobes) และแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) เช่น *Bacillus*, *Staphylococcus* และ *Listeria* และ แบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ เช่น *Clostridium*, *Peptococcus* และ *Ruminococcus* (Axelsson and Holck, 2004) ดังแสดงในภาพที่ 1



**ภาพที่ 1** Unrooted phylogenetic tree ของแบคทีเรียกรดแลคติก และแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆที่อยู่ในกลุ่ม low-G+C

**ที่มา:** Axelsson and Holck (2004)

การจัดหมวดหมู่ (classification) ของแบคทีเรียกรดแลคติก อาจอาศัยคุณลักษณะต่างๆ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) วิธีการหมักกลูโคส (glucose fermentative pathway) ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ และการจัดเรียงตัวของกรดแลคติกที่สร้างขึ้น ซึ่งจากความสามารถในการหมักกลูโคสทำให้สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (Axelsson and Holck, 2004) ดังนี้

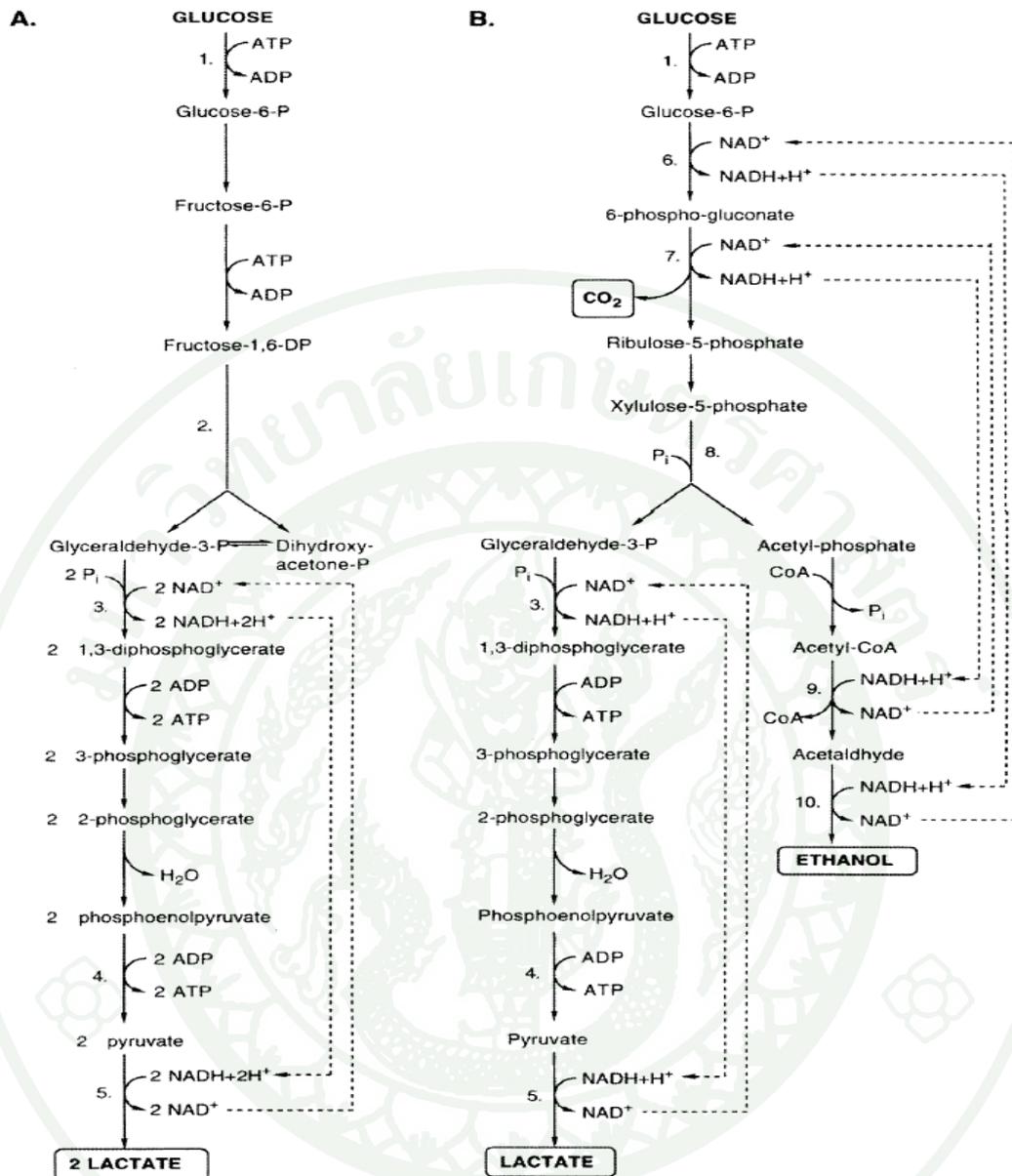
1. Homofermentative lactic acid bacteria กลุ่มนี้ใช้น้ำตาลผ่านวิถี Glycolysis (Embden-Meyerhof-Parnas Pathway) และได้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีเมแทบอลิซึมแบบนี้ ได้แก่ Lactococci, Pediococci, Streptococci และ homofermentative Lactobacilli (De Vuyst and Vandamme, 1994)

กระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียกลุ่มนี้ เริ่มจากการเปลี่ยนกลูโคส 1 โมเลกุล ไปเป็น fructose-1,6-diphosphate (FDP) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ glucokinase และใช้พลังงาน 2 ATP ต่อมา FDP จะถูกเปลี่ยนเป็น dihydroxyacetone-phosphate (DHAP) และ glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) โดยเอนไซม์ fructose-1,6-diphosphate aldolase จากนั้น GAP จะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวตและแลคเตทเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ซึ่งกระบวนการเมแทบอลิซึมนี้เรียกว่า homolactic fermentation ผลของกระบวนการหมักกลูโคส 1 โมเลกุล โดยวิถี ไกลโคไลซิส จะได้พลังงาน ATP 2 โมเลกุลและกรดแลคติก 2 โมเลกุล (Axelsson and Holck, 2004) ดังแสดงในภาพที่ 2 (A)

## 2. Heterofermentative lactic acid bacteria กลุ่มนี้ใช้น้ำตาลผ่านวิถี

6-Phosphogluconate/phosphoketolase จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายหลายชนิด เช่น เอทานอล อะซิเตท คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดแลคติก ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีเมแทบอลิซึมแบบนี้ ได้แก่ Leuconostoc และ heterofermentative Lactobacilli (De Vuyst and Vandamme, 1994)

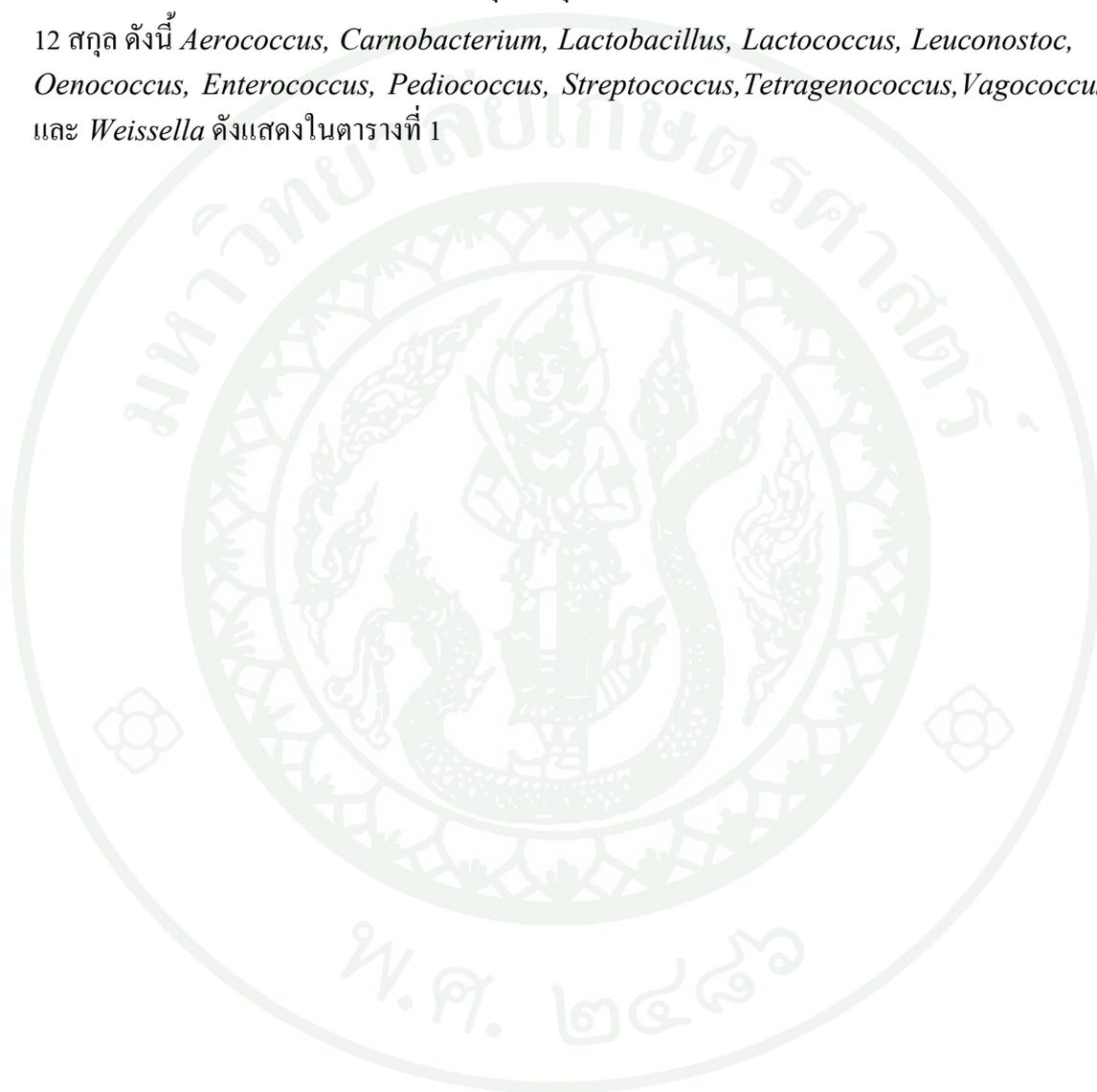
แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มนี้ ไม่มีเอนไซม์อัลโดเลสซึ่งเป็นเอนไซม์ในวิถีไกลโคไลซิส จึงมีการหมักกลูโคสโดยวิถี 6-Phosphogluconate/phosphoketolase ปฏิกิริยาเริ่มต้นของกระบวนการหมักนี้คือ ปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนส เริ่มจากการเปลี่ยนกลูโคส 1 โมเลกุล ไปเป็น 6-phosphogluconate โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ glucokinase และ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ตามด้วยปฏิกิริยา decarboxylation ได้เป็น pentose-5-phosphate กับ  $\text{CO}_2$  จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น GAP และ acetyl phosphate โดยการทำงานของเอนไซม์ phosphoketolase และ GAP จะถูกเมแทบอลิไทต์ตามวิถีไกลโคไลซิส ส่วน acetyl phosphate จะถูกเปลี่ยนเป็น ethanol ซึ่งกระบวนการเมแทบอลิซึมนี้เรียกว่า heterolactic fermentation ผลของกระบวนการหมักกลูโคส 1 โมเลกุล โดยวิถี 6-Phosphogluconate/phosphoketolase จะได้พลังงาน ATP 1 โมเลกุล กรดแลคติก 1 โมเลกุล  $\text{CO}_2$  1 โมเลกุล และ ethanol 1 โมเลกุล (Axelsson and Holck, 2004) ดังแสดงในภาพที่ 2 (B)



ภาพที่ 2 รูปแบบการหมักกลูโคสของแบคทีเรียกรดแลคติก A) Homolactic fermentation (Glycolysis, Embden-Meyerhof-Parnas Pathway); B) Heterolactic fermentation (6-phosphogluconate/phosphoketolase pathway). Selected enzymes are numbered: 1. Glucokinase; 2. Fructose-1,6-diphosphate aldolase; 3. Glyceraldehyde-3-P dehydrogenase; 4. Pyruvate kinase; 5. Lactate dehydrogenase; 6. Glucose-6-phosphate dehydrogenase; 7. 6-phosphogluconate dehydrogenase; 8. Phosphoketolase; 9. Acetaldehyde dehydrogenase; 10. Alcohol dehydrogenase.

ที่มา: Axelsson and Holck (2004)

การศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลกติกโดยอาศัยลักษณะทางกายภาพ คุณสมบัติทางชีวเคมี ลักษณะสัณฐานวิทยา องค์ประกอบของผนังเซลล์ ชนิดของ diamino acid กรดไขมัน ภายในเซลล์ ไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid) ควิโนน (quinone) รวมทั้งการศึกษาในระดับโมเลกุล เช่น mol% G+C ของดีเอ็นเอ การเข้าคู่กันของดีเอ็นเอ ลำดับเบสบน rRNA ทำให้พบลักษณะที่แตกต่างของแบคทีเรียกรดแลกติกแต่ละสกุล ปัจจุบันสามารถจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกออกได้ 12 สกุล ดังนี้ *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* และ *Weissella* ดังแสดงในตารางที่ 1



ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลต่างๆ

ลักษณะต่างๆ	รูปร่างแบบท่อน					รูปร่างแบบกลม				
	<i>Carnob.</i>	<i>Lactob.</i>	<i>Aeroc.</i>	<i>Enteroc.</i>	<i>Lactococ.</i>	<i>Leucon.</i>	<i>Pedioc.</i>	<i>Streptoc.</i>	<i>Tetragenoc.</i>	<i>Weissella.</i> <sup>a</sup>
					<i>Vagoc.</i>	<i>Oenoc.</i>				
เซลล์ต่อกัน 4 เซลล์	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO <sub>2</sub> จากกลูโคส <sup>b</sup>	- <sup>c</sup>	±	-	-	-	+	-	-	-	+
เจริญที่ 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
เจริญที่ 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
เจริญที่ 6.5% NaCl	ND <sup>d</sup>	±	+	+	-	±	±	-	+	±
เจริญที่ 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
เจริญที่ พีเอช 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
เจริญที่ พีเอช 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
ชนิดของกรดแลคติก <sup>e</sup>	L	D,DL,L <sup>f</sup>	L	L	L	D	L,DL <sup>f</sup>	L	L	D,DL <sup>f</sup>

หมายเหตุ +, positive; -, negative; ±, response varies between species; ND, not determined., <sup>a</sup>Weissella strains may also be rod-shaped.,

<sup>b</sup>Test for homo or heterofermentation of glucose; negative and positive denotes homofermentative and heterofermentative, respectively., <sup>c</sup>Small amounts of CO<sub>2</sub> can be produced, depending on media., <sup>d</sup>No growth in 8% NaCl has been reported.,

<sup>e</sup>Configuration of lactic acid produced from glucose., <sup>f</sup>Production of D-, L-, or DL-Lactic acid varies between species.

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวย่อชื่อเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดหมายถึง

*Carnob.* = Carnobacterium, *Lactob.* = Lactobacillus, *Aeroc.* = Aerococcus, *Enteroc.* = Enterococcus, *Lactococ.* = Lactococcus, *Leucon.* = Leuconostoc, *Pedioc.* = Pediococcus, *Streptoc.* = Streptococcus, *Tetragenoc.* = Tetragenococcus, *Weissella.* = Weissella, *Vagoc.* = Vagococcus, *Oenoc.* = Oenococcus

ที่มา: Axelsson and Holck (2004)



### 1.3 สารที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกและมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น

กระบวนการหมักที่เกิดจากแบคทีเรียกรดแลคติกจะมีการสร้างสารหลายชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซีทิล รูทีริน และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น (Ouwehand and Vesterlund, 2004) สารเหล่านี้สามารถยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียหรือจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ทำให้สามารถยืดอายุการเก็บของอาหารได้นานขึ้น โดยจะมีผลต่อเซลล์เป้าหมายที่จำเพาะเจาะจงเช่น เยื่อหุ้มเซลล์ หรือเอนไซม์ในเซลล์ เป็นต้น ซึ่งประสิทธิภาพของสารยับยั้งเหล่านี้จะขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้นของสาร อุณหภูมิ ค่าพีเอช ระยะเวลาการสัมผัส ชนิดและระยะการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน

เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างของสารยับยั้งเหล่านี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ดังนี้

#### 1.3.1 Non-peptide inhibitor สารยับยั้งในกลุ่มนี้เป็นสารยับยั้งที่มีไซสาร โปรตีน ได้แก่

1) กรดอินทรีย์ (Organic acid) ผลของกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต โดยแบคทีเรียกรดแลคติก มักจะได้สารอินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่น โดยในกระบวนการหมักแบบวิถีไกลโคไลซิส จะได้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียว แต่ในกระบวนการหมักแบบวิถี 6-Phosphogluconate/phosphoketolase จะได้กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดไพรูวิก สำหรับประสิทธิภาพในการยับยั้งของกรดอินทรีย์ กรดอะซิติกจะมีประสิทธิภาพดีกว่า กรดไพรูวิกและกรดแลคติก ตามลำดับ โดยสามารถยับยั้งได้ทั้งยีสต์ ราและแบคทีเรีย การที่กรดอะซิติกและกรดไพรูวิกสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่า เนื่องจากมีค่าการแตกตัว ( $pK_a$ ) สูงกว่ากรดแลคติก (กรดอะซิติกมีค่า  $pK_a = 4.87$ , กรดไพรูวิกมีค่า  $pK_a = 4.75$ , กรดแลคติกมีค่า  $pK_a = 3.08$ ) ในสภาวะที่มีความเป็นกรดต่ำ กรดที่มีค่า  $pK_a$  สูงจะอยู่ในรูปไม่แตกตัวมากกว่ากรดที่มีค่า  $pK_a$  ต่ำ ซึ่งกรดที่อยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวสามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ เนื่องจากมีความสามารถเป็น lipid-soluble หลังจากกรดอินทรีย์แพร่เข้าสู่เซลล์แล้วจะเกิดการแตกตัวปล่อยโปรตอนออกสู่ไซโตพลาสซึม ทำให้เกิดการสะสมของกรดและทำลายความสมดุลของความต่างศักย์ภายในเซลล์ ส่งผลต่อการทำงานของกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ต่าง ๆ ภายในเซลล์

2) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ในสภาวะที่มีออกซิเจนแบคทีเรียกรดแลคติก จะผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในระหว่างกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอน โดยอาศัยการทำงานของ เอนไซม์ในกลุ่มฟลาวิน (Flavin enzyme) คือ NADH oxidase และ Superoxide dismutase การขาด แหล่งของ heme ทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส เพื่อใช้ในการ เคลื่อนย้าย  $H_2O_2$  ทำให้เกิดการสะสมของ  $H_2O_2$  สารนี้มีคุณสมบัติเป็น strong oxidizing agent สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ โดยการ oxidize sulfhydryl group บนเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ไม่สามารถ ควบคุมการผ่านเข้าออกของสารได้

3) ไดอะซีทิล (Diacetyl) สารไดอะซีทิล (2,3-butanedione) ผลิตโดย *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ เมแทบอลิซึมของซิเตรต โดยซิเตรตจะถูกเปลี่ยนผ่านไพรูเวทไปเป็นไดอะซีทิล สารนี้สามารถยับยั้ง การเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและที่ทำให้อาหารเน่าเสีย มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากไดอะซีทิลจะไปขัดขวางการ ใช้อาร์จินีนของแบคทีเรียแกรมลบ โดยไปแทนที่อาร์จินีนในการรวมตัวกับ arginine-binding protein

4) คาร์บอนไดออกไซด์ ( $CO_2$ ) เป็นผลผลิตที่เกิดจาก heterofermentation สามารถ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น โดยไปมีผลต่อ enzymatic decarboxylation นอกจากนี้การสะสม ของ  $CO_2$  บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ยังมีผลต่อการส่งผ่านสารเข้าออกด้วย

5) รูทีริน (Reuterin) *Lactobacillus reuteri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในทางเดิน อาหารของมนุษย์และสัตว์ มีความสามารถในการผลิตสารรูทีริน ซึ่งมีชื่อทางเคมีว่า 3-hydroxypropanol จัดเป็นสารมวลโมเลกุลต่ำ เซลล์จะผลิตรูทีรินเมื่อเจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ และในสารผสมของกลูโคส กลีเซอรอล และกลีเซอรอลดีไฮด์ เมื่อเกิดปฏิกิริยา dehydration ของ กลีเซอรอล เซลล์จะทำการผลิตรูทีริน ต่อมาถูกรีดิวซ์เป็น 1,3-propanediol โดยเอนไซม์ NADH+ $H^+$ -dehydrogenase มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นทั้งแบคทีเรีย รา ไวรัส และโปรโตซัว โดยยับยั้ง กิจกรรมของเอนไซม์ sulfhydryl โดยจะจับกับเอนไซม์บริเวณ substrate binding subunit ของ ribonucleotide reductase ทำให้มีผลต่อการสร้าง DNA

6) เอทานอล (Ethanol) เอทานอลเกิดจากการกระบวนการหมักแบบ heterofermentative ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกได้เปรียบในการแข่งขันกับแบคทีเรียอื่นๆ ในการเจริญเติบโต ถึงแม้ว่าเอทานอลจะเกิดขึ้นในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็ตาม

7) อะซีทัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) เป็นผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายสารคาร์โบไฮเดรต โดยทั่วไปมีปริมาณเพียงเล็กน้อย แต่มีบทบาทต่อรสชาติ กลิ่นและเนื้อสัมผัสของอาหารนั้น และมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้

1.3.2 Peptide inhibitor สารยับยั้งที่เป็นสารประเภทโปรตีน ได้แก่ แบคเทอริโอซิน แบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ ที่รู้จักกันดีคือ สาร nisin ซึ่งสร้างจาก *Lactococcus lactis* เป็นสารที่ได้รับการยอมรับจาก FDA และ FAO/WHO ให้ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนในอาหาร (Eckner, 1992; Schillinger *et al.*, 1996) ปัจจุบันสารไนซินมีการผลิตในเชิงการค้าและได้รับการยอมรับให้ใช้ในประเทศต่างๆ มากกว่า 70 ประเทศทั่วโลก โดยนำมาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย นอกเหนือจากไนซินแล้วแบคเทอริโอซินชนิดอื่นที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ Pediocin, Lactacin, Sakacin, Leucocin, Acidophilin, Bulgaricin, Helveticin, Plantaricins เป็นต้น (Nettles and Barefoot, 1993)

## 2. สารแบคเทอริโอซิน

### 2.1 ประวัติการค้นพบ

การค้นพบแบคเทอริโอซินเริ่มขึ้นในปี 1925 โดย Gratia สังเกตว่า *E. coli*  $\Phi$  ถูกยับยั้งโดยสารยับยั้งที่สร้างจาก *E. coli* V จึงเรียกสารยับยั้งดังกล่าวว่า colicin ต่อมาพบการสร้าง colicin-like substance จากแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ ด้วย เช่น monocins พบใน *Listeria monocytogenes*, subtilin พบใน *Bacillus subtilis*, staphylocin พบใน *Staphylococcus aureus* เป็นต้น นอกจากนี้แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบมีความสามารถในการยับยั้งแคบ (narrow spectrum) กว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวก (wide spectrum) (De Vuyst and Vandamme, 1994) แบคทีเรียชนิดอื่นที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน ได้แก่ *Acetobacter* spp., *Actinobacillus* spp., *Bacillus* spp.,

*Brevibacterium* spp., *Clostridium* spp., *Erwinia* spp., *Haemophilus* spp., *Haloferax* spp., *Listeria* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Propionibacterium* spp., *Serratia* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus* spp., *Yersinia* spp. (Montville และ Kaiser, 1993)

ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกด้วยกัน แบคทีเรียกรดแลคติก นับว่าได้รับความสนใจมากที่สุด เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในอาหารหมัก และได้รับการยอมรับจาก FDA ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe, GRAS) และสารยับยั้งหลายชนิดที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก สามารถยืดอายุการเก็บของอาหารได้ ที่สำคัญพบว่าจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดถูกยับยั้งโดยสารแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก

## 2.2 ความหมายของแบคทีเรียโอซิน

Jacob *et al.* (1953) ได้ให้คำจำกัดความของแบคทีเรียโอซินว่า เป็นสารปฏิชีวนะกลุ่มโปรตีน เป็นสารมวลโมเลกุลสูง มีความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวกันหรือสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน

Tagg *et al.* (1976) ได้ให้คำจำกัดความของแบคทีเรียโอซิน ตามลักษณะของสารประกอบโปรตีนที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมบวก ว่าเป็นสารประกอบโปรตีน ที่ออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรีย (bactericidal) โดยมีตำแหน่งที่จำเพาะในการยึดจับกับเซลล์เป้าหมาย และยีนที่ควบคุมการสร้างและต้านทานของเซลล์ผู้สร้างต่อแบคทีเรียโอซิน อยู่บนพลาสมิด (plasmid) มีการออกฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกัน หรือที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซินออกมา

Konisky (1982) ได้ให้คำจำกัดความของแบคทีเรียโอซินว่า เป็นสารประกอบกลุ่มโปรตีนและไม่ทำลายเซลล์ที่สร้างแบคทีเรียโอซิน

Klaenhammer (1988) กล่าวว่าแบคทีเรียโอซิน เป็นโปรตีนหรือสารประกอบโปรตีนซึ่งมีฤทธิ์ในการต่อต้านแบคทีเรียที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซินออกมา

Earnshaw (1992) ได้ให้คำจำกัดความว่า แบคทีเรียโอซินคือโปรตีนหรือสายเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านจุลินทรีย์ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซินออกมา

ปัจจุบันคำนิยามของแบคทีเรียโอซินที่ใช้กันแพร่หลายคือ สารประกอบโปรตีนซึ่งสังเคราะห์จากไรโบโซม ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่สร้าง (De Vuyst and Vandamme, 1994)

สารแบคทีเรียโอซินที่พบในแบคทีเรียหลายชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียเช่นเดียวกับสารปฏิชีวนะ แต่มีข้อแตกต่างที่เด่นชัด คือ มีฤทธิ์ในการยับยั้งแคบกว่าเฉพาะในกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเซลล์ผู้สร้างเท่านั้น ข้อแตกต่างอื่นๆดังแสดงในตารางที่ 2 นอกจากนี้ สารแบคทีเรียโอซินยังมีความแตกต่างจากสารยับยั้งประเภท non-peptide inhibitor กล่าวคือ สารแบคทีเรียโอซินจะมี specific binding sites บนเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย จึงทำให้สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้เฉพาะกลุ่มเท่านั้น (Montville and Kaiser, 1993)

## ตารางที่ 2 ความแตกต่างระหว่างสารแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะ

Characteristic	Bacteriocins	Antibiotics
Application	Food	Clinical
Synthesis	Ribosomal	Secondary metabolite
Activity	Narrow spectrum	Varying spectrum
Host cell immunity	Yes	No
Mechanism of target cell resistance or tolerance	Usually adaptation affecting cell membrane composition	Usually a genetically transferable determinant affecting different sites depending the mode of action
Interaction requirements	Sometimes docking molecules	Specific target
Mode of action	Mostly pore formation, but in a few cases possibly cell wall biosynthesis	Cell membrane or intracellular targets
Toxicity/side effects	None known	Yes

ที่มา: Cleveland *et al.* (2001)

### 2.3 ประเภทของแบคทีเรียโอซิน

Holzapel (1995) รายงานการจัดแบ่งแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ Lantibiotic, Peptide bacteriocins, Protein bacteriocins และ Complex bacteriocins โดยแต่ละกลุ่มมีโครงสร้างและคุณสมบัติแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ประเภทและคุณสมบัติของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

Type	Structure	Heat stability	Antibacterial spectrum	Example
Lantibiotics	small (< 5 kDa) unusual amino acids (e.g. lanthionine)	+	medium to broad	nisin lacticin 481
Peptide bacteriocins	small (< 10 kDa) no lanthionine	+	medium to broad	pediocin AcH sakacin A leucocin UAL 187
Protein bacteriocins	large (> 10 kDa) no lanthionine	-	narrow	helveticin J cascicic 80
Complex bacteriocins	glyco- and/or lipid moiety	+	medium	leuconocin S pediocin SJ-1

ที่มา: Holzapel (1995)

### 2.4 การสังเคราะห์แบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกสังเคราะห์จากไรโบโซม โดยยีนโครงสร้าง (structural gene) ที่ทำหน้าที่ถอดรหัสเพื่อสร้างเป็นแบคทีเรียโอซิน ซึ่งมักพบอยู่บนพลาสมิด (plasmid) ทรานสโปซอน (transposons) หรือโครโมโซม (chromosome) (Jack *et al.*, 1995) ยีนที่ทำการสร้างแบคทีเรียโอซินจะอยู่รวมกันเป็นโอเปอรอน (operon cluster) ซึ่งประกอบด้วยยีนต่างๆ คือ ยีนที่ทำการสังเคราะห์ pre-peptide (ภายหลังจะผ่านกระบวนการต่างๆ ทำให้อยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้ (active form)) ยีนที่สังเคราะห์โปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งแบคทีเรียโอซินออกนอกเซลล์ โดยกระบวนการ ABC transport system ยีนที่ทำหน้าที่ควบคุม

(regulatory protein) และยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ immunity protein ซึ่งจะช่วยป้องกันตัวเองจากการถูกทำลายโดยแบคทีเรียโอซินที่เซลล์สร้างขึ้น (Cleveland *et al.*, 2001)

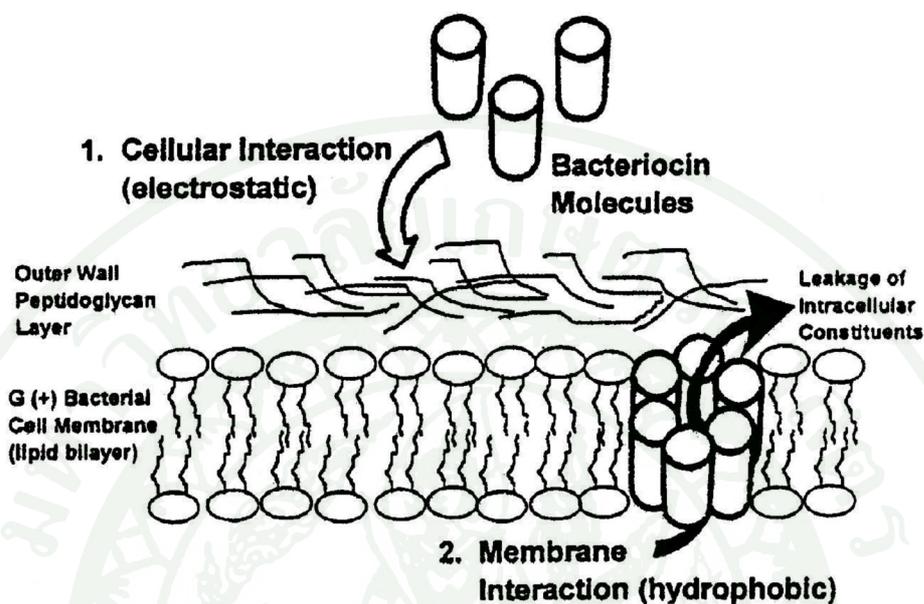
## 2.5 กลไกการทำลายเซลล์เป้าหมายของสารแบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยกัน นอกจากนี้การที่แบคทีเรียกรดแลคติกจัดอยู่ในกลุ่ม low-G+C เหมือนกับเชื้อ *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria* และ *Clostridium* จึงทำให้สารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดสามารถยับยั้งเชื้อเหล่านี้ได้ด้วยเช่นกัน

โดยทั่วไปกลไกการเข้าทำลายจุลินทรีย์ของแบคทีเรียโอซิน เริ่มจากการเข้ายึดเกาะกับตัวรับ (receptor) ที่เฉพาะเจาะจงหรือไม่เฉพาะเจาะจงที่ผิวของเซลล์เป้าหมาย ทำให้เกิดรูในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ (ภาพที่ 3) และสูญเสียความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ออกสู่ภายนอก เช่น เสื่อมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโน และสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ ทำให้เซลล์ถูกทำลาย (bactericidal) อย่างไรก็ตาม ขั้นตอนและกลไกในการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรียโอซิน บางชนิดอาจเพียงยับยั้งการเจริญ (bacteriostatic) แต่ไม่ได้ฆ่าทำลายเซลล์ (De Vuyst and Vandamme, 1994) ซึ่งได้มีรายงานการวิจัยของ Jamuna and Jeevaratnam (2004) พบว่า แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Pediococcus acidilactici* NCIM 2292, *Pediococcus pentosaceus* NCIM 2296 และ *P. cerevisiae* NCIM 2171 มีกลไกในการทำลาย *Staphylococcus aureus* เป็นแบบ bactericidal ส่วน Huang *et al.* (2009) พบว่า pediocin 05-10 ที่สร้างจากเชื้อ *P. pentosaceus* 05-10 สามารถทำลายเชื้อ *Listeria monocytogenes* 54002 โดยทำให้จำนวนเซลล์ลดลงจาก  $4.5 \times 10^8$  CFU/ml เป็น  $4.4 \times 10^5$  CFU/ml ภายหลังจากเติม แบคทีเรียโอซินลงไป 2 ชั่วโมง แต่ยังมีสารแบคทีเรียโอซินบางชนิดเป็นได้ทั้ง bactericidal และ bacteriolytic เช่น แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *P. pentosaceus* Iz3.13 (Bagenda *et al.*, 2008)

สำหรับแบคทีเรียแกรมลบจะไม่ถูกทำลายโดยแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบจะมีชั้นของ outer membrane หุ้มอยู่อีกชั้น ทำให้สามารถปกป้องเซลล์จากการถูกทำลายโดยแบคทีเรียโอซินได้ อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่าการเติมสาร chelating agent เช่น EDTA หรือ citrate จะไปช่วยจับกับแมกนีเซียมไอออนในชั้นของ

lipopolysaccharide ของแบคทีเรียแกรมลบทำให้เซลล์ยอมรับต่อสารแบคทีริโอซินและถูกทำลายได้ง่ายขึ้น (Stevens *et al.*, 1991)



ภาพที่ 3 แบบจำลองการทำให้เกิดรูที่เชื่อมหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก

ที่มา: Muriana (1996)

### 3. ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารแบคทีริโอซิน

สารแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก อาจมีผลกระทบจากหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ของเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ระยะการเจริญของเชื้อ และอื่นๆ เป็นต้น (Parente and Ricciardi, 1999)

### 3.1 สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกต่างสายพันธุ์กันจะสร้างสารแบคทีริโอซินที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละชนิดก็แตกต่างกันด้วย (ตารางที่ 4)

**ตารางที่ 4** แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคทีริโอซินยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกลุ่มแกรมบวก

Genus	Bacteriocin	Activity against				
		<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Carnobacterium</i>	Unnamed from <i>C. piscicola</i> LK5	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Carnobacteriocins A and B	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Lactobacillus</i>	Piscicolin 61	+	-	-	n.d.	n.d.
	Bavaricin A	+	-	-	n.d.	n.d.
	Bavaricin MN	+	-	n.d.	-	n.d.
	Curvacin A	+	(+)	-	n.d.	n.d.
	Curvaticin 13	+	+	+	n.d.	n.d.
	Plantaricin BN	+	-	n.d.	+	n.d.
	Sakacin A	+	-	n.d.	-	n.d.
	Sakacin M	+	(+)	-	(+)	(+)
	Sakacin P	+	-	-	n.d.	n.d.
<i>Leuconostoc</i>	Carnocin 44	+	-	-	n.d.	n.d.
	Leucocin UAL 187	+	-	n.d.	n.d.	n.d.
	Leuconocin S	+	+	n.d.	+	n.d.
	Mesenterocin 5	+	-	n.d.	n.d.	n.d.
	Mesenterocin 52	+	-	-	n.d.	n.d.
	Mesentericin Y 105	+	-	-	n.d.	n.d.
	Unnamed from <i>Leuconostoc gelidum</i> IN 139	+	-	-	-	-
<i>Pediococcus</i>	Pediocin A	+	+	n.d.	+	+
	Pediocin AcH	+	+	+	- (spores)	+
	Pediocin PA-1	+	-	n.d.	n.d.	n.d.
	Pediocin PC	+	-	-	n.d.	+
	Pediocin SJ1	+	-	n.d.	n.d.	+

ที่มา: Holzapfel (1995)

### 3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรียกรดแลคติกจะสามารถเจริญและสร้างแบคทีเรียโอซินได้ดีขึ้นขึ้นอยู่กับปริมาณและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ปริมาณกลูโคส ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ เป็นต้น โดย Biswas *et al.* (1991) พบว่าเชื้อ *P. acidilactici* H สามารถเจริญและสร้างแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Tryptone Glucose Extract (TGE) ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับ Ogunbanwo *et al.* (2003) พบว่าเชื้อ *Lactobacillus brevis* OG1 สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมสูงที่สุดในอาหารเหลว De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์และเกลือเข้มข้น 1-2 เปอร์เซ็นต์ โดยสารแบคทีเรียโอซินมีค่ากิจกรรม 6,400 AU/ml (arbitrary unit/milliliter) และ Vignolo *et al.* (1995) พบว่า *Lactobacillus casei* CRL 705 สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ โดยแบคทีเรียโอซินมีค่ากิจกรรม 1,066 AU/ml นอกจากนี้ พงษ์เทพ (2546) พบว่า แบคทีเรียโอซินที่สร้างโดย *Enterococcus faecium* NKR-5-3 มีค่ากิจกรรมลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหาร โดยเชื้อสามารถเจริญและสร้างแบคทีเรียโอซินได้ดีในอาหารที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ 0-1 เปอร์เซ็นต์และแบคทีเรียโอซินมีค่ากิจกรรม 12,800 AU/ml

### 3.3 อุณหภูมิ

แบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์ สามารถเจริญและสร้างสารแบคทีเรียโอซินเมื่อบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ซึ่งได้มีรายงานการวิจัยพบว่า pediocin AcH, pediocin SA-1 และ lactocin 705 ที่สร้างจากเชื้อ *P. acidilactici* H, *P. acidilactici* NRRL B5627 และ *L. casei* CRL 705 ตามลำดับ มีค่ากิจกรรมดีที่สุดเมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Ray, 1995; Vignolo *et al.*, 1995) ส่วน pediocin ACCEL และ pediocin AcH ที่สร้างจากเชื้อ *P. pentosaceus* ACCEL และ *P. acidilactici* H มีค่ากิจกรรมดีที่สุดเมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Biswas *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงเช่น *P. acidilactici* LS2-30 สามารถเจริญในอาหารเหลว MRS และสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (ชุตินันท์, 2547)

### 3.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียกรดแลคติกต่างสายพันธุ์กันจะมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่างกัน โดย Biswas *et al.* (1991) พบว่าเชื้อ *P. acidilactici* H สามารถสร้าง pediocin AcH ที่มีค่ากิจกรรม 3,600 AU/ml ในอาหารเหลว TGE ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.5 และ Vignolo *et al.* (1995) พบว่าเชื้อ *L. casei* CRL 705 สร้าง lactocin 705 ได้ดีที่สุดในอาหารเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นระหว่าง 6.5-7.5 และแบคทีเรียโอซินมีค่ากิจกรรม 2,133 AU/ml นอกจากนี้ Kaiser and Montville (1993) พบว่าเชื้อ *L. bavaricus* MN ผลิต bavaricin MN ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอช 6.0 และ Parente and Ricciardi (1994) พบว่าเชื้อ *E. faecium* DPC 1146 ผลิต enterocin 1146 ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอช 5.5 Franz *et al.* (1996) รายงานว่าเชื้อ *E. faecium* BFE 900 สร้าง enteriocin 900 ได้ดีในอาหารเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 6 และแบคทีเรียโอซินมีค่ากิจกรรม 6,400 AU/ml ส่วน Nel *et al.* (2001) พบว่า pediocin PD-1 มีค่ากิจกรรมสูงที่สุดในอาหารเหลว MRS ที่มีค่าพีเอช เริ่มต้นเป็น 6.7

### 3.5 ระยะเวลาเจริญของเชื้อ

การสร้างแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก มักสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ โดยแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกจะสร้างระหว่างช่วง logarithmic phase และ stationary phase (Piard and Desmazaud, 1992) โดยมีการรายงานว่าพบการสร้าง pediocin SA-1 และ pediocin PD-1 จาก *P. acidilactici* NRRL B5627 และ *Pedicoccus damnosus* NCFB 1832 ตามลำดับ ในช่วงต้นของการเจริญ (early exponential growth) (Anastasiadou *et al.*, 2008a; Green *et al.*, 1997) ส่วน Bagenda *et al.* (2008) พบการสร้างแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *P. pentosaceus* Iz3.13 ในช่วง mid-logarithmic phase และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามการเจริญของเชื้อ เช่นเดียวกับ Huang *et al.* (2009) พบว่า pediocin 05-10 สร้างโดยเชื้อ *P. pentosaceus* 05-10 ในช่วงต้นของการเจริญ (early exponential growth) และสร้างสูงสุดในช่วง early stationary phase และเมื่อถึงชั่วโมงที่ 20 พบว่าการสร้างลดลงเนื่องจากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ proteolytic หรือมีการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม

#### 4. การใช้ประโยชน์จากสารแบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียกรดแลคติกได้มีการนำไปใช้เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์ ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักกันอย่างกว้างขวางตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน แต่แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่งได้รับความสนใจและนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเมื่อไม่นานมานี้เอง เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อน ทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ช่วยให้อาหารมีอายุการเก็บนานขึ้น ลดความเสี่ยงจากอาหารเป็นพิษ ลดการสูญเสียจากการเน่าเสีย และลดการใช้สารเคมีในอาหาร เป็นต้น (Cleveland *et al.*, 2001; Galvez *et al.*, 2007) สำหรับการประยุกต์สารแบคทีเรียโอซินในอาหารประเภทต่างๆอาจทำได้ 2 ลักษณะคือ การเติมแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินลงไปเป็นเชื้อตั้งต้นหรือมีส่วนร่วมในกระบวนการหมัก (bioprotective culture) หรือเติมแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์หรือกึ่งบริสุทธิ์ลงไปเป็นสารถนอมอาหารโดยตรง (biopreservation) ซึ่งการประยุกต์ในแบบหลังมีการใช้ในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ เนยแข็ง ผลิตภัณฑ์นม เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ กันอย่างแพร่หลาย ดังแสดงในตารางที่ 5

## ตารางที่ 5 การประยุกต์สารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร

Bacteriocin	Application	Conclusion
Nisin A	Incorporation of nisin into a meat binding system (Fibrimex)	Addition of nisin can reduce undesirable bacteria in restructured meat products
Pediocin AcH	Use of a pediocin AcH producer <i>Lactob. plantarum</i> WHE 92 to spray on the Munster cheese surface at the beginning of the ripening period	Spray prevents outgrowth of <i>L. monocytogenes</i> and can be used as an antilisterial treatment
Enterocin 4	Use of an enterocin producer <i>Ent. faecalis</i> INIA4 as a starter culture for production of Manchego cheese	Use of an <i>Ent. faecalis</i> INIA4 starter inhibits <i>L. monocytogenes</i> Ohio, but not <i>L. monocytogenes</i> Scott A
Linocin M-18	Use of <i>Bre. lines</i> as a starter culture for production of red smear cheese	Causes 2 log reduction of <i>L. ivanovi</i> and <i>L. monocytogenes</i>
Nisin A	Use of nisin to control <i>L. monocytogenes</i> in ricotta cheese	Nisin effectively inhibits <i>L. monocytogenes</i> for 8 weeks
Piscicolin 126	Use of piscicolin 126 to control <i>L. monocytogenes</i> in devilled ham paste	More effective than commercially available bacteriocins
Leucocin A	Use of a leucocine-producing <i>Leu. gelidum</i> UAL187 to control meat spoilage	Inoculation of a vacuum packed beef with the bacteriocin-producer delays the spoilage by <i>Lactob. sake</i> for up to 8 weeks
Lactocin 705	Use of lactocin 705 to reduce growth of <i>L. monocytogenes</i> in ground beef	Lactocin 705 inhibits growth of <i>L. monocytogenes</i> in ground beef
Pediocin AcH	Use of the pediocin producer <i>P. acidilactici</i> to inhibit <i>L. monocytogenes</i>	<i>P. acidilactici</i> (Ped <sup>+</sup> ) starter culture contributes to effective reduction of <i>L. monocytogenes</i> during manufacture of chicken summer sausage
Pediocin	Expression of pediocin operon in <i>Sac. cerevisiae</i>	Potential application in preserving wine and baked products
Pediocin AcH	Add pediocin preparation to raw chicken	Controlled growth of <i>L. monocytogenes</i> at 5 °C for 28 days
Pediocin PA-1	Use of <i>P. acidilactici</i> (Ped <sup>+</sup> ) strain as a starter culture in sausage fermentation	Pediocin effectively contributes to inhibition of <i>L. monocytogenes</i>
Enterocin	Add enterocin to inoculated ham, pork, chicken breast, pate, sausage	Controlled growth of <i>L. monocytogenes</i> under several conditions

ที่มา: Cleveland *et al.* (2001)

แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกได้ถูกนำมาเป็นสารถนอมอาหารประเภทชีวภาพ เนื่องจากสามารถถูกทำลายได้โดยเอนไซม์โปรติเอสในลำไส้เล็ก และอาจใช้ในการควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในมนุษย์ (Cleveland *et al.*, 2001) ซึ่งในปัจจุบันได้มีการผลิตแบคทีเรียโอซินทางการค้า เช่น นิสิน โดยมีชื่อทางการค้าว่า Nisaplin™ (Aplin and Barrett Ltd., UK) ผลิตโดย *Lactococcus lactis* และ Pediocin PA-1/AcH มีชื่อทางการค้าว่า ALTA™ 2431 (Quest International, Australia) ผลิตโดย *P. acidilactici* (อรอนงค์, 2550)

แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาเป็นสารลดอาหารเนื่องจากได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยต่อผู้บริโภค ไม่เป็นพิษต่อ Eukaryote cells ถูกทำลายได้โดยน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร จึงไม่ส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร ทนต่อค่าพีเอชต่างๆ และความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ บางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อกว้าง สามารถยับยั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคและเชื้อที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และควบคุมการสร้างโดยยีนที่อยู่บนพลาสมิด จึงง่ายต่อการทำการปรับแต่งทางพันธุกรรม (genetic manipulation) (Galvez *et al.*, 2007)

Thomas *et al.* (2000) รายงานการศึกษาการประยุกต์สารแบคทีเรียโอซินเป็นสารลดอาหารชีวภาพ พบว่าแบคทีเรียโอซินช่วยในการยืดอายุการเก็บของอาหาร สามารถทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร และลดความเสี่ยงของผู้บริโภคในการรับประทานอาหาร ลดการทำให้อาหารเน่าเสีย ส่งผลให้เศรษฐกิจดีขึ้น ลดการใช้สารเคมี และสามารถนำไปใช้กับอาหารที่ไม่ผ่านความร้อนหรือผ่านความร้อนเพียงเล็กน้อยเพื่อช่วยให้อาหารคงคุณค่า ทำให้อาหารรับประทานและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

## 5. การทำแบคทีเรียโอซินให้บริสุทธิ์

โดยทั่วไปแบคทีเรียโอซินที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างจะถูกปล่อยออกนอกเซลล์สู่อาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นในการทำให้แบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ ขั้นแรกต้องทำการแยกสารแบคทีเรียโอซินออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีวิธีการต่างๆ กันเช่น การดูดซับแบคทีเรียโอซินด้วย Amberlite XAD-16 (Cintas *et al.*, 2000) วิธี Vacuum concentration (Upreti and Hinsdill, 1973) การตกตะกอนแบบลำดับส่วนด้วยเกลือ (Salt fractionation precipitation) เช่น การตกตะกอนด้วย ammonium sulfate (Muriana and Luchansky, 1993) การใช้กรดตกตะกอน (Acid precipitation) หรือ การใช้ organic solvents (Hastings *et al.*, 1991) การปรับพีเอชที่เหมาะสมให้แบคทีเรียโอซินดูดซับบนผิวเซลล์ผู้ผลิต (Parente and Ricciardi, 1999) เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีจะมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามแบคทีเรียโอซินที่แยกออกมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจนำไปทำให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นด้วยวิธีการโครมาโตกราฟีแบบต่างๆ เช่น size exclusion (gel filtration), adsorption (ion exchange), hydrophobic interaction (reversed-phase) chromatography (HIC) (Muriana and Luchansky, 1993)

Amberlite XAD-16 เป็นเรซินประเภท non-ionic hydrophobic cross-linked polymer มีคุณสมบัติในการดูดซับสารประเภท hydrophobic compound ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยถึงประมาณ 40,000 Dalton จากสารละลาย polar solvent หรือ volatile organic compound และมีโครงสร้างเป็น aromatic polymer และมีพื้นที่ผิวมากเนื่องจากรูบริเวณผิวของเม็ดเรซิน ทำให้สามารถดูดซับสารต่างๆ ได้ดี (<http://www.advancedbiosciences.com>) สำหรับสารแบคทีเรียไอซอินซึ่งมีประจุบวกและมีความเป็น hydrophobic สูง จึงดูดซับบน amberlite ได้ดี และมีการใช้เรซินนี้ในการแยกสารแบคทีเรียไอซอินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิด เช่น enterocin A และ enterocin B ที่ผลิตจาก *E. faecium* T136 (Casaus *et al.*, 1997), enterocin P และ enterocin Q ที่ผลิตจาก *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 2000), lacticin Z ที่ผลิตจาก *L. lactis* QU 14 (Iwatani *et al.*, 2007) หลังจากการดูดซับบนผิวของเม็ดเรซิน จะทำการชะสารที่ดูดซับออกจากเรซิน โดยใช้ solvent สารแบคทีเรียไอซอินที่ได้จะมีความบริสุทธิ์บางส่วนและมีความเข้มข้นสูงขึ้นแตกต่างกัน เช่น Jumriagrit (2004) ใช้ Amberlite XAD-16 ในการดูดซับแบคทีเรียไอซอินที่ผลิตโดย *Lactobacillus plantarum* PMU33 และทำการชะสารแบคทีเรียไอซอินออกด้วย 70% 2-propanol พบว่าค่ากิจกรรมของแบคทีเรียไอซอินเพิ่มขึ้น 2 เท่า จาก 3,200 AU/ml เป็น 6,400 AU/ml เช่นเดียวกับ Pilasombut (2006) ทำการดูดซับแบคทีเรียไอซอินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus salivarius* K4 ด้วย Amberlite XAD-16 และชะสารออกด้วย 70% isopropanol ที่ผสม 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA) พบว่าค่ากิจกรรมของแบคทีเรียไอซอินเพิ่มขึ้น 4 เท่า โดยเพิ่มขึ้นจาก 3,200 AU/ml เป็น 12,800 AU/ml

## 6. คุณสมบัติของสารแบคทีเรียไอซอิน

แบคทีเรียไอซอินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีคุณสมบัติที่สำคัญดังนี้

### 6.1 ความเสถียรต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน

แบคทีเรียไอซอินสามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ เนื่องจากแบคทีเรียไอซอินเป็นสารประเภท proteinaceous substances ซึ่งได้มีรายงานวิจัยของ Bennik *et al.* (1997) พบว่าสาร pediocin PA-1 ที่สร้างจาก *Pediococcus parvulus* จะสูญเสียประสิทธิภาพไปเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin, pepsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, papain, protease IX และ proteinase K เช่นเดียวกับ Anastasiadou

(2008b) ที่พบว่า pediocin SM-1 ซึ่งสร้างจาก *P. pentosaceus* Mees 1934 จะสูญเสียสภาพเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin, papain, trypsin, proteinase K และ  $\alpha$ -chymotrypsin แต่แบคทีเรียโอซินบางชนิดอาจไม่สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้หมด เพราะภายในโมเลกุลของแบคทีเรียโอซินนอกจากจะมีองค์ประกอบของโปรตีนแล้วยังพบองค์ประกอบของสารประเภทคาร์โบไฮเดรต ไขมัน หรือ ฟอสฟอรัส ซึ่งแบคทีเรียโอซินเหล่านี้จะถูกย่อยสลายได้โดย glycolytic ( $\alpha$ -amylase) lipolytic (lipase) และ phospholipolytic (phospholipase) เช่น bacteriocin 466 ที่สร้างเชื้อ *Lactobacillus fermenti* 466 มีลักษณะเป็น lipocarbohydrate protein complex และค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินถูกทำลายหมดเมื่อนำมาทดสอบกับเอนไซม์ trypsin แต่ค่ากิจกรรมการยับยั้งถูกทำลายลดลงเหลือเพียงครึ่งหนึ่งของค่ากิจกรรมทั้งหมด เมื่อนำมาทดสอบเอนไซม์ pepsin (De Klerk and Smit, 1967) ส่วนแบคทีเรียโอซินที่มีองค์ประกอบเป็น glycoprotein เช่น leuconocin S ที่สร้างจากเชื้อ *Leuconostoc paramesenteroides* พบว่าสามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์  $\alpha$ -amylase, trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, protease และ proteinase K (Lewus *et al.*, 1992)

จากคุณสมบัติของแบคทีเรียโอซินในการถูกทำลายด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม proteolytic หรือเอนไซม์จากระบบทางเดินอาหารหรือเอนไซม์จากตับ อาจนำแบคทีเรียโอซินมาประยุกต์เป็นสารถนอมอาหารชีวภาพในอาหารสำหรับมนุษย์หรือสัตว์ ซึ่งแบคทีเรียโอซินจะไม่ส่งผลกระทบต่อเชื้อประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของผู้บริโภค

## 6.2 ความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง

ค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินมักจะลดลง เมื่อมีการเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยส่วนใหญ่แบคทีเรียโอซินและ bacteriocin-like substances มักเสถียรในสภาวะที่ค่าพีเอช เป็นกรดและกลาง เช่น pediocin 05-10 ที่สร้างจากเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* 05-10 มีความเสถียรที่ pH 2-8 และค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินจะลดลงที่ pH 10-12 (Huang *et al.*, 2009) เช่นเดียวกับ Mandal *et al.* (2008) พบว่า สารแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดย *P. acidilactici* LAB 5 มีความเสถียรที่ pH 2-8 นอกจากนี้สารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Pediococcus* หลายสายพันธุ์ไม่มีความเสถียรที่สภาวะต่าง เช่น pediocin N5p, pediocin PA-1, pediocin ST-18, pediocin NV 5 และ pediocin K23-2 (Strasser de Saad *et al.*, 1995; Bennik *et al.*, 1997; Todorov and Dicks, 2005; Mandal *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2008) แต่มีงานวิจัยของ Albano *et al.* (2007) พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *P. acidilactici* HA-6111-2 และ *P. acidilactici* HA-5692-3 มีความเสถียรที่สุดที่ pH 6 และความเสถียรจะลดลงที่ pH สูงหรือต่ำกว่า 6

### 6.3 ความเสถียรต่อความร้อน

การทนความร้อนเป็นคุณสมบัติหลักของแบคทีเรียโอซิน ซึ่งแบคทีเรียโอซินแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการทนความร้อนที่อุณหภูมิแตกต่างกันไป โดยแบคทีเรียโอซินที่สามารถทนความร้อนได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 60 ถึง 100 องศาเซลเซียส มากกว่า 30 นาที เช่น lactocin S, lactocin 27, carnobacteriocin A และ B เป็นต้น ส่วนแบคทีเรียโอซินที่สามารถ ทนความร้อนได้ถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-60 นาที เช่น pediocin PD-1 ที่ผลิตจากเชื้อ *P. damnosus* NCFB 1832 (Green *et al.*, 1997) pediocin F ที่ผลิตจากเชื้อ *P. acidilactici* F (Osmanagaoglu *et al.*, 1998) pediocin ST-18 ที่ผลิตจากเชื้อ *P. pentosaceus* ST-18 (Todorov and Dicks, 2005) pediocin SA-1 สร้างจากเชื้อ *P. acidilactici* NRRL B5627 (Anastasiadou *et al.*, 2008a) pediocin SM-1 สร้างจากเชื้อ *P. pentosaceus* Mees 1934 (Anastasiadou *et al.*, 2008b) pediocin 05-10 ที่สร้างจากเชื้อ *P. pentosaceus* 05-10 (Huang *et al.*, 2009) ความสามารถในการทนความร้อนของแบคทีเรียโอซินแต่ละชนิดอาจขึ้นอยู่กับโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นก้อนกลม (small globular) ของแบคทีเรียโอซินและการเกิด strongly hydrophobic regions เช่น lactacin F, lactococin A และ nisin เป็นต้น หรือ การเกิด stable cross-linkages เช่น nisin, lactocin 481, lactocin S หรือแบคทีเรียโอซินบางชนิดประกอบด้วย glycine ในปริมาณมาก เช่น diplococin, lactacin F, lactacin 27 และ lactacin A เป็นต้น (De Vuyst and Vandamme, 1994)

## 7. ผักและผลไม้สด (Fresh Vegetables and Fruits)

โดยทั่วไปผักและผลไม้สดทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว อาจพบจุลินทรีย์ปนเปื้อนหลากหลายชนิดทั้ง แบคทีเรีย รา ยีสต์ ไวรัส และโปรโตซัว โดยจุลินทรีย์เหล่านี้อาจปนเปื้อนมาตั้งแต่แปลงเพาะปลูก ระหว่างการเก็บเกี่ยว หลังการเก็บเกี่ยว ระหว่างการขนส่ง และระหว่างการเก็บรักษา โดยแหล่งปนเปื้อนที่สำคัญอาจมาจากดิน นุ้ยหมัก น้ำที่ไฉ่รด ลังแควดล้อม อุปกรณ์และเครื่องมือ ภาชนะบรรจุ รถขนส่ง และคนงานที่สัมผัสกับผักและผลไม้สด ซึ่งปริมาณการปนเปื้อนจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับ การจัดการในระหว่างการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การเก็บรักษา ชนิดและลักษณะทางกายภาพของผักและผลไม้สด ซึ่งจุลินทรีย์ปนเปื้อนเหล่านี้จะส่งผลกระทบต่อคุณภาพของผักและผลไม้ รวมไปถึงอายุการเก็บรักษาด้วย (Brckett, 1999) โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าจุลินทรีย์ปนเปื้อนเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ผู้บริโภคจะมีความเสี่ยงจากอาหารเป็นพิษได้

## 7.1 ผักสดพร้อมบริโภค

ปัจจุบันความต้องการบริโภคผักสดพร้อมบริโภค (ready to eat salad) ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากผู้บริโภคให้ความสำคัญและใส่ใจในการเลือกรับประทานอาหารที่ดีต่อสุขภาพ อีกทั้งสะดวกในการเลือกซื้อ และสามารถบริโภคได้เลยโดยไม่ต้องผ่านการเตรียมเหมือนอาหารสดประเภทอื่น ผักสดเหล่านี้จะผ่านกระบวนการแปรรูปน้อยมาก (minimally processes) ส่วนใหญ่จะเป็นเพียงการล้างและตัดแต่ง แล้วนำไปวางขายที่อุณหภูมิผู้เย็นเท่านั้น โดยไม่ผ่านกระบวนการแปรรูปใดๆอีก

## 7.2 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผักสด

### 7.2.1 จุลินทรีย์ก่อโรค

ผักสดหลายชนิดสามารถตรวจพบจุลินทรีย์ก่อโรคได้และอาจพบจุลินทรีย์ก่อโรคต่างสายพันธุ์กัน ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 จุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในตัวอย่างผักสดประเภทต่าง ๆ

Vegetable	Pathogen	Vegetable	Pathogen
Alfalfa sprouts	<i>Aeromonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Green onion	<i>Salmonella</i>
Alfalfa seeds	<i>Salmonella</i>	Leafy vegetables	<i>Campylobacter</i>
Artichoke	<i>Salmonella</i>	Lettuce	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Aeromonas</i>
Asparagus	<i>Aeromonas</i>	Mungbean sprouts	<i>Salmonella</i>
Bean sprouts	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i>	Mushrooms	<i>C. jejuni</i>
Beet leaves	<i>Salmonella</i>	Mustard cress	<i>Salmonella</i>
Broccoli	<i>Aeromonas</i>	Mustard sprout	<i>B. cereus</i>
Cabbage	<i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> 0157:H7, <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i>	Parsley	<i>Campylobacter</i> , <i>Shigella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Salmonella</i>
Carrots	<i>Staphylococcus</i>	Pepper	<i>Campylobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Salmonella</i>
Cauliflower	<i>Salmonella</i>	Potatoes	<i>L. monocytogenes</i>
Celery	<i>Aeromonas</i> , <i>E. coli</i> 0157:H7	Prepacked salads	<i>Campylobacter</i> , <i>L. monocytogenes</i>
Chili	<i>Salmonella</i>	Radish	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus</i>
Cilantro	<i>Salmonella</i>	Salad greens	<i>Salmonella</i> , <i>S. aureus</i>
Coriander	<i>E. coli</i> 0157:H7,	Salad vegetables	<i>Shigella</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Y. enterocolitica</i>
Cress sprout	<i>E. coli</i> 0157:H7,	Seed sprouts	<i>Staphylococcus</i>
Cucumber	<i>B. cereus</i> , <i>L. monocytogenes</i>	Soybean sprouts	<i>B. cereus</i>
Egg plant	<i>L. monocytogenes</i>	Spinach	<i>Campylobacter</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Aeromonas</i>
Endive	<i>Salmonella</i>	Sprouting seeds	<i>B. cereus</i>
Fennel	<i>Salmonella</i>	Tomato	<i>L. monocytogenes</i>

ที่มา: Adapted from Beuchat (2002)

### 7.2.2 จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย

ตามปกติผักพร้อมบริโภคจะมีอายุการเก็บประมาณ 7-14 วัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของผัก (Garcia-Gimeno and Zurera-Cosano, 1991) แบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียที่พบบ่อยในผักและผลไม้พร้อมบริโภคที่มีการเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำได้แก่ *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia* spp. และ *Leuconostoc mesenteroides*

ในกระบวนการแปรรูปผักผลไม้มีการใช้กรดในการตัดแต่งผัก ทำให้เนื้อเยื่อผักเกิดบาดแผล จึงทำให้จุลินทรีย์สามารถเข้าไปใช้สารอาหารในเนื้อเยื่อผักในการเจริญเติบโตได้ (King *et al.*, 1991; Zagory, 1999) จุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ pectinolytic ย่อยสลายเซลล์พืช และดูดซึมสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโต แบคทีเรียแกรมลบที่ผลิตเอนไซม์ pectinolytic คือ *Erwinia* spp. และ *Pseudomonas* spp. เอนไซม์ pectinolytic ที่แบคทีเรียผลิตได้แก่ pectin lyases, pectate lyase, polygalacturonase และ pectin methyl esterases ส่วนแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Leuconostoc mesenteroides* ก็สามารถสร้างเอนไซม์ pectinolytic ได้ (Juven *et al.*, 1985) ผลจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทำให้เกิดอาการ soft-rot, spots หรืออาการอื่น ๆ ที่สามารถมองเห็นได้ (Ragaert *et al.*, 2007) นอกจากนี้การเก็บรักษาโดยใช้อุณหภูมิต่ำยังส่งผลให้ psychrotrophic microorganisms เจริญเติบโตได้ดี (Zagory, 1999)

### 7.2.3 แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถพบได้ในผักและผลไม้เช่นกัน เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้พบได้ทั่วไปในสภาพแวดล้อมธรรมชาติ แม้ว่าบทบาทของเชื้อจะไม่เด่นชัดว่าทำให้ผักหรือผลไม้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านกายภาพอย่างไร ต่างจากแบคทีเรียกลุ่มที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย ซึ่งมักจะทำให้ผักหรือผลไม้เกิดการเน่าและได้ ทำให้อายุการเก็บสั้นลง

ในอาหารประเภทที่ผ่านกระบวนการน้อยๆ แบคทีเรียกรดแลคติกมักอาศัยอยู่บริเวณพื้นผิวของผัก โดยพบบริเวณใบมากกว่าบริเวณดอกหรือกึ่ง ในพืชประเภทหัว เช่น กระหล่ำปลี พบแบคทีเรียกรดแลคติกบริเวณใบชั้นในมากกว่าบริเวณใบชั้นนอก (Maxcy, 1978) ปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในผักอยู่ในช่วง 10-1000 เซลล์ต่อกรัม หรือคิดเป็น 0.01-1.0 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ปริมาณเชื้อจะเพิ่มมากขึ้นตามอายุของพืชที่เชื้ออาศัยอยู่ Beck (1978) พบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสูงถึง  $10^7$  CFU/g ในข้าวโพดที่โตเต็มที่ ส่วนในผักสด

Heard (1999) รายงานว่าพบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกปริมาณ  $10^2$  CFU/g ใน chicory ที่ผ่านการตัดแต่งและปริมาณ  $10^8$  CFU/g ในผักสลัดรวม โดยปริมาณเชื้อที่พบในผักขึ้นอยู่กับ ฤดูเก็บเกี่ยว ภูมิประเทศ ปริมาณแสงอัลตราไวโอเล็ต อุณหภูมิ และสารอาหาร ซึ่งชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบมากในผักมีดังนี้ *L. brevis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. arabinosus*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. mesenteriodes*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecalis* var. *liquefaciens*, *E. faecium*, *L. lactis* (Daeschel et al., 1987) โดยสายพันธุ์ *Leuconostoc* spp. พบมากที่สุด คิดเป็น 80% ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด ซึ่งก่อให้เกิดการเน่าเสียของผักโดยการสร้างเอนไซม์ pectic มาย่อยเนื้อเยื่อของพืช ทำให้เกิดอาการเน่าและในพืช (Lund, 1992)

แบคทีเรียกรดแลคติกนอกจากจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผักสด บางชนิดอาจช่วยยับยั้งจุลินทรีย์อื่น Visser et al. (1986) รายงานว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากพืชสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ได้ กล่าวคือเมื่อทำการฉีดพ่นเชื้อ *P. syringae* Ps2 ลงบนต้นถั่วพบว่าต้นถั่วมีอาการของโรค halo blight เกิดขึ้นและเมื่อทำการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ลงไปพบว่าอาการของโรค halo blight หายไปต้นถั่วไม่มีอาการดีขึ้น แสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *P. syringae* ได้

### 7.3 โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากการบริโภคผักและผลไม้

ระบาดวิทยาของโรคที่เกิดจากการรับประทานผักและผลไม้สด มีมากขึ้นในช่วง 2-3 ปีมานี้ โดยเชื่อก่อนโรคที่ปนเปื้อนในผักที่สำคัญ คือ *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. เชื้อเหล่านี้พบได้ในธรรมชาติ อุจจาระมนุษย์และมูลสัตว์ การปนเปื้อนของเชื้อเกิดในระหว่างกระบวนการเพาะปลูก ระหว่างที่มีการเก็บเกี่ยว กระบวนการผลิต การขนส่ง หรือระหว่างที่มีการปรุงอาหาร รวมทั้งจาก นกและแมลงที่เป็นพาหะ

### 7.3.1 *Listeria monocytogenes*

#### 1) อนุกรมวิธานของ *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* มีรูปร่างท่อน ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ในที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) ผลิตเอนไซม์อะตอเรส เคลื่อนที่โดยมีแส้รอบตัว (peritrichous flagella) (สุมนธา, 2549) สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิกว้าง ตั้งแต่ต่ำกว่า 1 ถึง 50 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 30 และ 37 องศาเซลเซียส แบคทีเรียชนิดนี้สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะแช่แข็ง แต่จะถูกทำลายที่อุณหภูมิระดับพาสเจอร์ไรส์ ที่อุณหภูมิมากกว่า 61.5 องศาเซลเซียส เชลล์สามารถเจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 4.0-9.5 ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10 และค่าวอเตอร์แอกติวิตี (water activity,  $A_w$ ) ต่ำสุดที่เจริญได้ในช่วง 0.9-0.97 (Robinson *et al.*, 2000; Marriott, 1997) อยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น สภาวะที่เย็น สภาวะที่เป็นกรด หรือสภาวะที่มีเกลือ *L. monocytogenes* ทำให้เกิดโรคลิสเทอริโอซิส (Listeriosis) ในคน โดยมีผลร้ายแรงต่อสตรีที่ตั้งครรภ์ อาการของโรคจะมีลักษณะเหมือนไข้หวัด เป็นไข้ ปวดหัว ทำให้เกิดอาการแพ้ของตัวอ่อน ทารกตายหรือคลอดก่อนกำหนด หรือเชื้อหุ้มสมองอักเสบในเด็กทารก เพิ่งคลอดหรือในผู้ใหญ่ (Rocourt and Cossart, 1997) ทารกที่เพิ่งเกิดและมีการติดเชื้อจากโรคลิสเทอริโอซิสมีโอกาสเสียชีวิตประมาณร้อยละ 30 และ ทารกที่ติดเชื้อใน 4 วันแรกหลังการเกิดเสียชีวิตได้ประมาณร้อยละ 50 (Marriott, 1997) ผู้ใหญ่ที่ไม่ได้ตั้งครรถ์นอกเหนือจากมีอาการโรคของระบบประสาทและเชื้อหุ้มสมองอักเสบ ยังเกิดโรคโลหิตเป็นพิษและสมองอุดตัน เป็นฝีเป็นหนอง (Rocourt and Cossart, 1997)

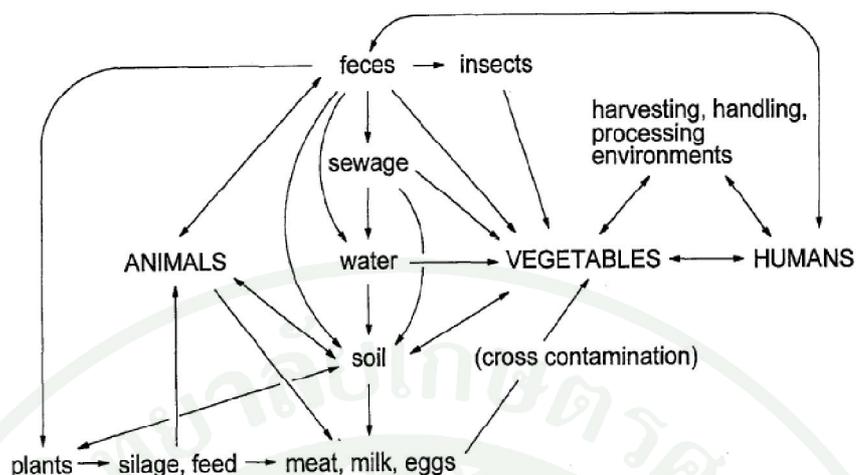
#### 2) สมบัติในการก่อโรคของ *L. monocytogenes*

การทดสอบทางเซรั่มวิทยา (Serology) สามารถจำแนกเชื้อออกเป็น 7 สปีชีส์ โดย *L. monocytogenes* เป็นสปีชีส์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ แม้ว่าเชื้อ *Listeria* สปีชีส์อื่น ได้แก่ *L. seeligeri*, *L. welshimeri* และ *L. ivanovii* จะเคยพบว่าเกี่ยวข้องกับโรค listeriosis ด้วย แต่มีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อยกว่า *L. monocytogenes* (สุมนธา, 2549) ในระหว่าง *Listeria* 7 สายพันธุ์ *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่มีความสำคัญต่อมนุษย์มากที่สุด ปัจจัยก่อโรคที่สำคัญของ *L. monocytogenes* คือ ลิสเทอริโอไลซินโอ (listeriolysin O, LLO) LLO มีน้ำหนักโมเลกุล 60,000 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 504 ชนิด ส่วนใหญ่จะถูกผลิตขึ้นในระหว่างการเจริญช่วงเอกซ์โปเนนเชียล โดย LLO จะมีระดับสูงสุดหลังจากเชลล์เจริญได้ 8-10 ชั่วโมง LLO เป็นสารที่ทำให้

ให้เกิด  $\beta$ -hemolysis ในเม็ดเลือดแดง และทำลายเซลล์ฟาโกไซติก (phagocytic cells) ที่กินเซลล์ *L. monocytogenes* เข้าไป (Jay, 1992) เมื่อบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* เข้าสู่ร่างกาย เซลล์ *L. monocytogenes* จะผ่านเข้าไปทางลำไส้เล็ก แล้วมีการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยกลไกที่ยังไม่ทราบแน่ชัด จากนั้นเซลล์จะบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย เช่น รกของสตรีมีครรภ์ และเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งกระแสเลือดจะนำพาเซลล์ *L. monocytogenes* แทรกเข้าไปในเซลล์ต่างๆ ของร่างกายแล้วทำการขยายจำนวนในเซลล์ของร่างกาย ต่อมาเซลล์ *L. monocytogenes* จะถูก phagocytic cells เช่น macrophage กินเข้าไป แต่เนื่องจาก *L. monocytogenes* สามารถอยู่รอดและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ใน phagocytic cells ดังนั้น *L. monocytogenes* จะทำลาย macrophage ทำให้เซลล์ของ *L. monocytogenes* ถูกปลดปล่อยออกมาในไซโตพลาสซึม จากนั้นเซลล์ของ *L. monocytogenes* จะถูกล้อมรอบด้วยแอกติน (actin) และมีการสร้างแอฟแอกติน (F-actin) ซึ่งทำให้ *L. monocytogenes* สามารถเคลื่อนไหวและแพร่กระจายไปยัง macrophage ที่อยู่ใกล้เคียงได้ การที่ macrophage ถูกย่อยเป็นผลเนื่องมาจาก LLO ที่ *L. monocytogenes* ผลิตออกมา เนื่องจาก LLO สามารถจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีคอเลสเตอรอลและสร้างโมโนเมอร์ที่เป็นพิษ จึงทำให้เกิดการรั่วของเซลล์และทำให้เซลล์ตาย (Jay, 1992)

### 7.3.2 การปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* ในผักและผลไม้

*L. monocytogenes* พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น น้ำ ดิน สามารถปนเปื้อนมาในผักสดผ่านทาง น้ำทิ้ง ซากสัตว์ มูลสัตว์ แมลง และนก รวมทั้งอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะปลูก เป็นต้น นอกจากนี้คนก็สามารถเป็นแหล่งแพร่เชื้อได้ วงจรการปนเปื้อนของเชื้อนี้ในผักดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 วงจรการปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในผักสด

ที่มา: Beuchat (1996)

การปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในผักส่วนใหญ่มักพบการปนเปื้อนในผักที่มีการสัมผัสกับพื้นดินที่ใช้ในการเพาะปลูก โดยมีรายงานว่ามันฝรั่งและผักกาดหัวพบการปนเปื้อนของเชื้อมากที่สุด (Heisick *et al.*, 1989; Farber *et al.*, 1989)

สำหรับประเทศไทยได้มีรายงานการศึกษาของ อติสรและปรีชา (2538) ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp. และ *Listeria* spp. ในผักสดพร้อมบริโภคและในอาหารพื้นเมืองของไทย เช่น กระหล่ำปลี ผักกาดหอม ใบสาระแน และใบแมงลัก พบเชื้อ *Listeria* spp. จากตัวอย่างผัก 3 ตัวอย่าง คือ กระหล่ำปลี สาระแน ผักชี และเมื่อทำการจัดจำแนกชนิดของเชื้อ พบว่าเป็น *Listeria innocua* แม้ว่า *L. innocua* เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค แต่การตรวจพบเชื้อดังกล่าวในอาหาร มักบ่งชี้ถึงความเสี่ยงต่อการพบเชื้อ *L. monocytogenes* ในอาหาร เนื่องจากแหล่งปนเปื้อนของ *L. innocua* และ *L. monocytogenes* มักพบในแหล่งเดียวกัน Little *et al.* (1997) ทำการสำรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria* spp. ในผักพร้อมบริโภคจำนวน 2,276 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* ในผักจำนวน 77 ตัวอย่าง ปริมาณเชื้อที่พบคือ  $10-10^3$  CFU/g นอกจากนี้ Sagoo *et al.* (2001) ได้ทำการศึกษาปริมาณของเชื้อ *Listeria* spp. ที่ปนเปื้อนในผักจำนวน 3,200 ตัวอย่าง จำนวน 21 ชนิด จาก 22 ประเทศ พบว่าผักจำนวน 6 ตัวอย่างมีการปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria* spp. ในปริมาณ 20 ถึง  $< 10^4$  CFU/g โดยพบเชื้อ *L. innocua* จาก watercress และเชื้อ *L. seeligeri* จากผักกาดหัว และยังพบ *L. monocytogenes* ในผักสดพร้อมบริโภค (Sagoo *et al.*,

2003) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Thunberg *et al.* (2002) ได้สำรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria* spp. ในผักจำนวน 127 ตัวอย่าง พบว่าผัก 25 ตัวอย่างคิดเป็น 19.7% พบเชื้อ *Listeria* spp. โดยมันฝรั่ง และ field cress จำนวน 6 ตัวอย่างพบการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes*

### 7.3.3 ระบาดวิทยาของ *L. monocytogenes*

การระบาดของโรค listeriosis ที่เกิดจากการรับประทานผักได้มีรายงานการศึกษาครั้งแรกโดย Blenden and Szatalowicz (1967) จากข้อมูลในระหว่างปี 1933-1966 พบว่ามีผู้ป่วยถึง 731 ราย สาเหตุของโรคเกิดจากการรับประทานผักดิบหรือกระหล่ำปลี ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ต่อมา Ho *et al.* (1986) ศึกษาการระบาดของโรคในปี 1979 พบว่ามีผู้ป่วย 23 ราย สาเหตุเกิดจากการรับประทานเซอรารี มะเขือเทศ และกระหล่ำปลี ที่เป็นส่วนประกอบในสลัดทูน่าที่ผู้ป่วยรับประทาน และในปี 1980-1981 มีรายงานการระบาดของโรค listeriosis ในประเทศแคนาดา มีผู้ป่วย 41 ราย เสียชีวิต 18 ราย เป็นผู้ใหญ่อายุ 2 ราย เด็กทารก 16 ราย สาเหตุเกิดจากการรับประทาน coleslaw ที่มีส่วนประกอบของกระหล่ำปลีและแครอท ที่นำมาประกอบอาหารและมีการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* จากมูลแกะ ซึ่งเมื่อนำอาหารมาแช่ไว้ที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลานานจะช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อที่อยู่ในผักได้ดี ทำให้เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนและก่อโรคได้ในที่สุด (Bell and Kyriakides, 2005)

ในประเทศไทยได้มีรายงานการพบผู้ป่วยจากโรค listeriosis โดย Rusemeechan (1994) พบผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *L. monocytogenes* จำนวน 2 ราย เป็นเพศชาย ประกอบอาชีพเกษตรกร มีอาการติดเชื้อในกระแสเลือด พบเชื้อหุ้มสมองอักเสบ และเสียชีวิตเนื่องจากระบบหายใจล้มเหลว

## 8. การควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผักและผลไม้สด

ปัจจุบันความต้องการบริโภคผักประเภทพร้อมบริโภค ได้รับความนิยมนิยมเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ อย่างไรก็ตามมีรายงานระบาดวิทยาของอาหารเป็นพิษที่เกิดจากผักพร้อมบริโภคมากขึ้นตามไปด้วย ดังนั้นจำเป็นต้องมีวิธีการจัดการวัตถุดิบ เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งที่ทำให้เน่าเสียและก่อให้เกิดโรค

แม้ว่า การป้องกันการปนเปื้อนตั้งแต่เริ่มแรกของกระบวนการผลิตจะเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการลดจำนวนจุลินทรีย์ แต่วิธีการนี้อาจไม่เพียงพอ จำเป็นต้องมีการล้างและการสุกของแหล่งผลิตอย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การกำจัดเชื้อปนเปื้อนในผัก สามารถทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่

นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ได้แก่ การใช้สารเคมีฆ่าเชื้อ (chemical sanitizer) ประเภท sodium hypochlorite solution (150 ppm), chlorine dioxide, hydrogen peroxide, organic acid เป็นต้น ซึ่งประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อขึ้นกับลักษณะทางกายภาพของผัก ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อและความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ (Parish *et al.*, 2003)

การควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผักและผลไม้อาจทำได้หลายวิธีทั้งทางกายภาพ เคมีและชีวภาพ (Parish *et al.*, 2003) ดังแสดงในตารางที่ 7 อย่างไรก็ตามแต่ละวิธีมีข้อจำกัด เช่นการใช้วิธีทางกายภาพ อาจมีผลกระทบต่อลักษณะทางกายภาพของผักสด อาจทำให้เกิดการชำรุดเสียหายและอายุการเก็บสั้น ส่วนวิธีทางเคมี อาจมีผลกระทบจากปัญหาสารตกค้าง ถ้าใช้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม ส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค ส่วนวิธีทางชีวภาพปัจจุบันได้รับความสนใจมากขึ้น และน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ทดแทนวิธีทางเคมีได้

## ตารางที่ 7 วิธีการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ในผักสด

Mitigation Method	Advantages	Limitations	Comments on current use	Comments on research
Hypochlorite	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Long history of use</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Potential adverse health effects of chlorinated by-products</li> <li>• Corrosive to equipment</li> <li>• Sensitive to temperature, light, air, metals and organic materials</li> <li>• pH dependent</li> <li>• Some resistance by bacterial spores and protozoan oocysts</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Commonly used in the 50 to 200 ppm range with a 1 to 2 min contact time.</li> <li>• Usefulness on many produce commodities has been investigated</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Very high concentrations may not eliminate pathogens on produce</li> <li>• Commonly used concentrations produce a maximum 1 to 2 log reduction on many commodities.</li> </ul>
Acidified sodium chlorite	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Greater efficacy than hypochlorite due to low pH</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Little information on production of chlorinated by-products</li> <li>• Limited amount of research conducted</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Studied for use on meats, seafood, poultry, produce</li> <li>• 500 to 1200 ppm range studied</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Usefulness for produce needs further research</li> </ul>
Chlorine dioxide	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Less reactivity than hypochlorite with organics</li> <li>• Fewer chlorinated by-products</li> <li>• Better antimicrobial activity at neutral pH than hypochlorites</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stability</li> <li>• Not permitted for cut produce</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Up to 5 ppm allowed on whole fruits and vegetables</li> <li>• 1 ppm maximum allowed on peeled potatoes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Studied concentrations range from about 1 ppm to 500 ppm on commodities such as alfalfa seeds and sprouts, cucumbers, shredded lettuce, cabbage, oranges</li> <li>• Studies conducted with fungal spores, native microflora, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>E. coli</i>, <i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i>, <i>Cryptosporidium parvum</i> oocysts.</li> <li>• Reductions of a few logs reported</li> <li>• More effective against <i>E. coli</i>, <i>Salmonella Typhosa</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> than against <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.</li> <li>• Not as effective as hypochlorite against <i>Bacillus cereus</i> spores</li> <li>• May have significant sporocidal capacity</li> <li>• Possible usefulness on some whole produce deserves investigation</li> </ul>
Bromine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Possible synergy with chlorine compounds</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Information lacking on production of brominated by-products and their potential health effects</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Not widely used as a sanitizer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• More effective against <i>E. coli</i>, <i>Salmonella Typhosa</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> than against <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.</li> <li>• Not as effective as hypochlorite against <i>Bacillus cereus</i> spores</li> </ul>
Iodine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Less corrosive than chlorine at low temperature</li> <li>• Broad spectrum</li> <li>• Iodophor less volatile than iodine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stains commodities and equipment</li> <li>• Corrosive above 50 °C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Commonly used on food contact surfaces and equipment</li> <li>• No direct contact use on produce</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• May have significant sporocidal capacity</li> <li>• Possible usefulness on some whole produce deserves investigation</li> </ul>
Trisodium phosphate	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Less corrosive than most other compounds</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Listeria</i> relatively resistant</li> <li>• Has very high pH (11-12)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Occasional use on fresh-market citrus</li> <li>• Authorized for use on raw poultry</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentrations between 1 and 15% yielded reductions in pathogen populations from 0 to 6 logs</li> <li>• As effective as chlorine at reducing populations of <i>Xanthomonas campestris</i> pathovar <i>vesicatoria</i>.</li> <li>• Reduced native orange-surface microflora 95% compared to 60% reduction on control fruit.</li> </ul>
Quaternary ammonium compounds	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Colorless, odorless</li> <li>• Stable at high temperature</li> <li>• Noncorrosive</li> <li>• Good penetrating ability</li> <li>• Relatively stable to organic compounds</li> <li>• Leaves residual</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limited usefulness at low pH (&lt;6)</li> <li>• Not compatible with soaps or anionic detergents</li> <li>• Costly</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Commonly used on food contact surfaces and equipment</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• As effective as chlorine at reducing populations of <i>Xanthomonas campestris</i> pathovar <i>vesicatoria</i>.</li> <li>• Reduced native orange-surface microflora 95% compared to 60% reduction on control fruit.</li> </ul>
Acids	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Economical, depending upon type of acid and use</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Low pH use only</li> <li>• Antimicrobial effect dependent upon type of acid and strain of microorganism</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acidification to preserve foods commonly used</li> <li>• Acid sprays on meat carcasses commercially used</li> <li>• Phosphoric acid/anionic compounds commonly used on citrus at about 200 ppm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lemon juice and vinegar may be useful for limited household sanitation of produce.</li> <li>• Organic acids studied for use on several produce commodities for control of native populations as well as specific pathogens (<i>Salmonella spp.</i>, <i>Campylobacter spp.</i>, <i>Yersinia spp.</i>, <i>Shigella spp.</i>, <i>Listeria spp.</i>)</li> <li>• Peracetic acid concentrations up to 200 ppm effectively used on whole and cut produce.</li> </ul>

(continued on next page)

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Mitigation Method	Advantages	Limitations	Comments on current use	Comments on research
Hydrogen peroxide	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sporicidal</li> <li>• Rapid breakdown to nontoxic products</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Possible effects on product color (browning or bleaching)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limited industry use on food contact surfaces and packaging.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vapor and aqueous dips (1 to 5% range) studied on numerous produce commodities.</li> <li>• Variable effectiveness reported by researchers.</li> </ul>
Ozone	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Effective at low concentrations and short contact time</li> <li>• Broad spectrum</li> <li>• Good penetration ability</li> <li>• Effectiveness against protozoa reported</li> <li>• Decomposes to nontoxic products</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Physiological injury of produce possible</li> <li>• Corrosive to equipment</li> <li>• Deterioration of produce flavor and color possible</li> <li>• Unstable; very highly reactive</li> <li>• Possible human toxic effects in processing facilities</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Commonly used for water treatment</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Effective against a variety of postharvest pathogens reported on fruits and vegetables</li> <li>• Reduced <i>Salmonella</i> and <i>E. coli</i> populations on ground black pepper 3 to 4 log/g.</li> <li>• Further research on produce is warranted</li> </ul>
Irradiation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No chemical treatment</li> <li>• Can be conducted after packaging</li> <li>• Shelf life extension of produce observed</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Image of irradiation by consumers</li> <li>• Negative sensory effects possible</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 to 10 kGy used to reduce pathogens in/on foods</li> <li>• &lt;1 kGy used to inhibit sprouting of tubers, bulbs, roots and to eliminate insects from produce</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Variable effectiveness against postharvest pathogens reported in literature</li> <li>• Little information exists regarding effectiveness against human pathogens in produce</li> </ul>
Biocontrol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No chemical treatments</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limited spectrum</li> <li>• Possible public reaction to consumption of live microorganisms</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Used on apples for control of postharvest plant pathogens</li> <li>• Competitive exclusion useful in poultry to prevent intestinal colonization by pathogens</li> <li>• Starter cultures used for fermented meat and dairy products</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limited research on use of biocontrol measures against human pathogens on produce</li> </ul>

ที่มา: Parish *et al.* (2003)

## 8.1 การใช้ชีววิธีในการควบคุมจุลินทรีย์ปนเปื้อนในผักสด

ปัญหาการเน่าเสียและการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในอาหารยังคงเป็นปัญหาสำคัญในระบบอุตสาหกรรมการผลิตอาหารทั่วโลก ซึ่งส่งผลให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจและเกิดปัญหาทางด้านสุขภาพต่อผู้บริโภค ผู้ผลิตจึงนำสารนอมอาหารมาใช้ในระบบการผลิต แต่ปัจจุบันกระแสความต้องการอาหารที่ผ่านกระบวนการน้อยๆ และปราศจากการปนเปื้อนของสารเคมีได้เป็นประเด็นสำคัญในการเลือกซื้อของผู้บริโภค ผู้ผลิตจึงหันมาให้ความสำคัญกับสารนอมอาหารประเภทชีวภาพมากขึ้น จึงมีการนำแบคทีเรียกรดแลคติกหรือสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกมาใช้เป็นสารนอมอาหารชีวภาพ (biopreservative) เพื่อเพิ่มความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค

การนอมอาหารโดยวิธีชีวภาพ (biopreservative) หมายถึง การยืดอายุการเก็บหรือการส่งเสริมความปลอดภัยของอาหารโดยใช้จุลินทรีย์ธรรมชาติ หรือสารที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์หลักที่มีศักยภาพในการนำมาเป็นสารนอมอาหารชีวภาพเนื่องจากมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและเป็นแบคทีเรียที่พบได้ในอาหารทั่วไป (Stiles, 1996)

การนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาประยุกต์ในการนอมอาหารและใช้ในอาหารมีมากกว่าพันปี เช่น การนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาใช้ในการผลิตโยเกิร์ตและเนื้อหมักประมาณ 1500 ปีก่อนคริสตศักราช และนำมาใช้ในผักหมักเป็นเวลา 300 ปีก่อนคริสตศักราช ช่วยยืดอายุของอาหารและการสร้างกลิ่นรสที่ดี (De Vuyst and Vandamme, 1994) ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถนอมอาหารได้โดยการแข่งขันการเจริญเติบโต (competitive growth) กับแบคทีเรียชนิดอื่น หรือการสร้างสารที่มาจากเมแทบอลิซึมรวมทั้งแบคทีเรียโอซิน (Stiles, 1996) ปัจจุบันได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการนำแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียโอซินมาประยุกต์ในอาหารมากมาย โดย Bennik *et al.* (1999) พบว่า mundticin ที่สร้างโดย *E. mundtii* สามารถลดจำนวนเชื้อ *L. monocytogenes* ที่ปนเปื้อนใน mungbean sprout เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ได้ 3.2-3.5 LogCFU/ml ภายในเวลา 3 วัน แสดงว่า mundticin มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้เป็นสารนอมอาหารชีวภาพใน mungbean sprouts โดยสามารถนำมาใช้ในขั้นตอนการล้างผักหรือเคลือบสารแบคทีเรียโอซินลงบนพื้นผิวของผักก็ได้ Vescovo *et al.* (1995) รายงานว่าสารที่สร้างจากเชื้อ *L. casei* มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อพวก coliform หรือ enterococci ที่ปนเปื้อนในผักสดพร้อมบริโภคเมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่ำ Cai *et al.* (1997) ทำการเติม *L. lactis* HPB1688 ที่มีความสามารถในการสร้าง nisin Z ลงในผักสดพร้อมบริโภค เพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* พบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อลงได้

10 เท่าภายหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 7 และ 10 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วัน Allende *et al.* (2007) พบว่าเมื่อใช้ nisin ร่วมกับ coagulin สามารถลดจำนวนเชื้อ *L. monocytogenes* ที่ปนเปื้อนบนผักกาดขาวได้ 3.2-3.5 LogCFU/ml ภายในเวลา 3 วัน เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส Trias *et al.* (2008) พบว่าเชื้อ *Leuconostoc* spp., *L. plantarum*, *Weissella* spp. และ *L. lactis* ที่คัดแยกได้จากผักและผลไม้ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคที่ปนเปื้อนบริเวณบาดแผลของแอปเปิ้ลและผักกาดขาวได้ โดยสามารถลดเชื้อ *S. Typhimurium* และ *E. coli* ได้ 1-2 Log CFU/g และสามารถทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* ได้หมด นอกจากนี้ Randazzo *et al.* (2009) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของ bacteriocin RUC9 ที่ผลิตโดย *L. lactis* RUC9 ในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ที่ปนเปื้อนใน lettuce iceberg เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อได้ 2.4 LogCFU/g

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. ตัวอย่างผักและผลไม้

ผัก ผลไม้ ดอกไม้ และผักสดพร้อมบริโภค ที่วางขายในซูเปอร์มาร์เก็ตและตลาดสดในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ทำการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มและเก็บครั้งละ 10 ตัวอย่าง โดยทำการเก็บในช่วงเวลา 16.00-19.00 น. รวมทั้งสิ้น 62 ตัวอย่าง

#### 2. เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซินได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ และภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยกิวฉิว ประเทศญี่ปุ่น แสดงในตารางที่ 8

#### 3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.1 De Man Rogosa and Sharpe broth (MRS, Merck)
- 3.2 De Man Rogosa and Sharpe agar (MRS agar, Merck)
- 3.3 De Man Rogosa and Sharpe + 0.75% agar (MRS soft agar, Merck)
- 3.4 Tryptic soy broth + 0.6% yeast extract (TSBYE, Merck)
- 3.5 Tryptic soy agar + 0.6% yeast extract (TSAYE, Merck)
- 3.6 Tryptic soy broth + 0.6% yeast extract + 0.75% agar (TSBYE soft agar, Merck)
- 3.7 Potato Dextrose agar (PDA, Merck)
- 3.8 Palcam Agar Base + Palcam Selective Supplement (Oxoid)
- 3.9 Chromocult Listeria Selective Agar Base (Merck)
- 3.10 Nutrient Agar
- 3.11 Nutrient Broth

ตารางที่ 8 จุลินทรีย์เป้าหมายหรือจุลินทรีย์ทดสอบ (target strains) ที่ใช้ทดสอบการยับยั้งของสารแบคทีเรียอิน

จุลินทรีย์	อาหารเลี้ยงเชื้อ <sup>1</sup>	อุณหภูมิในการเจริญ (°C)
1. เชื้อแบคทีเรีย		
<i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 <sup>a</sup>	TSBYE	30
<i>Bacillus subtilis</i> JMC 1465 <sup>a</sup>	TSBYE	30
<i>Bacillus circulans</i> JCM 2504 <sup>a</sup>	TSBYE	30
<i>Escherichia coli</i> JM 109 <sup>a</sup>	TSBYE	37
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 <sup>a</sup>	TSBYE	37
<i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 <sup>b</sup>	TSBYE	37
<i>Listeria monocytogenes</i> 301 <sup>b</sup>	TSBYE	37
<i>Micrococcus luteus</i> IFO 12708 <sup>a</sup>	TSBYE	30
<i>Salmonella</i> Typhimurium <sup>c</sup>	TSBYE	37
<i>Salmonella</i> Enteritica <sup>c</sup>	TSBYE	37
<i>Yersinia enterocolitica</i> <sup>c</sup>	TSBYE	37
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>d</sup>	TSBYE	37
2. เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก		
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 <sup>a</sup>	MRS	30
<i>Enterococcus faecium</i> JCM 5804 <sup>a</sup>	MRS	37
<i>Enterococcus faecium</i> TUA 1344L <sup>a</sup>	MRS	30
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435 <sup>a</sup>	MRS	37
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917 <sup>a</sup>	MRS	30
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 <sup>a</sup>	MRS	30
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 763 <sup>a</sup>	MRS	30
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM 6124 <sup>a</sup>	MRS	30
<i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885 <sup>a</sup>	MRS	37
<i>Pediococcus pentosaceus</i> TISTR 536 <sup>a</sup>	MRS	37
3. เชื้อแบคทีเรียก่อโรคในพืช		
<i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> <sup>d</sup>	NB	30
<i>Erwinia carotovora</i> <sup>d</sup>	NB	30
<i>Rastonia solanacearum</i> <sup>d</sup>	NB	30
<i>Xanthomonas</i> spp. <sup>d</sup>	NB	30

## ตารางที่ 8 (ต่อ)

จุลินทรีย์	อาหารเลี้ยงเชื้อ <sup>1</sup>	อุณหภูมิในการเจริญ (°C)
4. เชื้อราก่อโรคในพืช		
<i>Rhizoctonia solani</i> DOAC 1406 <sup>d</sup>	PDA	30
<i>Fusarium proliferatum</i> DOAC 0842 <sup>d</sup>	PDA	30
<i>Pyricularia griseum</i> <sup>d</sup>	PDA	30

หมายเหตุ <sup>a</sup>: ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
<sup>b</sup>: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, <sup>c</sup>: สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์<sup>d</sup>: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,  
<sup>e</sup>: ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

<sup>1</sup>TSBYE: Tryptic soy broth + Yeast extract 0.6%; MRS: De Man Rogosa and Sharpe broth; NB: Nutrient Broth, PDA: Potato Dextrose Agar

## 4. สารเคมี

- 4.1 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 5 โมลาร์ (Anala R, England)
- 4.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์ (Merck)
- 4.3 Tween 80 (Lab Centre)
- 4.4 แคลเซียมคาร์บอเนต (Scharlau Chemical S.A.)
- 4.5 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (Ajax Chemicals)
- 4.6 เอทานอล (Merck)
- 4.7 ไอโซโพรพานอล (Fisher Scientific)
- 4.8 ไตรฟลูออโรอะซิติก (Fluka)
- 4.9 Amberlite XAD 16 (Sigma)

## 5. วัสดุและเครื่องมือ

- 5.1 เครื่องชั่งแบบ 2 ตำแหน่ง (Sartorius BP 1200)
- 5.2 เครื่องชั่งแบบ 4 ตำแหน่ง (Sartorius BP 210S)
- 5.3 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Meterscan 20<sup>PH</sup>)
- 5.4 หม้อนิ่งฆ่าเชื้อระบบความดันไอน้ำ (Tomy SS-325)
- 5.5 ตู้บ่มปรับอุณหภูมิ (Fisher Scientific Isotemp)
- 5.6 ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (Whirlpool)
- 5.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Gemmyco – YCW-010)
- 5.8 เครื่องตีผสมตัวอย่าง (Seward-stomacher 400)
- 5.9 เครื่องผสม (Vortex-2 Gennie)
- 5.10 เครื่องกวนสารละลายด้วยระบบแม่เหล็ก (HL Instrument, Magnetic stirrer-MS 115)
- 5.11 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Labnet-Spectrafuge)
- 5.12 เครื่องแยกสารแบบหมุนเหวี่ยง (centrifuge) Fotodyne และ Kokusan รุ่น H18
- 5.13 ตู้ปลอดเชื้อ (flow dryer mark และ Biohazard Gelman Sciences Australia BH143)
- 5.14 เครื่องระเหย Rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-200)
- 5.15 econo column (BioRad)
- 5.16 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Jenway รุ่น 6405 UV/Vis

## วิธีการ

### 1. การแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างผัก ผลไม้ ดอกไม้ ผักสลัดพร้อมบริโภครวม

นำตัวอย่างผัก ผลไม้ ดอกไม้ ผักสลัดพร้อมบริโภครวม 25 กรัมใส่ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อที่ใช้สำหรับตีปั่นอาหาร เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ (0.85% NaCl) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องตีปั่น (stomacher) เป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางตัวอย่างแบบอนุกรมครั้งละ 10 เท่า จนได้ความเจือจางที่เหมาะสม แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธี spread plate โดยปีเปิดตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MRS ที่มี bromocresol purple (0.004 เปอร์เซ็นต์) และแคลเซียมคาร์บอเนต (1 เปอร์เซ็นต์) ทำการทดลอง 2 ซ้ำในแต่ละความเจือจาง นำจานเพาะเชื้อไปบ่มในสภาวะที่เป็น facultative anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีทั้งหมด ที่เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลืองจากจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี รายงานปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดเป็น Log CFU/g

สุ่มเก็บโคโลนีบนจานเพาะเชื้อและทำให้บริสุทธิ์โดยการขีดเชื้อ (cross streak) บนอาหารแข็ง MRS จนได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเหลว MRS ที่ผสมกลีเซอรอล จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 2. การศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งคัดแยกได้ทั้งหมดจากข้อ 1 มาศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี ตามวิธีการของ Axelsson (1998) ได้แก่ การดิสแกรม รูปร่างการจัดเรียงตัวของเซลล์ การสร้างก๊าซเมื่อเจริญในอาหารเหลว MRS การเจริญในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส การเจริญในอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์ การเจริญในอาหารเหลว MRS ที่ปรับค่าพีเอชเป็น 4.4 และ 9.6 และรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีลักษณะดังกล่าว

### 3. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

#### 3.1 การเตรียมจุลินทรีย์ทดสอบ

นำจุลินทรีย์ทดสอบ (ตารางที่ 8) ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์แต่ละชนิด และบ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 50 ไมโครลิตร ลงใน soft agar ที่เหมาะสมต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิด ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปเททับในการทดสอบต่อไป

#### 3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง โดยวิธี Direct spot (Schillinger และ Lucke, 1989)

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่สุ่มเก็บได้จากข้อ 1 มาปลูกเชื้อแบบจุด (point inoculate) ลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะ facultative anaerobe จนเชื้อเจริญเป็นโคโลนีบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นเททับผิวหน้าจานเพาะเชื้อดังกล่าวด้วยแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมใน soft agar ตามข้อ 3.1 รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เททับผิวหน้าแข็งตัว จึงนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิซึ่งเหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียทดสอบนั้นๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบบริเวณ โซนใส (clear zone) ซึ่งเกิดขึ้นจากสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น รายงานผลเป็นบวก ถ้าเห็น โซนใสของการยับยั้ง

#### 3.3 การทดสอบยืนยันการสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งประเภทแบคทีเรียโอสิน โดยวิธี Spot on lawn (Ahn และ Stiles, 1990)

##### 3.3.1 การเตรียมจานเพาะเชื้อที่มีแบคทีเรียทดสอบ

นำแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมในข้อ 3.1 เททับลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MRS รอจนผิวหน้าอาหารแข็ง จึงนำไปทำให้ผิวหน้าอาหารแห้ง โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปใช้ทดสอบต่อไป

### 3.3.2 การทดสอบยืนยันการสร้างสารแบคทีเรียโอซิน

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แสดงการยับยั้งจากข้อ 3.2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS เพื่อให้แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญและสร้างสารยับยั้งและปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำสารละลายเซลล์มาทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 5.5-6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 5.0 โมลาร์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์จุลินทรีย์ออก ที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 10 นาที นำน้ำเลี้ยงเชื้อใส่ที่ได้มากรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อขนาด 0.22 ไมครอน เก็บส่วนใสที่กรองได้ใน eppendorf ปลอดเชื้อ จากนั้นเปิดส่วนใสที่กรองแล้ว 10 ไมโครลิตร หยดลงบนจานเพาะเชื้อที่มีแบคทีเรียทดสอบตามข้อ 3.3.1 รอจนสารละลายใสซึมผ่านวุ้น นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิซึ่งเหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียทดสอบเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตโซนใส (clear zone) ซึ่งเกิดขึ้นจากการที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างสารยับยั้งประเภทแบคทีเรียโอซิน

### 3.3.3 การหาค่ากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยวิธี Critical dilution assays (Yousef, 2003)

การหาค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซิน โดยวิธี Critical dilution assay นำน้ำเลี้ยงเชื้อใสที่ผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองปลอดเชื้อขนาด 0.22 ไมครอน มาเจือจางแบบอนุกรมลำดับละ 2 เท่าด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นเปิดตัวอย่างในแต่ละความเจือจางปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนจานอาหารเพาะเชื้อที่มีแบคทีเรียทดสอบตามข้อ 3.3.1 รอจนสารละลายใสซึมผ่านวุ้น นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิซึ่งเหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หาค่ากิจกรรมการยับยั้งจากค่าการเจือจางสูงสุดที่ยังคงเห็นบริเวณโซนใส (clear zone) ของการยับยั้งชัดเจนและคำนวณค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อมิลลิลิตร (Arbitrary Unit, AU/ml) จากสมการดังนี้

$$\text{AU/ml} = \frac{\text{DF}_i \cdot 1000}{V}$$

$$\begin{aligned} \text{DF}_i &= \text{ค่าส่วนกลับของระดับความเจือจางสูงสุดที่พบการยับยั้ง} \\ V &= \text{ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อใสที่ผ่านการกรอง (\mu\text{l})} \end{aligned}$$

#### 4. การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอร์ิโอซิน

นำสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอร์ิโอซินมาจำแนกชนิด โดยการศึกษาลำดับเบสของ 16S rDNA ขนาด 500 base pairs โดยส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ KU-vector, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA ของสายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐานในฐานข้อมูล (Genebank database) ผ่านเครือข่ายอินเทอร์เน็ตของ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

#### 5. การศึกษารูปแบบการเจริญและการสร้างสารแบคเทอร์ิโอซิน

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่สร้างสารแบคเทอร์ิโอซินในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในอาหารเหลว MRS 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง วัดการเจริญของเชื้อโดยหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) (Jenway, 6405 UV/Vis) วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อโดย pH-meter (Meterscan 20<sup>PH</sup>) และวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งโดยวิธี Critical dilution assay (Yousef, 2003)

#### 6. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารแบคเทอร์ิโอซิน

##### 6.1 อุณหภูมิ

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอร์ิโอซิน อายุ 16 ชั่วโมง ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิตู้เย็น (7-10), 20, 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เก็บตัวอย่างที่ 0, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญของเชื้อ โดยหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) (Jenway, 6405 UV/Vis) วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อโดย pH-meter (Meterscan 20<sup>PH</sup>) และวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งโดยวิธี Critical dilution assay (Yousef, 2003) เลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อทำการศึกษาคต่อไป

## 6.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน อายุ 16 ชั่วโมง ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 3.0, 5.0, 5.8 (อาหารปกติ), 7.0 และ 9.0 โดยใช้ citrate phosphate buffer และ glycine-NaOH buffer นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสถานะนิ่ง เก็บตัวอย่างที่ 0, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญของเชื้อ โดยหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) (Jenway, 6405 UV/Vis) วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อโดย pH-meter (Meterscan 20<sup>pH</sup>) และวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งโดยวิธี Critical dilution assay (Yousef, 2003)

## 6.3 ปริมาณกลูโคส

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน อายุ 16 ชั่วโมง ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 0, 0.5, 1, 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสถานะนิ่ง เก็บตัวอย่างที่ 0, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญของเชื้อ โดยหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) (Jenway, 6405 UV/Vis) วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อโดย pH-meter (Meterscan 20<sup>pH</sup>) และวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งโดยวิธี Critical dilution assay (Yousef, 2003)

## 6.4 ปริมาณ โซเดียมคลอไรด์

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน อายุ 16 ชั่วโมง ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 0.5, 1, 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสถานะนิ่ง เก็บตัวอย่างที่ 0, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญของเชื้อ โดยหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) (Jenway, 6405 UV/Vis) วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อโดย pH-meter (Meterscan 20<sup>pH</sup>) และวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งโดยวิธี Critical dilution assay (Yousef, 2003)

## 7. การสกัดสารแบคทีเรียโอสซิน (Cintas *et al.*, 2000)

### 7.1 การเตรียม Amberlite XAD-16

ซังเรซิน Amberlite XAD-16 จำนวน 20 กรัม (อยู่ในรูปชิ้น) ทำการล้างเกลือโซเดียมคลอไรด์และเกลือโซเดียมคาร์บอเนตที่เป็นสาร preservative ออกโดยการแช่ในสารละลาย isopropanol (50%) ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง (7-10 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 100-300 มิลลิลิตร จนกระทั่งไม่ได้กลิ่น isopropanol อีก เทน้ำออก นำเฉพาะเม็ดเรซินไปใช้ต่อทันที

### 7.2 การสกัดแยกสารแบคทีเรียโอสซิน

การสกัดแยกสารแบคทีเรียโอสซิน อาศัยหลักการ hydrophobic adsorption ของ Amberlite XAD-16 (Sigma) ในการแยกสารโปรตีน โดยการถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 1 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นแยกเซลล์ออกที่ 10,000 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำเอาน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส (supernatant) ใส่ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร เติมเรซิน amberlite จากข้อ 7.1 นำไปใส่ในเครื่องเขย่าแบบ reciprocal shaker เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (เพื่อให้ amberlite มีการกระจายตัวสม่ำเสมอ และให้สารแบคทีเรียโอสซินดูดซับบนผิวของ amberlite) แล้วบรรจุลงใน econo คอลัมน์ขนาด 2.5 x 30 cm ปล่อยให้ส่วนใสออกจากคอลัมน์จนหมด ให้เหลือเพียง amberlite (ที่มีสารแบคทีเรียโอสซินดูดซับอยู่บนผิว) ไว้ในคอลัมน์ ทำการล้างสิ่งปนเปื้อนที่ละลายได้ในน้ำออกจาก amberlite ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และทำการล้างสิ่งปนเปื้อนที่ละลายได้ในเอทานอลออกจาก amberlite ด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการชะสารแบคทีเรียโอสซินออกจาก amberlite ด้วยสารละลาย isopropanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ที่เติม trifluoroacetic acid (TFA) ผสมอยู่ 0.1 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย isopropanol ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ 30 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ชะด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ isopropanol ไปทำการระเหย solvent ออกจนหมด ด้วยเครื่องระเหยสารละลายแบบหมุนเหวี่ยง ทำการเจือจางสารแบคทีเรียโอสซินเข้มข้นที่ได้ ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 5.7 จนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องเพื่อศึกษาต่อไป

## 8. การศึกษาคุณสมบัติของสารแบคทีริโอซิน

### 8.1 ความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH 2.0-12.0)

นำสารสกัดแยกที่ได้จากข้อ 7 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 และ 12.0 ด้วยสารละลาย 5 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือกรดไฮโดรคลอริก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ ขนาด 0.22 ไมครอน เก็บส่วนใสลงใน eppendorf ปลอดเชื้อ นำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้ง โดยวิธี Critical dilution assay (Yousef, 2003)

### 8.2 การทนต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน

นำสารสกัดแยกที่ได้จากข้อ 7 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อเอนไซม์แต่ละชนิด ได้แก่  $\alpha$ -chymotrypsin (pH 7.0), proteinase K (pH 7.0), trypsin (pH 7.0) actinase K (pH 7.0), papain (pH 7.0), pepsin (pH 3.0) หลังจากครบระยะเวลาที่กำหนด ทำการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการนำไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ ขนาด 0.22 ไมครอน เก็บส่วนใสใน eppendorf ปลอดเชื้อ นำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งโดยวิธี Critical dilution assay (Yousef, 2003)

### 8.3 ความเสถียรต่อความร้อน

นำสารสกัดแยกที่ได้จากข้อ 7 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 63, 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30, 15, และ 15 นาที ตามลำดับ เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยการแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อขนาด 0.22 ไมครอน เก็บส่วนใสใน eppendorf ปลอดเชื้อ นำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งโดยวิธี Critical dilution assay (Yousef, 2003)

#### 8.4 อายุการเก็บ

นำสารสกัดแยกที่ได้จากข้อ 7 มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆเดือน เป็นระยะเวลา 10 เดือน จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อขนาด 0.22 ไมครอน เก็บส่วนใสใน eppendorf ปลอดเชื้อ นำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งโดยวิธี Critical dilution assay (Yousef, 2003)

#### 8.5 รูปแบบการทำลาย (mode of action)

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียทดสอบ 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับอีกชุดการทดลองที่ทำการเติมสารแบคทีริโอซิน ความเข้มข้น 256 และ 1,024 AU/ml ที่เวลา 9 ชั่วโมง และบ่มในสภาวะเดียวกัน ทำการเก็บตัวอย่างที่ 0, 9, 13, 17, 21 และ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเชื้อทั้งหมด รายงานผลเป็น Log CFU/ml

### 9. การศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในผักสลัดพร้อมบริโภค

ทำการเก็บตัวอย่างผักสลัดพร้อมบริโภค ที่วางจำหน่ายในตลาดสดและ supermarket ในเขตกรุงเทพฯและปริมณฑล รวมจำนวน 102 ตัวอย่าง มาทำการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยใช้วิธีมาตรฐาน ISO 11290-1/A1-2004 (Fraser และ Sperber, 1988; McClain และ Lee, 1988)

นำตัวอย่างผักสลัดชนิดต่างๆอย่างละ 25 กรัม ทำการ pre-enrich ใน Half-Fraser broth (Merck) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปิดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Fraser broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาณ 1 ลูบ ทำการ streak ลงบนอาหาร Chromocult Listeria Agar (Merck) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีที่มีสีฟ้าและมีโซนขุนขาวล้อมรอบซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *L. monocytogenes*

## 10. การทดสอบประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303

### 10.1 การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อ

ถ่ายเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว TSBYE ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือจางเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ (0.85% NaCl) ให้ได้จำนวนเซลล์สุดท้ายประมาณ  $10^2$  CFU/ml เติมสารแบคทีเรียโอซินที่ได้จากข้อ 7 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 128, 256 และ 512 AU/ml ผสมให้เข้ากัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง TSAYE ด้วยวิธี pour plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ทั้งหมดและรายงานเป็น Log CFU/ml

### 10.2 การหาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมต่อการยับยั้งด้วยสารแบคทีเรียโอซิน

ถ่ายเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว TSBYE ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เจือจางเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ (0.85% NaCl) ให้ได้จำนวนเซลล์สุดท้ายประมาณ  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  และ  $10^5$  CFU/ml จากนั้นเติมสารแบคทีเรียโอซินที่ได้จากข้อ 7 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 512 AU/ml ผสมให้เข้ากัน เก็บตัวอย่างที่ 0 และ 5 นาที ทำการเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง TSAYE ด้วยวิธี pour plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ทั้งหมดและรายงานเป็น Log CFU/ml

## 11. การศึกษาการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ในน้ำผักปลอดเชื้อ

ในการศึกษานี้เลือกแตงกวาเป็นต้นแบบของผักสลัดพร้อมบริโภค เนื่องจากสามารถจัดการได้ง่ายและคั้นน้ำได้ปริมาณมาก โดยนำแตงกวามาล้างให้สะอาด จากนั้นทำการคั้นน้ำโดยใช้เครื่องแยกกากผลไม้ นำน้ำแตงกวามาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาทีเพื่อทำลายเอนไซม์และโปรตีนบางส่วน จากนั้นแบ่งน้ำแตงกวาใส่พลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันสูง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บน้ำแตงกวาปลอดเชื้อไว้ศึกษาต่อไป

ถ่ายเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 จากอาหาร TSBYE และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ลงในอาหาร TSBYE และน้ำแดงกวาปลอดเชื้อ ให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นประมาณ  $10^3$  CFU/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง TSAYE ด้วยวิธี pour plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับปริมาณเชื้อทั้งหมดและรายงานเป็น Log CFU/ml

## 12. การศึกษาประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซินในการยับยั้งเชื้อในน้ำแดงกวาปลอดเชื้อ

ถ่ายเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 จากอาหาร TSBYE และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ลงในน้ำแดงกวาปลอดเชื้อ ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ  $10^2$  และ  $10^5$  CFU/ml จากนั้นเติมสารแบคทีริโอซินที่ได้จากข้อ 7 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 512 AU/ml สำหรับชุดควบคุมเติมด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-10 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง TSAYE ด้วยวิธี pour plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับปริมาณเชื้อทั้งหมดและรายงานเป็น Log CFU/ml

## 13. การศึกษาระยะเวลาในการเกาะติดของเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 บนผิวแดงกวาสด

นำเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ที่เลี้ยงใน TSBYE และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 xg เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ (0.85% NaCl) 2 ครั้ง จากนั้นเจือจางเชื้อในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 ลิตร ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ  $10^4$ ,  $10^5$  และ  $10^8$  CFU/ml นำแดงกวาสดมาล้าง จากนั้นปอกเปลือกแล้วหั่นเป็นท่อนๆ ให้แต่ละท่อนมีน้ำหนักประมาณ  $25 \pm 1$  กรัม จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายเซลล์ดังกล่าวข้างต้น เป็นเวลา 5, 10, 20 และ 30 นาที เพื่อให้เชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ยึดเกาะบนผิวแดงกวา ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 บนผิวแดงกวาสด โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร PALCAM ด้วยวิธีการ pour plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ทั้งหมดและรายงานเป็น Log CFU/g

#### 14. การศึกษาระยะเวลาของสารแบคทีเรียโอสตินในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 บนผิวแตงกวาสด

ทำการปนเปื้อนเทียมผิวแตงกวาสดด้วยเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ในสารละลายเซลล์เข้มข้น  $10^4$  CFU/ml ดังกล่าวในข้อ 13 เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เชื้อยึดเกาะบนผิวแตงกวาในปริมาณ  $10^2$  CFU/g จากนั้นนำแตงกวาที่มีการปนเปื้อนเทียมไปแช่ในสารละลายน้ำกลั่นและสารละลายน้ำกลั่นที่เติมสารแบคทีเรียโอสตินเข้มข้น 512 AU/ml ส่วนชุดควบคุมไม่ต้องแช่ในสารละลายที่กล่าวข้างต้น เก็บตัวอย่างที่เวลา 5, 10 และ 15 นาที เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ที่เหลือรอดบนผิวแตงกวาสด โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหาร PALCAM ด้วยวิธี pour plate บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง รายงานประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอสตินในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ที่ระยะเวลาต่างๆ เป็นเปอร์เซ็นต์

#### 15. การประยุกต์สารแบคทีเรียโอสตินในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ที่ปนเปื้อนบนผิวแตงกวาสดในปริมาณระดับต่ำ/สูง

##### 15.1 การปนเปื้อนเทียมเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 บนผิวแตงกวาสด

ทำการปนเปื้อนเทียมเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 บนผิวแตงกวาสดในสารละลายเซลล์เข้มข้น  $10^4$  และ  $10^8$  CFU/ml ดังกล่าวในข้อ 13 เป็นเวลา 20 นาที เพื่อจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ที่ระดับต่ำ ( $10^2$  CFU/g) และระดับสูง ( $10^5$  CFU/g), ตามลำดับ จากนั้นนำไปศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งโดยสารแบคทีเรียโอสตินต่อไป

15.2 การศึกษาประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอสตินในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 บนผิวแตงกวาสดที่มีการปนเปื้อนเทียมในระดับต่ำ/ระดับสูงและผลต่ออายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-10 องศาเซลเซียส)

นำแตงกวาสดที่มีการปนเปื้อนเทียมด้วยเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ในปริมาณ  $10^2$  และ  $10^5$  CFU/g มาแช่ในสารละลายต่างๆ เป็นเวลา 5 นาที ดังนี้

- น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
- น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมสารแบคทีเรียโอซินที่ได้จากข้อ 7 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 512 AU/ml
- น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมสารแบคทีเรียโอซินที่ได้จากข้อ 7 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1,024 AU/ml

เมื่อครบระยะเวลา ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ที่เหลือรอดบนผิวแตงกวาสด โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Chromocul Listeria Agar ด้วยวิธี pour plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง รายงานประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 เป็นเปอร์เซ็นต์ จากนั้นเก็บรักษาแตงกวาที่ผ่านการแช่ในสารละลายต่างๆ ที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-10 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน และทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ทั้งหมดอีกครั้งหนึ่ง รายงานปริมาณเชื้อเป็น Log CFU/g

#### 16. การประยุกต์สารแบคทีเรียโอซินในน้ำประปาเพื่อยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 บนผิวแตงกวาสด

นำแตงกวาสดที่มีการปนเปื้อนเทียมด้วยเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ในปริมาณ  $10^2$  CFU/g มาแช่ในสารละลายต่างๆ เป็นเวลา 5 นาที ดังนี้

- น้ำกลั่นปลอดเชื้อ
- น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมสารแบคทีเรียโอซินที่ได้จากข้อ 7 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 512 AU/ml
- น้ำประปาที่เติมสารแบคทีเรียโอซินที่ได้จากข้อ 7 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 512 AU/ml
- น้ำประปาผสมคลอรีน 100 ppm

เมื่อครบระยะเวลา ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ที่เหลือรอดบนผิวแดงกวาสด โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหาร PALCAM ด้วยวิธี pour plate และป่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง รายงานประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 เป็นเปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-10 องศาเซลเซียส) เก็บตัวอย่างที่เวลา 4 และ 8 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ทั้งหมดอีกครั้งหนึ่ง รายงานปริมาณเชื้อเป็น Log CFU/g

#### สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

#### ระยะเวลาในการทดลอง

การทดลองครั้งนี้เริ่มตั้งแต่ มกราคม พ.ศ. 2549 สิ้นสุด กรกฎาคม พ.ศ. 2552

## ผลและวิจารณ์

### 1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากผัก ผลไม้และผักสลัดพร้อมบริโภค

ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างผักสด ผลไม้ ดอกไม้และผักสลัดพร้อมบริโภค ซึ่งวางขายในซูเปอร์มาร์เกตและตลาดสดในเขตกรุงเทพฯ และปริมณฑล จำนวน 62 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของตัวอย่าง โดยพบได้ตั้งแต่ 3.11 ถึง 7.23 Log CFU/g (ตารางที่ 9) ซึ่งคล้ายคลึงกับรายงานของ Heard (1999) ที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกในช่วง  $10^2$ - $10^8$  CFU/g ในผักสลัด แบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้อาจเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ที่พบได้ตามธรรมชาติ (Breidt *et al.*, 1995, Maxcy, 1978) ในกรณีของผักสด ดอกไม้ และผักสลัดพร้อมบริโภคจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างค่อนข้างเป็นกลาง ดังนั้นจึงพบแบคทีเรียกรดแลคติกมากกว่าในผลไม้ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างค่อนข้างเป็นกรดเล็กน้อย แบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้อาจปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมเช่น จากดิน น้ำ อากาศ และแมลง โดยเฉพาะผักประเภทใบจะพบการปนเปื้อนมากกว่าผักประเภทหัวหรือหน่อ เป็นต้น ในการศึกษานี้เป็นที่น่าสังเกตว่า ตัวอย่างผลไม้ดองและผลไม้บางชนิด ไม่พบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเลย อาจเป็นไปได้ว่าในการดองผลไม้ อาจมีการเติมสารกันเสีย เพื่อยืดอายุการเก็บ ทำให้แบคทีเรียประจำถิ่นถูกทำลายไปหมด

ตารางที่ 9 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในผักสด ผักสลัดพร้อมบริโภค ผลไม้ และดอกไม้

ตัวอย่าง	จำนวน	LAB (LogCFU/g) <sup>a</sup>
<b>ผักสด (20)<sup>b</sup></b>		
มะเขือเทศ	2	6.97±0.04
แตงกวา	1	5.73
กระหล่ำปลี	2	6.78±0.05
หอมหัวใหญ่	3	6.16±1.42
ผักกาดแก้ว	1	5.52
ผักคะน้า	2	5.59±0.03
ผักบุ้งจีน	2	4.70±1.27
ผักกาดขาว	3	6.97±0.15
ผักคื่นช่าย	1	6.58
มะเขือยาว	1	5.81
ดอกแค	1	5.65
แครอท	1	TNTC
<b>ผลไม้ (14)<sup>b</sup></b>		
สับปะรด	4	3.11±2.09
แอปเปิ้ล	1	5.41
แคนตาลูป	2	5.76±0.10
ฝรั่ง	1	0
มะม่วง	1	0
ชมพู่	1	0
องุ่นแดง	1	0
องุ่น	1	0
มะละกอ	1	0
อโวคาโด	1	0
<b>ผักสลัดพร้อมบริโภค (18)<sup>b</sup></b>		
มะเขือเทศ	2	4.66±0.11
แตงกวา	1	6.61
กระหล่ำปลี	1	4.96
หอมหัวใหญ่	1	5.54

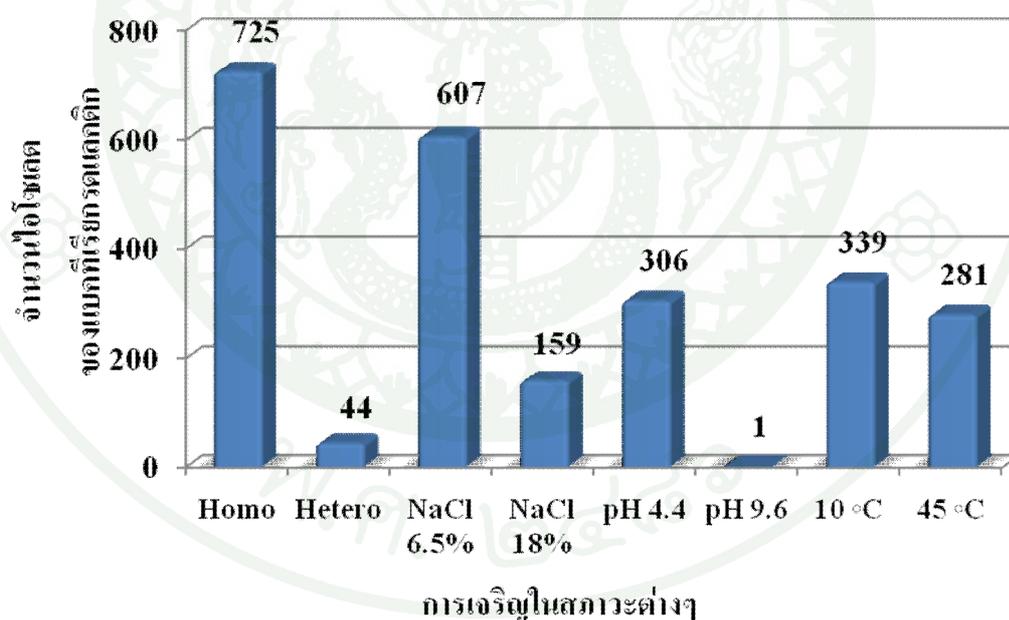
ตารางที่ 9 (ต่อ)

ตัวอย่าง	จำนวน	LAB (LogCFU/g) <sup>a</sup>
ผักกาดแก้ว	1	5.45
ข้าวโพด	2	7.03±0.28
กระท่อมปลีม่วง	1	7.23
มันฝรั่ง	1	6.20
ถั่วลิสง	1	5.14
เผือก	1	6.14
พริกหยวก	2	4.90±0.31
หน่อไม้ฝรั่ง	1	5.30
กรีนโอ๊ค	1	6.65
บร็อคโคลี่	1	5.30
ฟักทอง	1	5.23
<b>ดอกไม้ (5)<sup>b</sup></b>		
ดาวเรือง	2	5.25±1.84
กุหลาบ	4	5.06±0.63
เยอบีร่า	1	6.28
ยิปโซ	1	4.64
แอสเตอร์	1	4.56
<b>วัสดุเหลือใช้จากการเกษตร (1)<sup>b</sup></b>		
กากมัน	1	5.66

หมายเหตุ <sup>a</sup>: ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, <sup>b</sup>: จำนวนตัวอย่างที่ศึกษา, TNTC:

Too Numerous To Count, LAB: Lactic acid bacteria

จากการสุ่มเก็บโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างทั้งหมดรวม 769 ไอโซเลต (ตารางผนวกที่ ค1) มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเชื้อทั้งหมดติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์อะเลส และสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มที่มีรูปร่างท่อน จำนวน 659 ไอโซเลต (85.70%) และกลุ่มที่มีรูปร่างกลมจำนวน 110 ไอโซเลต (14.30%) ในจำนวนนี้ส่วนใหญ่มีการเจริญแบบ Homofermentative คิดเป็น 94.28 เปอร์เซ็นต์ และมีเพียง 5.72 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการเจริญแบบ Heterofermentative ในสถานะที่มีเกลือ 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์ เชื้อที่คัดแยกสามารถเจริญได้คิดเป็นร้อยละ 78.93 และ 20.67 ตามลำดับ ส่วนการเจริญที่อุณหภูมิต่ำ 10 องศาเซลเซียส เชื้อที่คัดแยกได้สามารถเจริญได้เพียง 44.08 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิสูง 45 องศาเซลเซียส มีเพียง 36 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถเจริญได้ จากจำนวนเชื้อทั้งหมดพบว่ามี 306 ไอโซเลตที่สามารถเจริญได้ในสถานะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.4 คิดเป็น 39.79 เปอร์เซ็นต์ และมีเพียง 1 ไอโซเลต คิดเป็น 0.13 เปอร์เซ็นต์ ที่เจริญได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 9.6 (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากตัวอย่างผัก ผลไม้ ดอกไม้ และผักสลัดพร้อมบริโภคนที่เจริญในสถานะต่าง ๆ

## 2. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซิน

### 2.1 Direct spot test

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากข้อที่ 1 จำนวน 769 ไอโซเลต มาทดสอบการสร้างสารยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบ โดยวิธี Direct spot พบว่ามีเพียง 43 ไอโซเลต ที่แสดงโซนใสของการยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบชนิดต่างๆ (ตารางผนวกที่ ค2) ซึ่งการยับยั้งนี้อาจเนื่องมาจากการยับยั้งที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างในระหว่างการเจริญบนอาหารแข็งและแพร่กระจายออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยสารยับยั้งหลักคือ กรดอินทรีย์ที่เกิดจากการใช้กลูโคสของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ส่วนสารยับยั้งประเภทอื่นอาจเป็น คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดแอซิทิล รูทีริน หรือแบคทีเรียโอซิน (Ouwehand and Vesterlund, 2004)

ในการศึกษานี้ไม่พบการยับยั้งต่อเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืชเลย แต่พบการยับยั้งต่อแบคทีเรียแกรมลบเช่น *Erwinia carotovora* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคน้ำและ (Soft rot) รวมทั้ง *E. coli* แต่โซนใสของการยับยั้งไม่กว้างมาก ทั้งนี้อาจเกิดจากกรดแลคติกที่แพร่กระจายในอาหารวุ้น สำหรับแบคทีเรียทดสอบอื่นๆ ที่ไวต่อการยับยั้งโดยแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ *Listeria innocua* ซึ่งพบปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมทั่วไป

อย่างไรก็ตามดังได้กล่าวแล้วว่า สารยับยั้งจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีหลายชนิด ในการทดสอบยืนยันว่าสารยับยั้งนั้นเป็นสารแบคทีเรียโอซินหรือไม่ สามารถทำได้โดยวิธี Spot on lawn

### 2.2 Spot on lawn test

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติก ที่แสดงการยับยั้งจากข้อ 2.1 จำนวน 43 ไอโซเลต มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในสภาวะ facultative anaerobe และทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อให้เป็นกลาง เพื่อลดผลของกรดอินทรีย์ ก่อนนำมาทดสอบกับแบคทีเรียทดสอบ พบว่ามีเพียง 3 ไอโซเลต คือ KU-F2, KU-F72 และ KU-D1 ที่แสดงการยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *E. faecalis* JCM 5803, *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157, *Lb. plantarum* ATCC 14917, *E. faecium* TUA 1344L, *P. pentosaceus* JCM 5885 ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ ที่ถูกยับยั้งเช่น *L. innocua* ATCC 33090 (ตารางที่ 10) ส่วนแบคทีเรียแกรมลบไม่พบการยับยั้งเกิดขึ้น

เลย ในการศึกษาี้ สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้เพียง 3 ไอโซเลต จากทั้งหมด 769 ไอโซเลต คิดเป็น 0.4 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

**ตารางที่ 10** แบคทีเรียกรดแลคติกที่แสดงการยับยั้งต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี Spot on lawn

แบคทีเรียทดสอบ	แบคทีเรียกรดแลคติก		
	KU-F2	KU-F72	KU-D1
<i>Enterococcus faecium</i> TUA 1344L	+++	+++	+++
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803	+++	+++	+++
<i>Lactobacillus sakei subsp. sakei</i> JCM 1157	+++	+++	+++
<i>Lactobacillus. plantarum</i> ATCC 14917	+++	+++	+++
<i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885	+++	++	++
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	+++	+++	+++

หมายเหตุ ++ : ความกว้างของโซนใสน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร

+++ : ความกว้างของโซนใส 10-15 มิลลิเมตร

แม้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลตจะแสดงการยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบในกลุ่มเดียวกัน แต่ค่ากิจกรรมการยับยั้งจะแตกต่างกัน (ตารางที่ 11) จะเห็นได้ว่า ไอโซเลต KU-F2 ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงกว่าตัวอื่นๆ ดังนั้นจึงคัดเลือกไอโซเลตดังกล่าวเพื่อทำการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 11 ค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ ต่อแบคทีเรียทดสอบชนิดต่าง ๆ

แบคทีเรียทดสอบ	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml) <sup>a</sup>		
	KU-F2	KU-F72	KU-D1
<i>Enterococcus faecium</i> TUA 1344L	1,600	1,600	1,600
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803	3,200	3,200	1,600
<i>Lactobacillus sakei subsp. sakei</i> JCM 1157	12,800	200	1,600
<i>Lactobacillus. plantarum</i> ATCC 14917	3,200	3,200	3,200
<i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885	3,200	800	800
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	6,400	6,400	6,400

หมายเหตุ <sup>a</sup>: ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml) คำนวณจากการทำ Critical dilution assay

นอกจากนี้เมื่อศึกษากิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซินต่อจุลินทรีย์ก่อโรคที่อาจพบในผักสดหลายชนิด พบว่า สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* ได้ดี โดยเฉพาะสายพันธุ์ *L. monocytogenes* DMST 17303 ซึ่งมีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงถึง 12,800 AU/ml ดังนั้นจึงคัดเลือก *L. monocytogenes* DMST 17303 เพื่อเป็นแบคทีเรียทดสอบในการศึกษาต่อไปด้วย (ตารางที่ 12) ผลจากการศึกษานี้คล้ายคลึงกับงานวิจัยอื่นที่พบว่าแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ได้ดี เช่นงานวิจัยของ Green *et al.* (1997) พบว่า pediocin PD-1 สร้างโดยเชื้อ *Pediococcus damnosus* NCFB 1832 สามารถยับยั้งเชื้อ *L. innocua* LMG 13568 และ *L. monocytogenes* LM1 ส่วน Bennik *et al.* (1997) พบว่า pediocin PA-1 สร้างโดย *Pediococcus parvulus* ที่แยกได้จากผัก สามารถยับยั้งเชื้อ *L. innocua* WAU II, *L. innocua* WAU III, *L. innocua* DSM20649, *L. monocytogenes* WAUI, *L. monocytogenes* WAUL4492, *L. monocytogenes* DCD81-861, LCDC81-1081, *Listeria monocytogenes* WAU L028, *L. monocytogenes* Scott A WAU ได้

**ตารางที่ 12** ค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ KU-F2 ต่อแบคทีเรียก่อโรค

แบคทีเรียก่อโรค	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml) <sup>a</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303	12,800
<i>Listeria monocytogenes</i> 301	3,200
<i>Salmonella</i> Typhimurium	0
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0

หมายเหตุ <sup>a</sup>: ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml) คำนวณจากการทำ Critical dilution assay

#### 4. การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารแบคทีเรียโอซิน

จากการนำแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ KU-F2 ซึ่งคัดแยกได้จากสับปะรด และสามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ มาศึกษาหาลำดับเบสของ 16S rDNA แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล 16S rDNA ของแบคทีเรียอ้างอิงชนิดต่างๆ ในฐานข้อมูล [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ KU-F2 มีลำดับเบสของ 16S rDNA สอดคล้องกับลำดับเบสบน 16S rDNA ของ *Pediococcus pentosaceus* strain SH 740 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99% (data accession no EU878171) โดยลำดับเบสเปรียบเทียบของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ดังแสดงในภาพที่ 6 ดังนั้นจึงจัดจำแนกและกำหนดชื่อสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ KU-F2 เป็น *P. pentosaceus* KU-F2

>gb|EU878171.1| *Pediococcus pentosaceus* strain SH 740 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=1464

Score = 1537 bits (832), Expect = 0.0  
Identities = 840/844 (99%), Gaps = 2/844 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 15  CTATAC-TGCAGNTCGAACGAACCTCCGTTAATTGATTATGACGTACTTGTACTGATTGA 73
      |||
Sbjct 10  CTATACATGCAG-TCGAACGAACCTCCGTTAATTGATTATGACGTACTTGTACTGATTGA 68

Query 74  GATTTTAAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAGAAAG 133
      |||
Sbjct 69  GATTTTAAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAGAAAG 128

Query 134  TAGGGGATAAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTT 193
      |||
Sbjct 129  CAGGGGATAAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTT 188

Query 194  TCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTG 253
      |||
Sbjct 189  TCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTG 248

Query 254  GTGAGGTAAAGGCTCACC AAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAAATCGGCCAC 313
      |||
Sbjct 249  GTGAGGTAAAGGCTCACC AAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAAATCGGCCAC 308

Query 314  ATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAA 373
      |||
Sbjct 309  ATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAA 368

Query 374  TGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGC 433
      |||
Sbjct 369  TGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGC 428

Query 434  TCTGTTGTTAAAGAAGAAGCTGGGTAAGAGTAACGTGTTACCCAGTGACGGTATTTAACC 493
      |||
Sbjct 429  TCTGTTGTTAAAGAAGAAGCTGGGTAAGAGTAACGTGTTACCCAGTGACGGTATTTAACC 488

Query 494  AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTAT 553
      |||
Sbjct 489  AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTAT 548

Query 554  CCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGCTTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTT 613
      |||
Sbjct 549  CCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGCTTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTT 608

Query 614  CGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAAC TGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGG 673
      |||
Sbjct 609  CGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAAC TGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGG 668

Query 674  AACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGG 733
      |||
Sbjct 669  AACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGG 728

Query 734  CTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATA 793
      |||
Sbjct 729  CTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATA 788

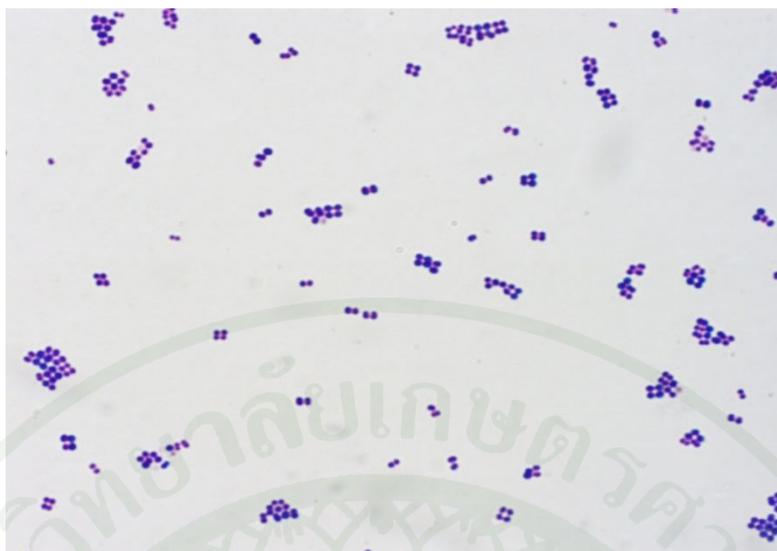
Query 794  CCCTGGTAGTCCATGCCGTANACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAG 853
      |||
Sbjct 789  CCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAG 848

Query 854  TGCT 857
      |||
Sbjct 849  TGCT 852

```

ภาพที่ 6 เปรียบเทียบลำดับเบสบน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ KU-F2 (เส้นบน) และ *Pediococcus pentosaceus* strain SH 740 (เส้นล่าง)

*Pediococcus pentosaceus* KU-F2 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม มักพบเรียงตัวเป็นคู่ (ภาพที่ 7) ไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลส เจริญบนอาหารแข็ง MRS ที่เติม bromcresol purple indicator สามารถสร้างกรดอินทรีย์และเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 7 การติดสีแกรมบวก รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์แบบ 4 เซลล์ (Tetrad) ของ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2

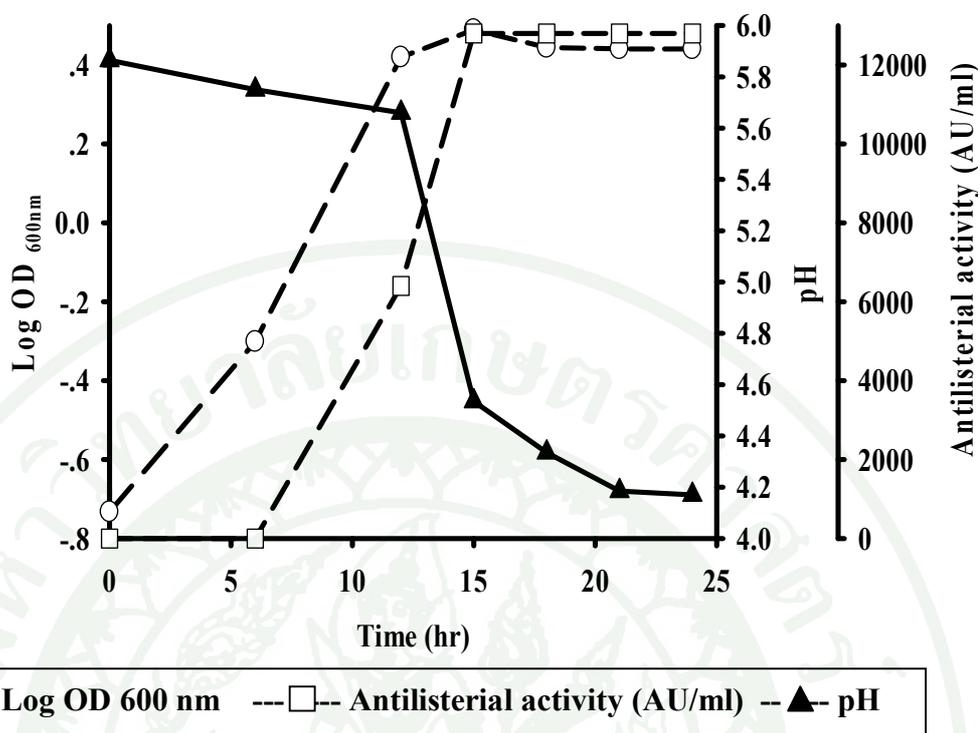


ภาพที่ 8 การเจริญของ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 บนอาหารแข็ง MRS ที่เติม bromcresol purple indicator

## 5. การศึกษารูปแบบการเจริญและการสร้างสารแบคเทอริโอซิน

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง พบว่าเชื้อจะเข้าสู่ช่วง stationary phase ประมาณชั่วโมงที่ 15 และมีการเจริญคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 24 สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างจะค่อยๆ ลดลงจาก 5.86 เป็น 4.17 ซึ่งเป็นผลจากการใช้กลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อและผลิตเป็นกรดแลคติก ส่วนการสร้างสารแบคเทอริโอซิน จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงกลางของ log period ประมาณชั่วโมงที่ 12 โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อ *L. monocytogenes* DMST 17303 เท่ากับ 6,400 AU/ml และสร้างได้สูงสุดชั่วโมงที่ 15 โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 12,800 AU/ml จากนั้นจะเข้าสู่ stationary phase และค่ากิจกรรมการยับยั้งจะคงที่ตลอด 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 9, ตารางผนวกที่ ค3) ซึ่งเมื่อดูรูปแบบการสร้างสารแบคเทอริโอซิน พบว่ามีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญเป็นแบบ primary metabolite production ในการสร้างสารแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ มักมีการสร้างแบบที่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเซลล์ จะแตกต่างจากสารปฏิชีวนะที่มักมีการสร้างแบบที่ไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญ (secondary metabolite production) (De Vuyst and Vandamme, 1994)

ผลจากการศึกษานี้คล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Green *et al.* (1997) พบว่าการสร้าง pediocin PD-1 จากเชื้อ *P. damnosus* NCFB 1832 ในช่วงต้นของการเจริญและสร้างควบคู่ไปกับการเจริญของเชื้อ นอกจากนี้ Anastasiadou *et al.* (2008a) ยังพบการสร้างสาร pediocin SA-1 จากเชื้อ *P. acidilactici* NRRL B5627 ในช่วงต้นของการเจริญ (early exponential growth) เช่นกัน



ภาพที่ 9 การเจริญและการสร้างสารแบคทีริโอซินของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะนี้

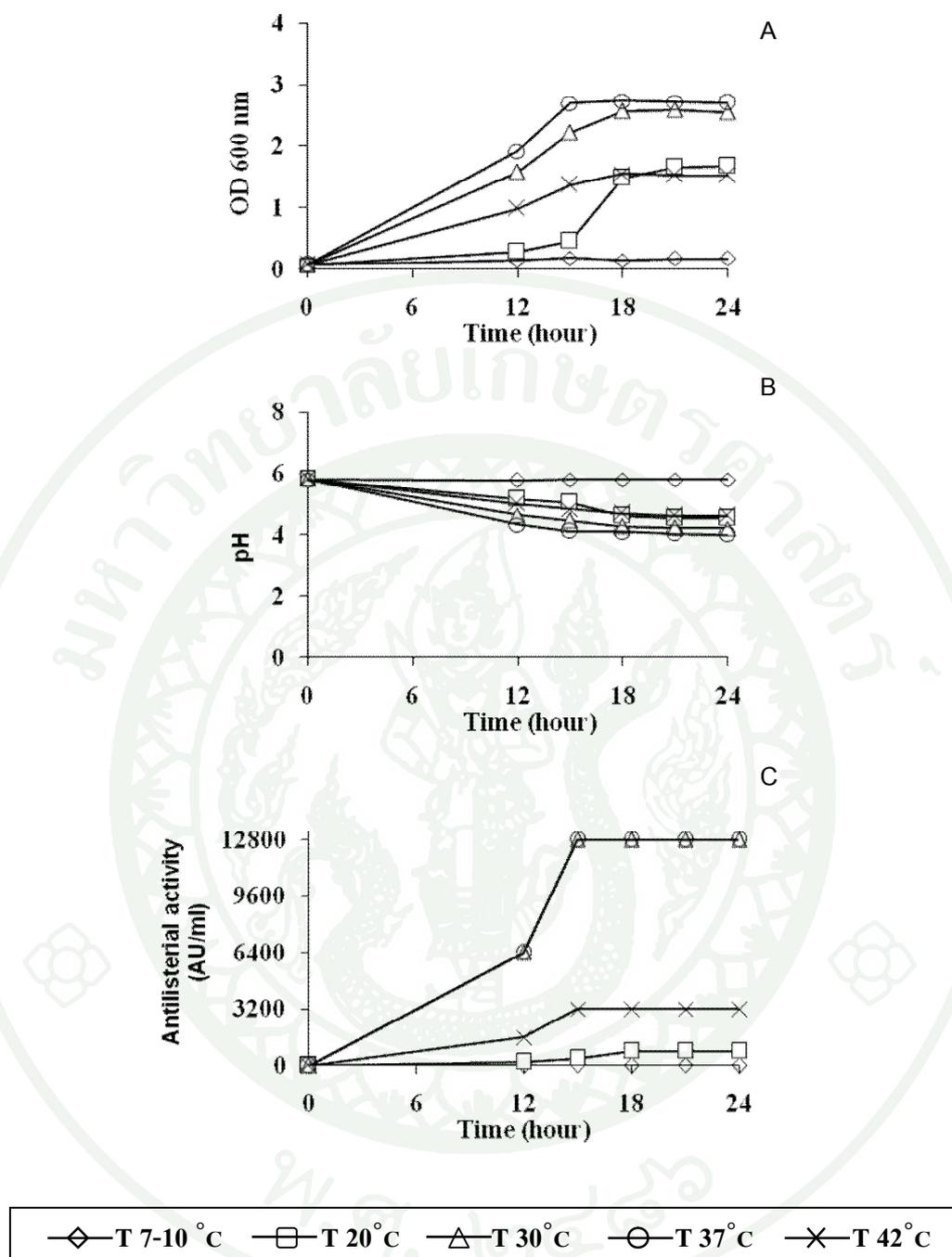
## 6. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารแบคทีริโอซิน

### 6.1 อุณหภูมิ

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารเหลว MRS และนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิตู้เย็น (7-10), 20, 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญและการสร้างสารแบคทีริโอซิน โดยเชื้อเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รองลงมาคือที่ 30, 42 และ 20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ภาพที่ 10A, ตารางผนวกที่ ค4) ส่วนที่อุณหภูมิตู้เย็นไม่พบการเจริญภายใน 24 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากการเจริญที่อุณหภูมิต่ำจะมี lag period ที่นานขึ้น เป็นที่น่าสังเกตว่า อุณหภูมิที่สูงกว่าหรือต่ำกว่าค่าที่เหมาะสม (optimum temperature) จะทำให้มีการเจริญที่ลดลงด้วย จากการศึกษาี้ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *P. pentosaceus* KU-F2 คือที่ 30-37 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ในระหว่างการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะค่อยๆ ลดลง ซึ่งเป็นผลจากกรดแลคติกที่เกิดขึ้นจาก

กระบวนการเมแทบอลิซึม โดยค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงมากที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กล่าวคือ จาก 5.80 เป็น 4.01 ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 10B) เมื่อดูผลของอุณหภูมิต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซิน พบว่าสอดคล้องกับการเจริญกล่าวคือ แม้ว่าเชื้อ *P. pentosaceus* KU-F2 จะเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างตั้งแต่ 20–42 องศาเซลเซียส แต่อัตราการเจริญจะสูงที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียส ส่วนการสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ไม่แตกต่างกัน โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 เท่ากับ 12,800 AU/ml และค่ากิจกรรมการยับยั้งจะลดลงเหลือ 800 และ 3,200 AU/ml ที่อุณหภูมิ 20 และ 42 ตามลำดับ (ภาพที่ 10C) การศึกษานี้ให้ผลคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Biswas *et al.* (1991) ที่ศึกษาการเจริญและการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *Pediococcus acidilactici* H ในอาหารเหลว TGE บ่มที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญและสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ดีที่สุด และรายงานของ Wu *et al.* (2004) พบว่าเชื้อ *P. pentosaceus* ACCEL ผลิต pediocin ได้ดีที่สุดในบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามเชื้อต่างสายพันธุ์กันอาจมีการเจริญในแต่ละอุณหภูมิแตกต่างกันด้วย เช่นการศึกษาของ Vignolo *et al.* (1995) พบว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เชื้อ *Lactobacillus casei* CRL 705 สามารถเจริญและสร้าง lactocin 705 ได้ดีกว่าที่ 30 องศาเซลเซียส ส่วนเชื้อ *Pediococcus acidilactici* LS2-30 เจริญในอาหารเหลว MRS สามารถเจริญและสร้างแบคทีเรียโอซินได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (ชุตินันท์, 2547) จากการศึกษาจึงเลือกอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษาต่อไป

เมื่อดูกราฟการเจริญในรูปแบบ Log OD 600 nm เปรียบเทียบกับกราฟการเจริญในรูปแบบ OD 600 nm (ภาพผนวกที่ ค1) นั้น มีแนวโน้มคล้ายคลึงกัน แต่กราฟ OD 600 nm จะเห็นได้ชัดเจนกว่ามาก ดังนั้นในการศึกษาผลของปัจจัยอื่นๆ ต่อการเจริญที่จะกล่าวต่อไป จะใช้กราฟ OD 600 nm ในการอธิบายผลแทนทั้งหมด

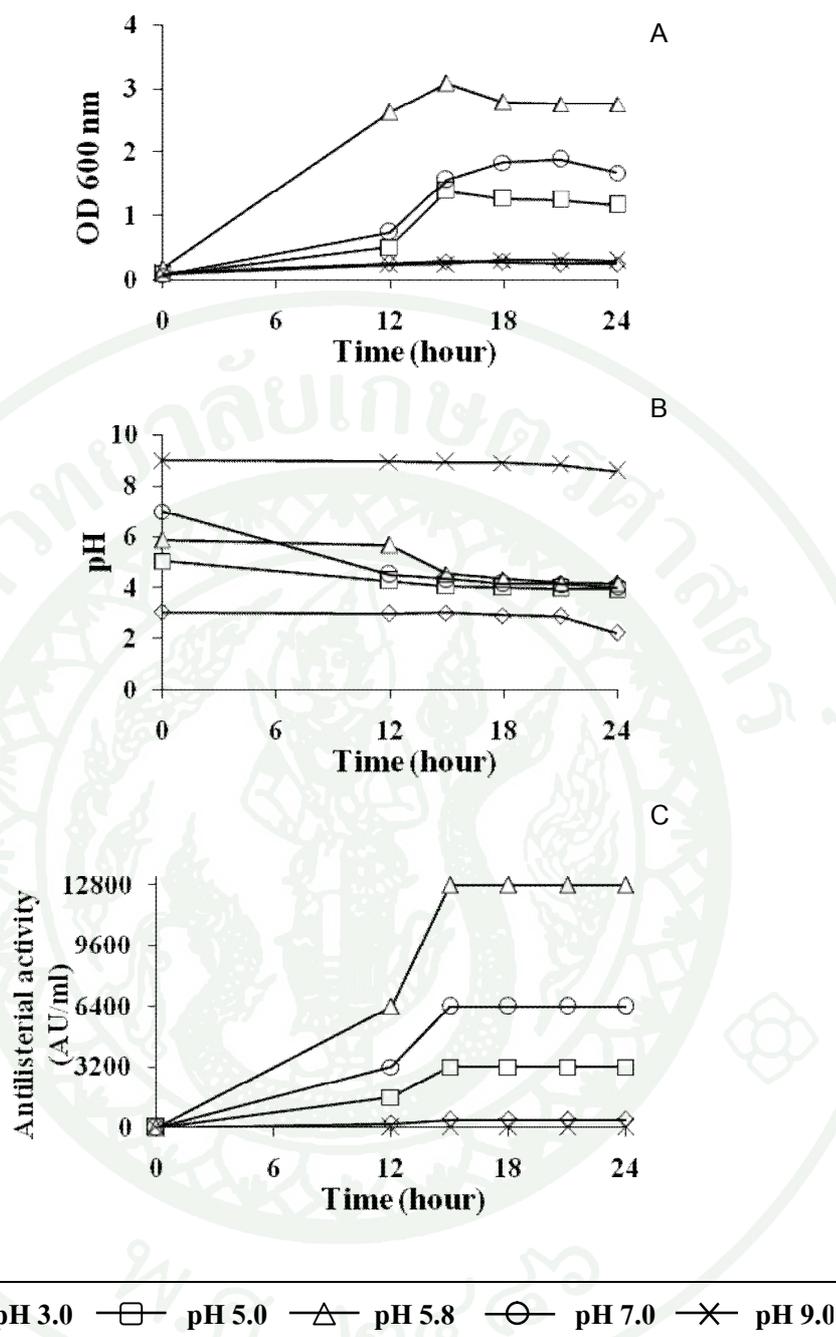


ภาพที่ 10 การเจริญและการสร้างสารแบคทีริโอซินของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารเหลว MRS เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ในสภาวะนิ่ง (A) Optical density (OD 600 nm), (B) การเปลี่ยนแปลงของค่า pH, (C) Antilisterial activity (AU/ml)

## 6.2. ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการสร้างสารแบคทีริโอซินของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหาร MRS พบว่าที่พีเอช 5.8 เชื้อเจริญดีที่สุด และการเจริญจะลดลง เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอชก่อนไปทางกรดหรือด่าง (ภาพที่ 11A, ตารางผนวกที่ ๕) โดยเฉพาะที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 9.0 พบการเจริญของเชื้อเพียงเล็กน้อย และไม่พบกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินเลย ส่วนการสร้างสารแบคทีริโอซินพบว่ามีค่ากิจกรรมของจะมีค่าสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่าพีเอช 5.8 โดยมีค่ากิจกรรมสูงสุดคือ 12,800 AU/ml ในชั่วโมงที่ 15 และค่ากิจกรรมลดลงเหลือ 3,200 และ 6,400 AU/ml เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 5 และ 7 (ภาพที่ 11C) สำหรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงตามการเจริญของเชื้อ (ภาพที่ 11B) ผลจากการลดลงของค่าพีเอช มีส่วนช่วยให้เกิดการปลดปล่อยสารแบคทีริโอซินออกนอกเซลล์ ด้วยเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการ post-translation processing ของ prebacteriocin ซึ่งจะทำงานได้ดีที่พีเอชต่ำเท่านั้น (Biswas *et al.*, 1991)

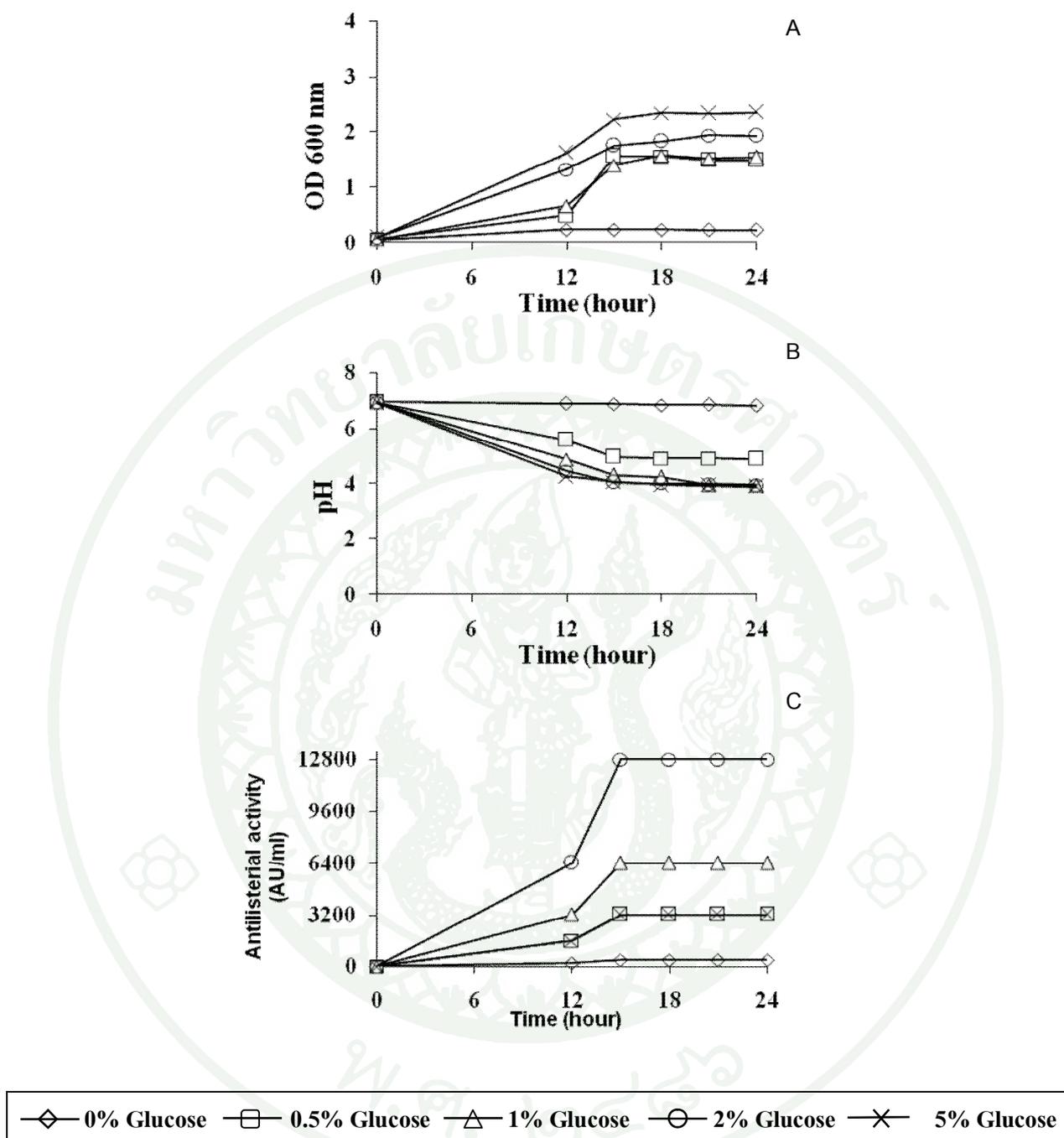
อย่างไรก็ตามเชื้อต่างสายพันธุ์กัน อาจได้รับผลกระทบจากค่าพีเอชต่างกัน Biswas *et al.* (1991) พบว่าเชื้อ *Pediococcus acidilactici* H สามารถสร้าง pediocin AcH ที่มีค่ากิจกรรม 3,600 AU/ml ในอาหารเหลว TGE ที่มีพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.5 และ Nel *et al.* (2001) พบว่า pediocin PD-1 มีค่ากิจกรรมสูงที่สุดในอาหารเหลว MRS ที่มีค่าพีเอช เริ่มต้นเป็น 6.7 ส่วน Montville and Kaiser (1993) พบว่าเชื้อ *Lactobacillus bavaricus* MN ผลิต bavaricin MN ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอช 6 ส่วน Parente and Ricciardi (1994) พบว่าเชื้อ *Enterococcus faecium* DPC 1146 ผลิต enterocin 1146 ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับค่าพีเอชเป็น 5.5



ภาพที่ 11 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการเจริญและการสร้างสารแบคทีริโอซินของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนี้ (A) Optical density (OD 600 nm), (B) การเปลี่ยนแปลงของค่า pH, (C) Antilisterial activity (AU/ml)

### 6.3 ปริมาณกลูโคส

ผลจากการศึกษาปัจจัยปริมาณกลูโคสต่อการเจริญและการสร้างแบคทีเรียโอสินของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 11A, ตารางผนวกที่ ค6) และสามารถสร้างสารแบคทีเรียโอสินที่มีค่ากิจกรรมสูงที่สุดเช่นกันคือ 12,800 AU/ml (ภาพที่ 11C) และค่ากิจกรรมจะลดลงเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของกลูโคสต่ำหรือสูงกว่าความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งจากผลการศึกษานี้ สอดคล้องกับการทดลองของ Vignolo *et al.* (1995) พบว่า *Lactobacillus casei* CRL 705 สามารถสร้างแบคทีเรียโอสินได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ โดยแบคทีเรียโอสินมีค่ากิจกรรม 1,066 AU/ml อย่างไรก็ตาม Biswas *et al.* (1991) พบว่าเชื้อ *Pediococcus acidilactici* H สามารถเจริญและสร้างแบคทีเรียโอสินที่มีค่ากิจกรรมสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว TGE ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ โดยสารแบคทีเรียโอสินที่เชื้อสร้างมีค่ากิจกรรม 3,600 AU/ml และ Ogunbanwo *et al.* (2003) พบว่าเชื้อ *Lactobacillus brevis* OG1 สามารถสร้างแบคทีเรียโอสินที่มีค่ากิจกรรมสูงที่สุดในอาหารเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ และสารแบคทีเรียโอสินมีค่ากิจกรรม 6,400 AU/ml สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช ในสภาวะที่มีกลูโคส จะมีการสร้างกรดแลคติกทำให้ค่าพีเอชลดต่ำลง (ภาพที่ 11B) แต่ในสภาวะที่ไม่มีกลูโคส จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชเลย



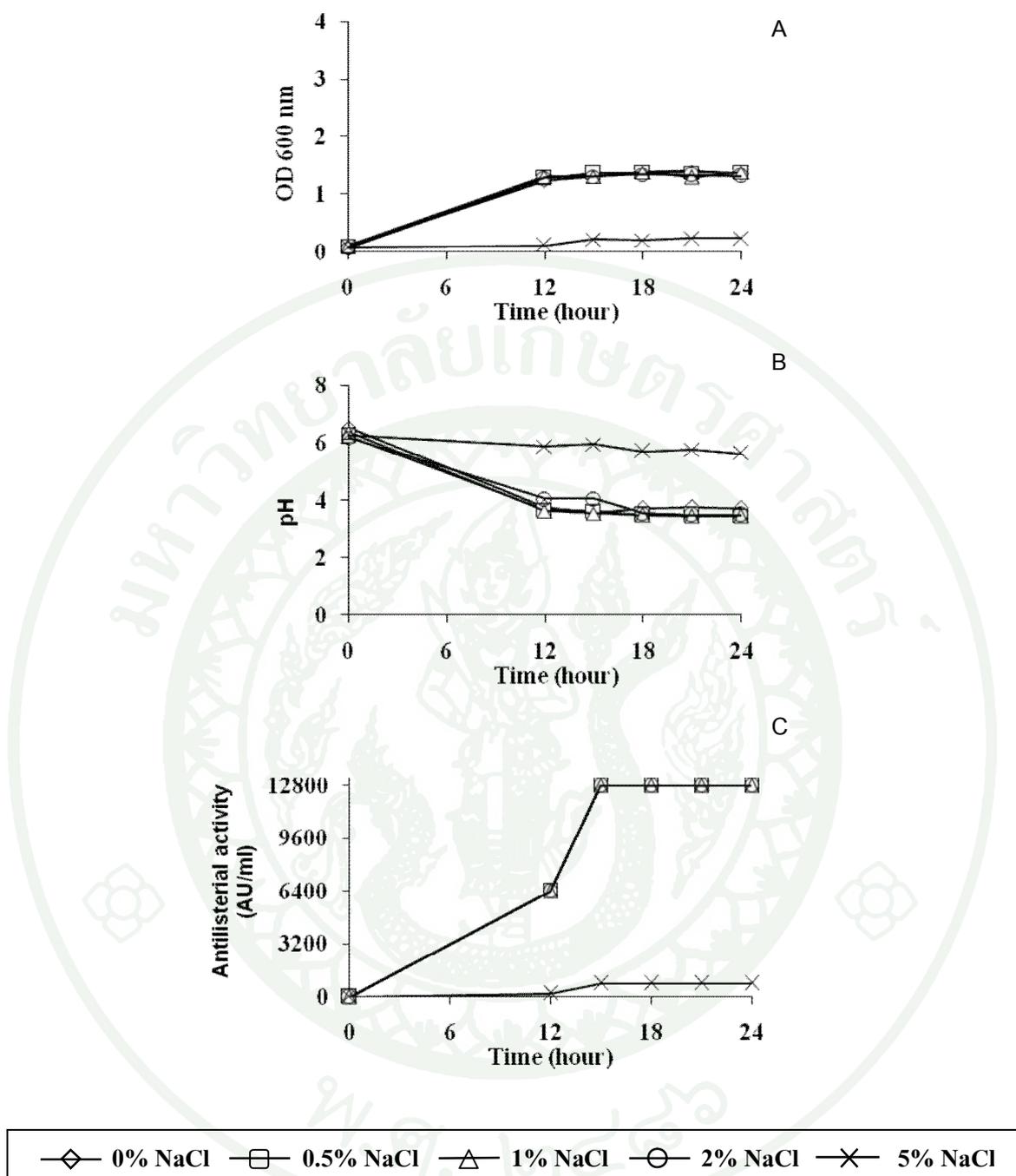
ภาพที่ 12 ผลของปริมาณกลูโคสต่อการเจริญและการสร้างสารแบคทีริโอซินของเชื้อ

*Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสถานะนิ่ง (A) Optical density (OD 600 nm), (B) การเปลี่ยนแปลงของค่า pH, (C) Antilisterial activity (AU/ml)

#### 6.4 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์

เมื่อศึกษาการเจริญของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมเกลือที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 0.5, 1, 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณเกลือ 0-2 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีผลกระทบต่อ การเจริญของเชื้อ *P. pentosaceus* KU-F2 แต่ในอาหารที่มีปริมาณเกลือสูงถึง 5 เปอร์เซ็นต์ การเจริญจะลดลง (ภาพที่ 12A, ตารางผนวกที่ ๑๗) ส่วนการสร้างสารแบคทีเรียโอซินพบว่า เชื้อสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ดีในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมเกลือ 0-2 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่ากิจกรรมสูงสุดคือ 12,800 AU/ml และค่ากิจกรรมจะลดลงเหลือ 800 AU/ml (ภาพที่ 12C) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่มีเกลือ 0-2 เปอร์เซ็นต์ เชื้อสามารถเจริญและใช้น้ำตาลผลิตเป็นกรดแลคติกทำให้ค่าพีเอชลดต่ำลง ในขณะที่สภาวะที่มีเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ เชื้อเจริญได้ไม่คืบคั้น การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชจึงน้อยกว่า (ภาพที่ 12B)

ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซินมีรายงานกับเชื้อ *E. faecium* NKR-5-3 พบว่าค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหาร โดยเชื้อสามารถเจริญและสร้างแบคทีเรียโอซินได้ดีในอาหารที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ 0-1 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียโอซินมีค่ากิจกรรม 12,800 AU/ml (พงษ์เทพ, 2546) ซึ่งแตกต่างจากเชื้อ *Lactobacillus brevis* OG1 และ *Lactobacillus casei* CRL 705 ซึ่งเจริญและสร้างแบคทีเรียโอซินได้ดีในอาหารที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ 1-2 เปอร์เซ็นต์ (Ogunbanwo *et al.*, 2003; Vignolo *et al.*, 1995) จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ส่งผลกระทบต่อ การสร้างแบคทีเรียโอซิน ทั้งนี้สภาวะที่มีเกลือในปริมาณสูง อาจมีผลต่อค่า osmotic pressure ของอาหาร ทำให้เชื้อสามารถเจริญได้น้อยลง อีกทั้งเกลือโซเดียมคลอไรด์ยังมีคุณสมบัติเป็น antimicrobial อีกด้วย ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าปัจจัยใดมีผลกระทบต่อ การเจริญของเชื้อจะมีผลกระทบต่อ การสร้างสารยับยั้งด้วย



ภาพที่ 13 ผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการสร้างสารแบคทีริโอซินของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสถานะนิ่ง (A) Optical density (OD 600 nm), (B) การเปลี่ยนแปลงของค่า pH, (C) Antilisterial activity (AU/ml)

## 7. การสกัดแยกสารแบคทีเรียโอสิน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 1 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสามารถสร้างสารแบคทีเรียโอสินและปลดปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อโดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 เท่ากับ 12,800 AU/ml หลังจากการสกัดแยกโดยวิธี hydrophobic adsorption บน Amberlite XAD-16 และทำการชะสารแบคทีเรียโอสินที่ดูดซับบนผิว amberlite โดยใช้ isopropanol 70 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ค่ากิจกรรมการยับยั้งมีค่าเพิ่มขึ้น 4 เท่า เป็น 51,200 AU/ml (ตารางที่13 และ ภาพที่13) อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการดูดซับด้วย amberlite แล้วยังพบค่ากิจกรรมการยับยั้งอยู่บ้าง (1,600 AU/ml) อาจเป็นไปได้ว่าปริมาณของ amberlite ที่ใช้น้อยเกินไปไม่เพียงพอที่จะดูดซับสารแบคทีเรียโอสินได้ทั้งหมด หรืออาจต้องเพิ่มระยะเวลาการบ่มเพื่อให้สารแบคทีเรียโอสินดูดซับได้มากขึ้น ส่วนในขั้นตอนของการล้างเม็ดเรซินเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนออกโดยใช้น้ำหรือสารละลายเอทานอล อาจทำให้สารแบคทีเรียโอสินบางส่วนหลุดออกมาด้วย จึงตรวจพบค่ากิจกรรมการยับยั้งบ้าง (3,200 AU/ml) แต่สารแบคทีเรียโอสินส่วนใหญ่ยังคงดูดซับอยู่บน amberlite และจะถูกชะออกโดยสารละลาย isopropanol 70 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสารแบคทีเรียโอสินที่สกัดแยกได้จะนำไปศึกษาคุณสมบัติต่อไป

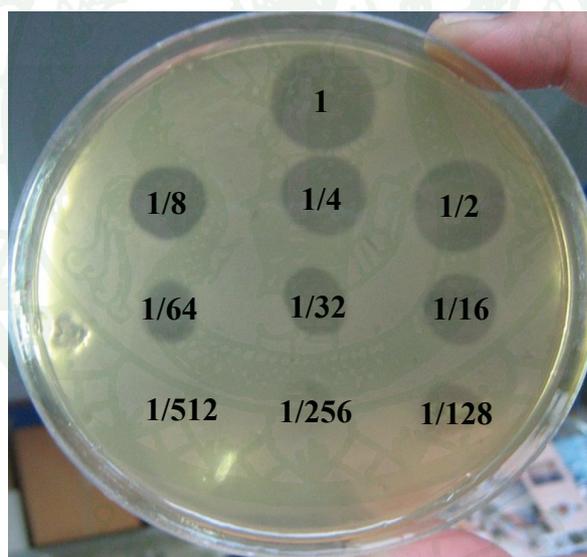
อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการศึกษาปริมาณโปรตีน จึงไม่สามารถคำนวณค่า specific activity และ yield ของสารแบคทีเรียโอสินได้

ผลจากการศึกษานี้คล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Jumriagrit (2004) ที่ใช้ Amberlite XAD-16 ในการดูดซับแบคทีเรียโอสินที่ผลิตโดย *L. plantarum* PMU33 และทำการชะสารแบคทีเรียโอสินออกด้วย 2-propanol 70 เปอร์เซ็นต์ พบว่าค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอสินเพิ่มขึ้น 2 เท่า จาก 3,200 AU/ml เป็น 6,400 AU/ml เช่นเดียวกับ Pilasombut (2006) ทำการดูดซับแบคทีเรียโอสินที่สร้างจากเชื้อ *L. salivarius* K4 ด้วย Amberlite XAD-16 และชะสารออกด้วย isopropanol 70 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสม 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA) พบว่าค่ากิจกรรมของสารแบคทีเรียโอสินเพิ่มขึ้น 4 เท่า โดยเพิ่มขึ้นจาก 3,200 AU/ml เป็น 12,800 AU/ml

ตารางที่ 13 ค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินที่สกัดได้ในขั้นตอนต่างๆ<sup>b</sup>

ขั้นตอนการสกัด	Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>
Cell Free Supernatant	12,800
Filtrate after amberlite adsorption	1,600
Filtrate after washed amberlite with distilled water	3,200
Filtrate after washed amberlite with 40% ethanol	3,200
Elution by 70% isopropanol+0.1% TFA	51,200
Partially Purified Bacteriocin in PO <sub>4</sub> buffer pH 5.7	51,200

หมายเหตุ <sup>a</sup>: *Listeria monocytogenes* DMST 17303 was used as an indicator strain.

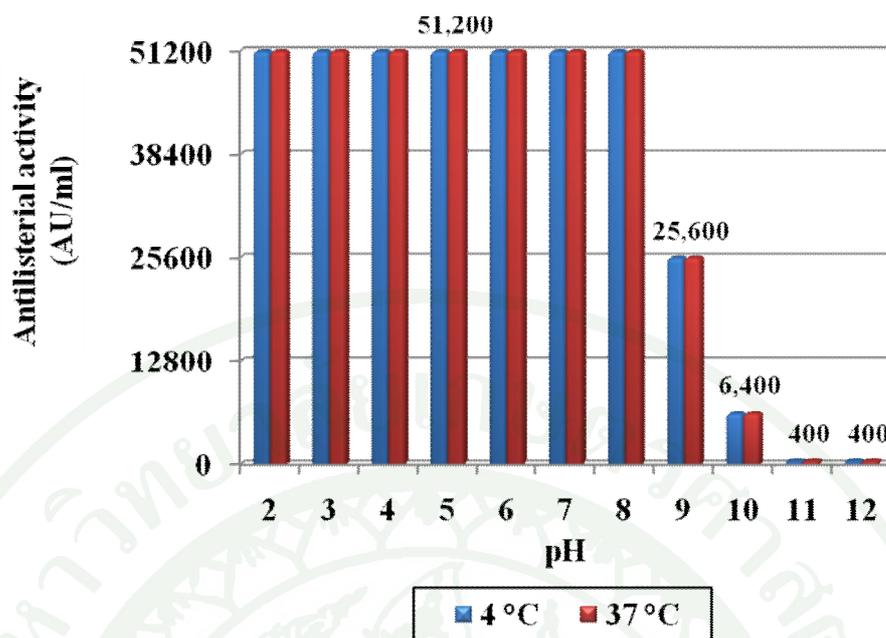


ภาพที่ 14 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินโดยวิธี Critical dilution assay

## 8. การศึกษาคุณสมบัติของสารแบคทีริโอซิน

### 8.1 ความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH 2.0-12.0)

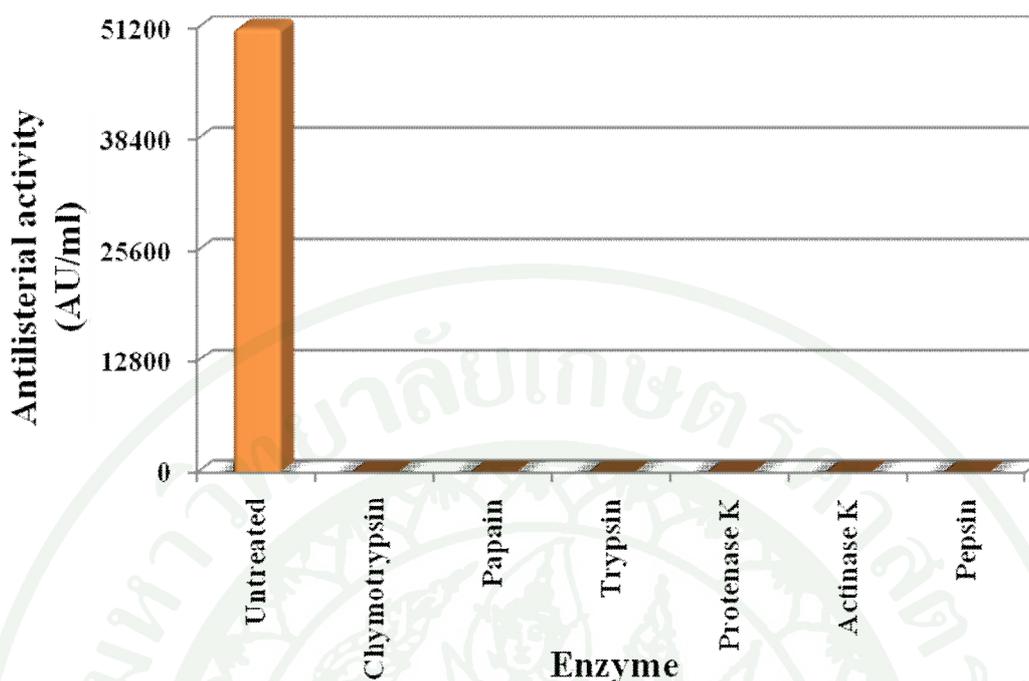
เมื่อนำ partially purified bacteriocin ที่ได้จากข้อ 7 มาศึกษาความเสถียรต่อค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ (pH 2-12) และบ่มที่อุณหภูมิ 4 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าสารแบคทีริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *P. pentosaceus* KU-F2 มีความเสถียรในช่วง pH 2-8 โดยยังคงมีค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 เท่ากับ 51,200 AU/ml และค่ากิจกรรมการยับยั้งจะลดลงที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง มากกว่า 9 แสดงว่าสารแบคทีริโอซินนี้มีความเสถียรที่สภาวะกรดมากกว่าสภาวะด่าง ทั้งที่อุณหภูมิ 4 และ 37 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 15) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mandal *et al.* (2008) ซึ่งพบว่า สารแบคทีริโอซินที่สร้างโดย *P. acidilactici* LAB 5 มีความเสถียรที่ pH 2-8 นอกจากนี้ Huang *et al.* (2009) พบว่าสาร pediocin 05-10 ที่ผลิตโดยเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* 05-10 มีความเสถียรที่ pH 2-8 และค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินจะลดลงที่ pH 10-12 เช่นเดียวกัน จะเห็นได้ว่าสารแบคทีริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Pediococcus* หลายๆ สายพันธุ์ ไม่มีความเสถียรที่สภาวะด่าง เช่น pediocin N5p จากเชื้อ *P. pentosaceus* มีความเสถียรที่ pH 2-5 และค่ากิจกรรมของสารแบคทีริโอซินจะลดลงเรื่อยๆ ตั้งแต่ pH 6 และค่ากิจกรรมจะสูญเสียไปที่ pH 10 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Strasser *et al.*, 1995) ส่วน pediocin PA-1 จากเชื้อ *P. parvulus* ค่ากิจกรรมจะเสถียรที่ pH 1-6 และค่ากิจกรรมจะลดลงที่ pH 7 (Bennik *et al.*, 1997) แต่แบคทีริโอซินบางชนิดอาจเสถียรในสภาวะที่เป็นด่างได้ เช่น pediocin ST-18 จากเชื้อ *P. pentosaceus* ST-18 เสถียรในสภาวะที่มี pH 2-12 (Todorov and Dicks, 2005) จากการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่า สารแบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *P. pentosaceus* KU-F2 มีความเสถียรต่อความเป็นกรด-ด่างในช่วงกว้าง (pH 2-8) ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์เป็น biopreservative ในอาหารหมัก หรืออาหารประเภทอื่นๆ



ภาพที่ 15 ความเสถียรของสารแบคทีริโอซินที่ผลิตโดย *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ต่อค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ

## 8.2 การทนต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน

จากการศึกษาผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อสารแบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 พบว่าสารแบคทีริโอซินจะสูญเสียคุณสมบัติในการยับยั้งไปอย่างสมบูรณ์ เมื่อบ่มรวมกับเอนไซม์  $\alpha$ -chymotrypsin, proteinase K, trypsin, actinase K, pepsin และ papain (ภาพที่ 16) แสดงว่าสารแบคทีริโอซินมีโครงสร้างเป็นสารประเภทโปรตีนจึงถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ซึ่งสอดคล้องกับคำจำกัดความของสารแบคทีริโอซิน ที่เป็นสารโปรตีนที่สร้างจากไรโบโซม และมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (De Vuyst and Vandamme, 1994) ผลจากการศึกษานี้คล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Bennik *et al.* (1997) ที่พบว่าสาร pediocin PA-1 ที่สร้างจาก *Pediococcus parvulus* จะสูญเสียประสิทธิภาพไปเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin, pepsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, papain, protease IX และ proteanase K นอกจากนี้ Anastasiadou (2008b) ยังพบว่า pediocin SM-1 ซึ่งสร้างจาก *Pediococcus pentosaceus* Mees 1934 จะสูญเสียสภาพเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin, papain, trypsin, proteinase K และ  $\alpha$ -chymotrypsin เช่นกัน



ภาพที่ 16 ความเสถียรของสารแบคทีริโอซินที่ผลิตโดย *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ต่อ เอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่าง ๆ

### 8.3 ความเสถียรต่อความร้อน

เมื่อนำสารแบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 มาทำการศึกษาความเสถียรต่อความร้อนระดับต่างๆ พบว่าสามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่การพาสเจอร์ไรส์ที่ 63 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หรือการต้มเดือดที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตลอดจนการฆ่าเชื้อแบบสเตอริไลส์ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยสารแบคทีริโอซินยังคงมีค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 เท่ากับ 51,200 AU/ml (ตารางที่ 14) ผลจากการศึกษานี้คล้ายคลึงกับสาร pediocin F ที่ผลิตจากเชื้อ *P. acidilactici* F ซึ่งมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Osmanagaoglu *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังพบว่ามีแบคทีริโอซินบางชนิดยังคงมีความเสถียรถึงแม้ว่าจะอยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงๆ เป็นเวลานาน เช่น pediocin SA-1 และ SM-1 ที่ผลิตจากเชื้อ *P. acidilactici* NRRL B5627 และ *P. pentosaceus* Mees 1934 ตามลำดับ มีความเสถียรที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (Anastasiadou *et al.*, 2008a; 2008b) และ pediocin ST-18 ที่ผลิตจากเชื้อ

*P. pentosaceus* ST-18 มีความเสถียรที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (Todorov and Dicks, 2005)

คุณสมบัตินี้แสดงให้เห็นถึงการนำไปใช้ประโยชน์ของสารแบคทีเรียโอซินในอาหารที่ต้องผ่านกระบวนการแปรรูปโดยใช้ความร้อน ประสิทธิภาพของการยับยั้งเชื้อปนเปื้อนจะยังไม่ถูกทำลายไป

จากผลการทดลองในข้อ 8.1-8.3 แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับแบคทีเรียโอซินใน Class II คือ Peptide bacteriocins เนื่องจากแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้สามารถถูกทำลายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่างๆ และทนต่อความร้อนได้สูงถึง 121 องศาเซลเซียส

**ตารางที่ 14** ความเสถียรของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ต่อความร้อนระดับต่าง ๆ

Heat Treatment	Residual Activity (AU/ml) <sup>a</sup>
Untreated	51,200
63°C 30 นาที	51,200
100°C 15 นาที	51,200
121°C 15 นาที	51,200

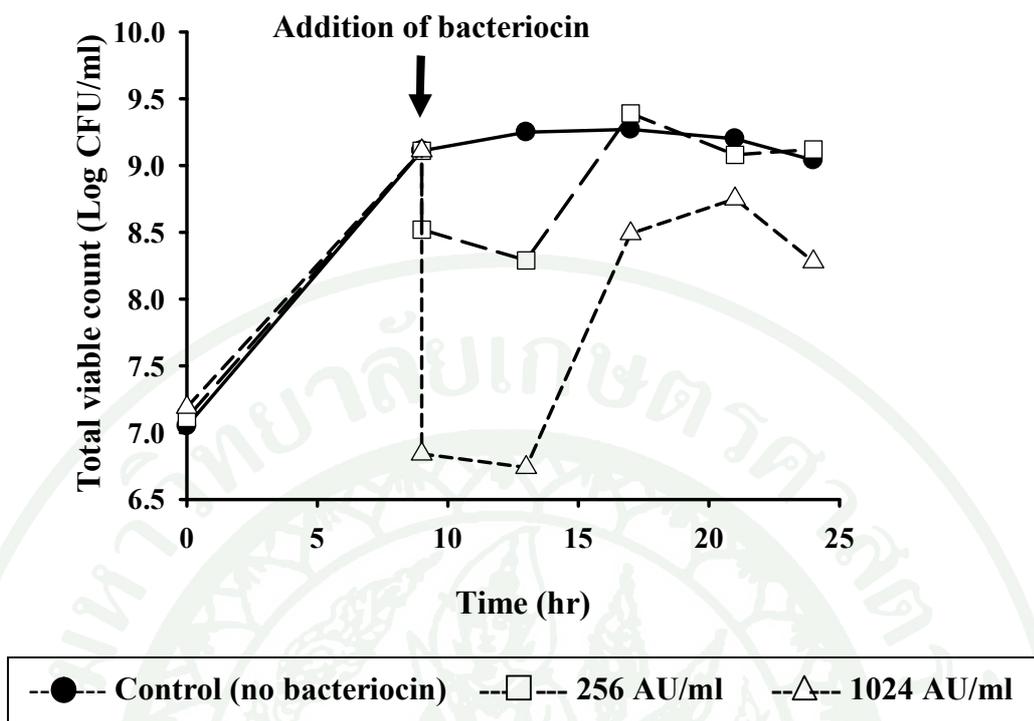
หมายเหตุ <sup>a</sup>: *Listeria monocytogenes* DMST 17303 was used as an indicator strain.

#### 8.4 อายุการเก็บ

สารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสได้นานมากกว่า 10 เดือน โดยที่ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบไม่มีการเปลี่ยนแปลง (51,200 AU/ml) ซึ่งจากผลการทดลองนี้คล้ายคลึงกับ pediocin SM-1 ที่สร้างจากเชื้อ *P. pentosaceus* Mees 1934 ซึ่งค่ากิจกรรมยังคงไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี (Anastasiadou *et al.*, 2008b) ซึ่งจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นความเป็นไปได้ต่อการนำไปใช้งานจริง

## 8.5 รูปแบบการทำลาย

จากการศึกษารูปแบบการทำลายเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 พบว่าในสถานะที่ยังไม่ได้เติมสารแบคทีเรียโอซิน *L. monocytogenes* DMST 17303 สามารถเจริญในอาหาร TSBYE ได้ดีโดยที่ชั่วโมงที่ 9 มีปริมาณเซลล์สูงถึง 9.11 Log CFU/ml แต่เมื่อเติมสารแบคทีเรียโอซิน ความเข้มข้น 1,024 และ 256 AU/ml ลงไปเป็นเวลา 1-2 นาทีและวิเคราะห์ปริมาณเซลล์อีกครั้งพบว่าปริมาณเซลล์ลดลงทันที 2.2 และ 0.6 Log CFU/ml ตามลำดับ แสดงว่าเป็นการทำลายในลักษณะ bactericidal (ภาพที่ 17, ตารางผนวกที่ ค8) และเมื่อเวลาผ่านไปอีก 3 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ลดลงอีกเพียงเล็กน้อยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 26 และ 9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากชั่วโมงที่ 15 เซลล์สามารถปรับตัวและเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นมาได้อีกครั้ง แสดงว่าสารแบคทีเรียโอซินที่เติมลงไปนั้นไม่เพียงพอที่จะทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ที่มีปริมาณสูงประมาณ  $10^9$  CFU/ml ได้หมด แต่ทำลายได้เพียงประมาณ 2.4 และ 0.82 logCFU/ml ที่ความเข้มข้น 1,024 และ 256 AU/ml ตามลำดับ อย่างไรก็ตามถ้าปริมาณเชื้อเริ่มต้นน้อยกว่านี้ รูปแบบการทำลายแบบ bactericidal อาจเห็นได้ชัดเจนขึ้น ซึ่งคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Jamuna and Jeevaratnam (2004) ที่ศึกษากลไกการทำลายของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *P. acidilactici* NCIM 2292, *P. pentosaceus* NCIM 2296 และ *P. cerevisiae* NCIM 2171 ต่อเชื้อ *S. aureus* ที่เจริญในอาหารเหลว TSB และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าการทำลายเซลล์เป็นแบบ bactericidal เช่นเดียวกันกับรายงานวิจัยของ Huang *et al.* (2009) ที่พบว่า pediocin 05-10 ที่สร้างจากเชื้อ *P. pentosaceus* 05-10 สามารถทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* 54002 จาก  $4.5 \times 10^8$  CFU/ml เหลือเพียง  $4.4 \times 10^5$  CFU/ml ภายหลังจากเติมสารแบคทีเรียโอซิน 2 ชั่วโมง แต่สารแบคทีเรียโอซินบางชนิดอาจเป็นได้ทั้ง bactericidal และ bacteriostatic เช่น แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *P. pentosaceus* Iz3.13 (Bagenda *et al.*, 2008)



ภาพที่ 17 รูปแบบการทำลายเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร TSBYE และเติมสารแบคทีริโอซินที่ผลิตโดย *Pediococcus pentosaceus* KU-F2

### 9. การศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในผักสลัดพร้อมบริโภค

จากตัวอย่างผักสลัดพร้อมบริโภคทั้งหมด 102 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria* spp. 22 ตัวอย่าง คิดเป็น 21.6 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างผักสลัดทั้งหมดที่นำมาศึกษา ซึ่งส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างผักสลัดที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน ส่วนผักสลัดที่ผ่านการให้ความร้อนแล้วจำนวน 11 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อ *Listeria* spp.ปนเปื้อนเลย เนื่องจากเชื้อชนิดนี้ไม่ทนความร้อนและสามารถถูกทำลายได้ แม้เพียงความร้อนระดับพาสเจอร์ไรส์ อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้สามารถตรวจพบ *L. monocytogenes* ด้วยเช่นกันกล่าวคือพบใน 2 ตัวอย่างของกะหล่ำปลีหั่นฝอย โดยคิดเป็น 8.0 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างกะหล่ำปลีทั้งหมดที่นำมาศึกษา (ตารางที่ 15, ภาพที่ 18)

เมื่อดูจากลักษณะเฉพาะของโคโลนี *L. monocytogenes* บนอาหาร Chromocult-listeria agar จะพบโคโลนีที่มีสีฟ้าและมีโซนขุนขาวล้อมรอบ (ภาพที่ 18) ส่วนลักษณะเฉพาะของโคโลนี *L. innocua* บนอาหารชนิดเดียวกัน จะมีสีฟ้าแต่ไม่มีโซนขุนขาวล้อมรอบ เป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอย่าง

ผักสดที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน สามารถตรวจพบ *Listeria* spp. ได้โดยเฉพาะถ้าผ่านการล้างทำความสะอาดไม่ดีพอ จะเห็นได้จากตัวอย่างผักสดประเภทใบ เช่น ผักกาดแก้ว และ ผักกาดหอม จะมีความบอบบางและอาจชำรุดหรือเสียหายได้ถ้าผ่านการล้างมากเกินไป หรือผักสดประเภทกะหล่ำปลีหั่นฝอย อาจล้างสิ่งปนเปื้อนที่อยู่ด้านนอกสุดได้ แต่ใบที่อยู่ด้านในจะล้างได้ค่อนข้างยาก อีกทั้งการหั่นฝอยยังเป็นการเพิ่มการปนเปื้อนถ้าอุปกรณ์และภาชนะที่ใช้ทำความสะอาดไม่ดีพอ เนื่องจากเชื้อ *Listeria* spp. สามารถอยู่รอดในสิ่งแวดล้อมทั่วไปได้เป็นเวลานาน และการหั่นฝอยยังทำให้สารอาหารในผักไหลออกมา ทำให้เชื้อปนเปื้อนสามารถใช้ในการเจริญต่อไปได้ เป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ที่นำมาศึกษาพบการปนเปื้อนของ *L. innocua* สูงถึง 21.6 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าเชื้อสายพันธุ์นี้จะไม่ก่อให้เกิดโรค แต่มีลักษณะการเจริญคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค คือ *L. monocytogenes* อีกทั้งแหล่งปนเปื้อนของ *L. innocua* และ *L. monocytogenes* มักพบในแหล่งเดียวกัน (อดิสรและปรีชา, 2538)

ถึงแม้ว่าในประเทศไทยยังไม่พบรายงานระบาดวิทยาของเชื้อ *L. monocytogenes* ที่เกิดจากการบริโภคอาหารหรือผักสด แต่พบว่ามีผู้ป่วยจากโรค listeriosis บ้าง เช่น Rusemeechan (1994) พบผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *L. monocytogenes* จำนวน 2 ราย เป็นเพศชาย ประกอบอาชีพเกษตรกร มีอาการติดเชื้อในกระแสเลือด และพบเชื้อหุ้มสมองอักเสบ และเสียชีวิตเนื่องจากระบบหายใจล้มเหลวนอกจากนี้ Treebupachatsakul (2006) พบผู้ป่วยเป็นฝืนในสมองจากเชื้อ *L. monocytogenes* จำนวน 1 ราย เป็นเพศหญิง อายุ 23 ปี ประกอบอาชีพเป็นคนงานในโรงงานผลิตกึ่งส่งออก ผู้ป่วยมีประวัติว่าป่วยเป็นโรคเกล็ดเลือดต่ำ (immune thrombocytopenic purpura, ITP) ต้องรักษาโดยใช้ยาไตรเมโทปริม-ซัลฟาเมทอกซาโซล เป็นเวลา 12 เดือน จึงจะมีอาการดีขึ้น ซึ่งผู้ป่วยรายนี้เป็นผู้ป่วยฝืนในสมองจากเชื้อ *L. monocytogenes* รายแรกของประเทศไทย

ในการศึกษานี้พบ *L. monocytogenes* ในตัวอย่างผักสดพร้อมบริโภคประเภทกะหล่ำปลีหั่นฝอย สูงถึง 8.0 เปอร์เซ็นต์ แสดงถึงความเป็นไปได้ในการก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ ถ้าเชื่อดังกล่าวมีการเพิ่มจำนวนในระหว่างการขาย หรือการสุขาภิบาลของแหล่งผลิตไม่ดีพอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผักสดพร้อมบริโภคอาจเป็นอาหารที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยง ถ้าผู้บริโภคเป็นบุคคลกลุ่มเสี่ยงด้วย อาทิ เช่น สตรีมีครรภ์ คนชรา เด็ก และผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง

ตารางที่ 15 การปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria* spp. ในผักสดพร้อมบริโภคชนิดต่าง ๆ

ตัวอย่างผัก/ผลไม้	จำนวนตัวอย่าง ที่ศึกษา	จำนวนตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนของ	
		<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>
<b>1. ผักสดที่ผ่านการให้ความร้อน</b>			
มันฝรั่ง	2	-	-
ข้าวโพด	3	-	-
เฟือก	1	-	-
ฟักทอง	1	-	-
ผักกาดหัว	4	-	-
<b>2. ผักสดสด</b>			
แครอท	1	-	-
มะเขือเทศ	7	-	-
มะเขือเทศราชินี	1	-	-
บิทรูท	1	1	-
พริกหยวก	3	1	-
ผักกาดหอม	4	2	-
ผักกาดแก้ว	5	2	-
หอมหัวใหญ่	5	2	-
กะหล่ำปลีหั่นฝอย	25	7	2
กะหล่ำปลีม่วงหั่นฝอย	6	1	-
แตงกวา	30	5	-
<b>3. ผลไม้</b>			
แคนตาลูป	3	1	-
รวม	102	22 (21.6%) <sup>1</sup>	2 (8.0%) <sup>2</sup>

หมายเหตุ <sup>1</sup>: เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด

<sup>2</sup>: เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างกะหล่ำปลีหั่นฝอย



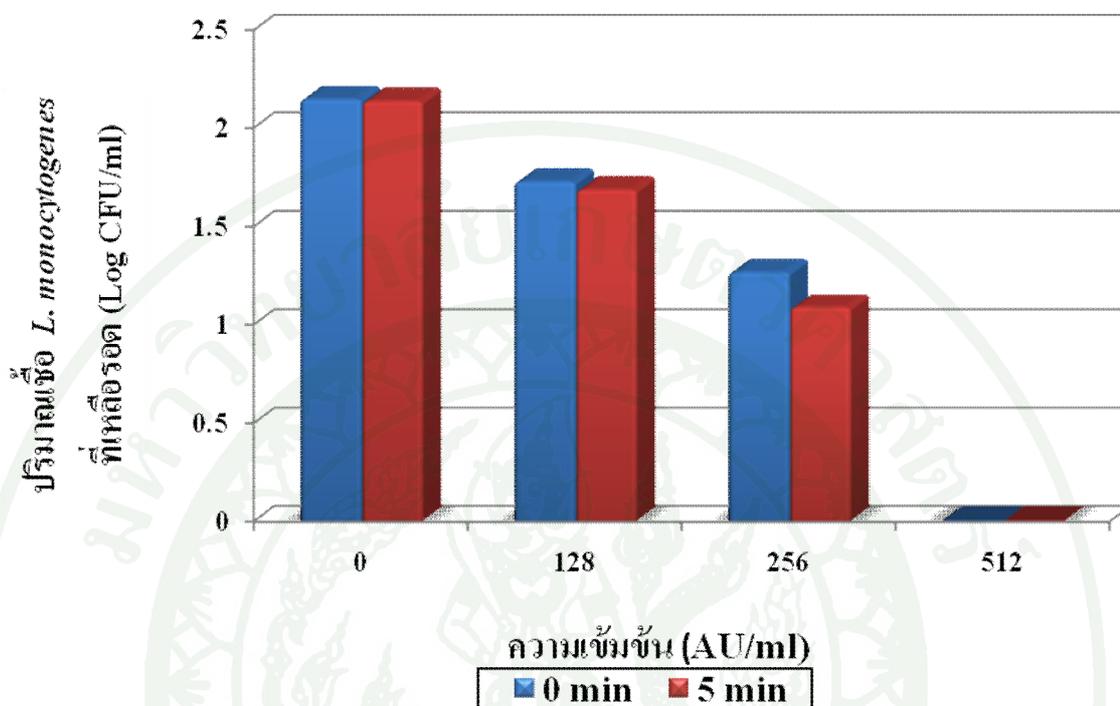
ภาพที่ 18 ลักษณะเฉพาะของโคโลนี *Listeria monocytogenes* บนอาหาร Chromocult-Listeria Agar

## 10. การทดสอบประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303

### 10.1 การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารแบคทีริโอซินในการยับยั้งเชื้อ

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ในอาหารเหลว TSBYE บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และทำการเจือจางปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 2.15 log CFU/ml จากนั้นเติมสารแบคทีริโอซินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 128, 256 และ 512 AU/ml เก็บตัวอย่างที่ 0 และ 5 นาที พบว่า หลังจากเติมสารแบคทีริโอซินความเข้มข้น 128 AU/ml สามารถลดปริมาณเชื้อได้เพียง 0.43 log CFU/ml คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทิ้งไว้นาน 5 นาที สามารถลดปริมาณเชื้อเพิ่มอีกเล็กน้อยเป็น 0.47 log CFU/ml คิดเป็น 21.86 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าระยะเวลาที่นานขึ้นจะส่งผลต่อการลดปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นด้วย แต่เชื้อส่วนใหญ่ถูกทำลายตั้งแต่ที่สัมผัสกับสารแบคทีริโอซิน และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารแบคทีริโอซินเป็น 256 AU/ml สามารถลดปริมาณเชื้อได้ 0.88 และ 1.06 log CFU/ml ที่ 0 และ 5 นาที คิดเป็น 40.93 และ 49.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงว่าความเข้มข้นของสารแบคทีริโอซินที่เพิ่มขึ้นจะลดปริมาณเชื้อได้เพิ่มขึ้น ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารแบคทีริโอซินเป็น 512 AU/ml สามารถลดปริมาณเชื้อได้ทั้งหมด

100 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 0 และ 5 นาที (ภาพที่ 19, ตารางผนวกที่ ค9) ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของสารแบคทีริโอซิน 512 AU/ml เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะใช้ในการศึกษาต่อไป

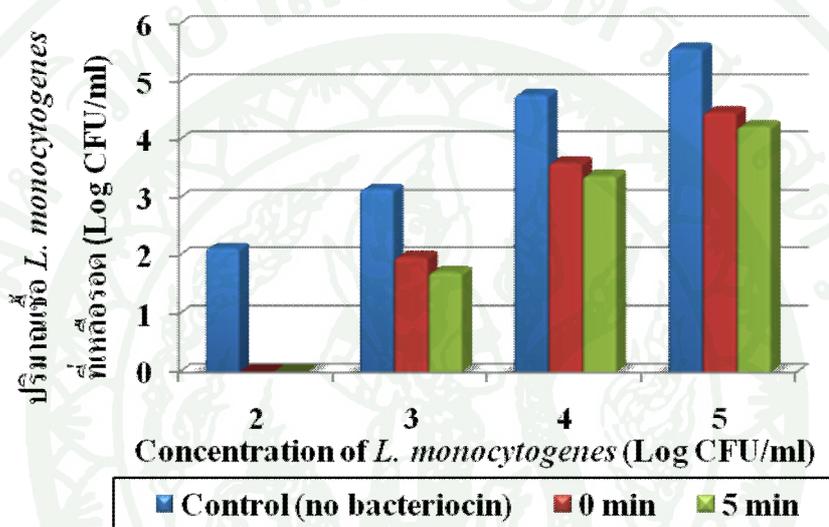


ภาพที่ 19 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ในอาหารเหลว TSBYE ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้น  $10^2$  CFU/ml และเติมสารแบคทีริโอซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และระยะเวลาต่างๆ

## 10.2 การหาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมต่อการยับยั้งด้วยสารแบคทีริโอซิน

จากการทดลองในข้อ 10.1 ความเข้มข้นของสารแบคทีริโอซิน 512 AU/ml เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ปริมาณ 2 Log CFU/ml ได้ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาว่าถ้าปริมาณเชื้อมากกว่านี้ สารแบคทีริโอซินความเข้มข้น 512 AU/ml จะยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้หรือไม่ พบว่า ที่ปริมาณเซลล์ของ *L. monocytogenes* DMST 17303 เท่ากับ 2.13 Log CFU/ml สารแบคทีริโอซินความเข้มข้น 512 AU/ml สามารถทำลายเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ แต่ที่ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 3.16, 4.79 และ 5.59 Log CFU/ml ประสิทธิภาพของการยับยั้งจะลดลง โดยสามารถลดปริมาณเชื้อได้เพียง 1.18, 1.17 และ 1.10 Log CFU/ml, ตามลำดับ (ภาพที่ 20, ตารางผนวกที่ ค10) ที่เวลา 0 นาที ส่วนที่เวลา 5 นาที ปริมาณเซลล์จะลดลงอีกเป็น 1.44, 1.39 และ 1.34 Log CFU/ml ดังนั้นถ้าต้องการลดการปนเปื้อน

ของเชื้อที่มีปริมาณเซลล์สูงกว่า  $10^2$  CFU/ml อาจจำเป็นต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารแบคทีริโอซินด้วย จากการทดลองนี้พบว่าเมื่อเติมสารแบคทีริโอซินลงไป การยับยั้งจะเกิดขึ้นทันที และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการแช่อีก 5 นาที การยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งจากการศึกษาในข้อ 10.1 และ 10.2 จะเห็นได้ว่าสารแบคทีริโอซินที่มีค่ากิจกรรม 512 AU/ml มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ที่มีปริมาณเซลล์ประมาณ  $10^2$  CFU/ml

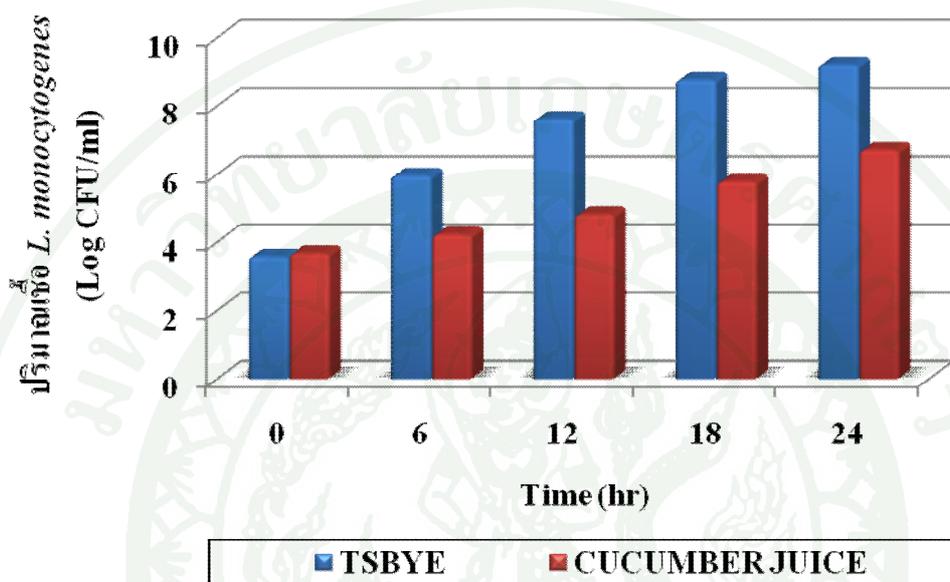


ภาพที่ 20 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นระดับต่างๆ และเติมสารแบคทีริโอซินที่ความเข้มข้น 512 AU/ml เป็นเวลา 0 และ 5 นาที

#### 11. การศึกษาการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ในน้ำผักปลอดเชื้อ

จากการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ในตัวอย่างผักสลัดพร้อมบริโภคในข้อ 9 พบว่าตัวอย่างดังกล่าวพบการปนเปื้อนของ *L. innocua* ถึง 17 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะมีการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ร่วมด้วย ถ้ามีการเก็บตัวอย่างมาศึกษามากกว่านี้ ดังนั้น จึงเลือกดังกล่าวเป็นต้นแบบของผักสลัดพร้อมบริโภคในการศึกษาต่อไป โดยทำการศึกษาการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ในน้ำคั้นดังกล่าว เปรียบเทียบกับอาหารสังเคราะห์ TSBYE พบว่า ในอาหาร TSBYE เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยมีปริมาณเซลล์สูงสุด 9.23 Log CFU/ml ส่วนในน้ำคั้นดังกล่าวปลอดเชื้อ ปริมาณเซลล์สูงสุดเพียง

6.72 Log CFU/ml แม้ว่าการเจริญในน้ำแดงกวาปลอดเชื้อจะน้อยกว่าในอาหารเหลว TSBYE แต่เชื้อสามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ถึง 3 Log CFU/ml ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 21, ตารางผนวกที่ ค11) ดังนั้นเป็นที่น่าสนใจว่า ถ้ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* ในแดงกวาสด เชื้อนี้อาจเพิ่มจำนวนได้ในระหว่างการวางขายและก่อให้เกิดปัญหาอาหารเป็นพิษได้



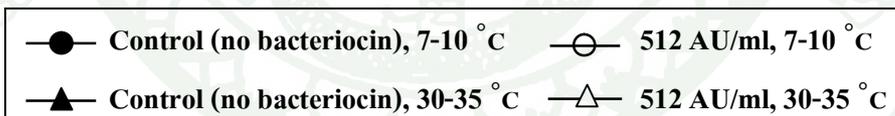
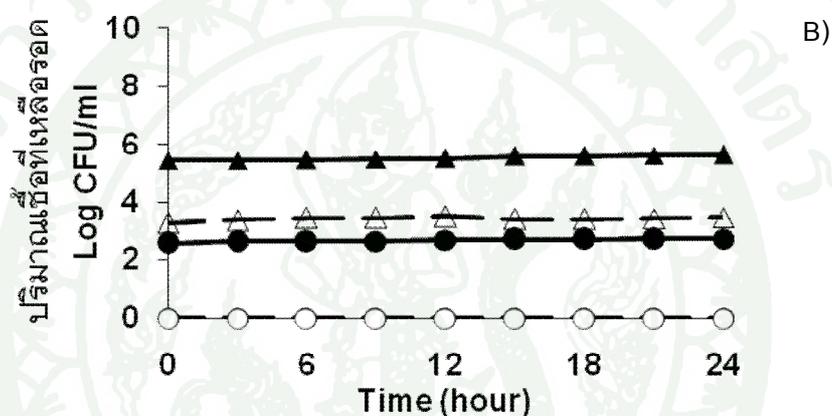
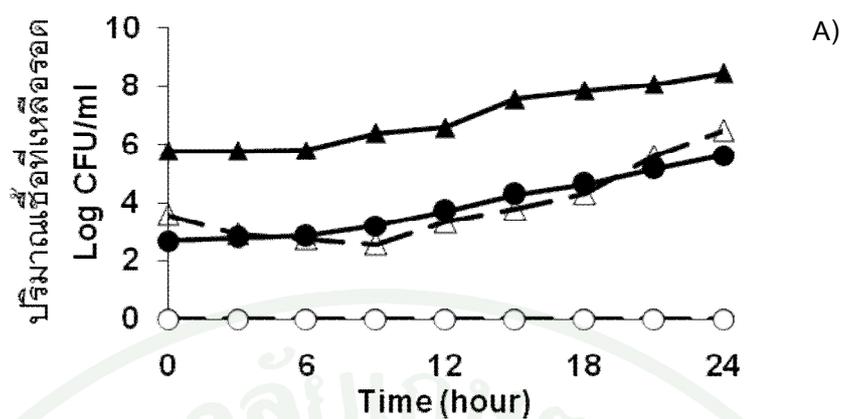
ภาพที่ 21 การเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ในอาหาร TSBYE และ น้ำแดงกวาปลอดเชื้อ ที่ช่วงเวลาต่างๆ

## 12. การศึกษาประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซินในการยับยั้งเชื้อในน้ำแดงกวาปลอดเชื้อ

เมื่อเติมสารแบคทีริโอซินความเข้มข้น 512 AU/ml ในน้ำแดงกวาปลอดเชื้อที่มีปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 เริ่มต้นประมาณ 2 และ 5 Log CFU/ml และนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่ำ (7-10 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) พบว่าสารแบคทีริโอซินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดี ถ้าปริมาณเซลล์เริ่มต้นอยู่ในระดับต่ำ (ประมาณ 2 Log CFU/ml) คือสามารถยับยั้งได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ทันทีหลังจากเติมสารแบคทีริโอซิน และคงอยู่ตลอดระยะเวลาการบ่ม 24 ชั่วโมงไม่ว่าที่อุณหภูมิตู้เย็นหรือที่อุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 22A, ตารางผนวกที่ ค12) ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่เติมสารแบคทีริโอซิน ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้น 2.94 Log CFU/ml เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิตู้เย็น ปริมาณเชื้อไม่เพิ่มขึ้นแต่อย่างใด แสดงว่า lag period ที่อุณหภูมิตู้เย็นจะนานกว่า 24 ชั่วโมง ส่วน

การทดลองที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระดับสูง (ประมาณ 5 log CFU/ml) สารแบคทีเรียโอสินสามารถลดปริมาณเชื้อได้เพียงประมาณ 2 Log cycle ทั้งที่อุณหภูมิสูงและอุณหภูมิห้อง และเชื้อที่เหลือรอดสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนต่อได้อีกเมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 22B, ตารางผนวกที่ ค13) ส่วนที่อุณหภูมิสูงการเจริญของเชื้อที่เหลือรอดจะช้ากว่าเห็นได้จากปริมาณเชื้อที่คงที่ตลอดระยะเวลาการบ่ม 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ แต่ lag period อาจจะนานกว่า 24 ชั่วโมง ดังนั้นถ้าเพิ่มระยะเวลาการเก็บนานกว่านี้เชื้ออาจจะสามารถเจริญได้ในภายหลัง

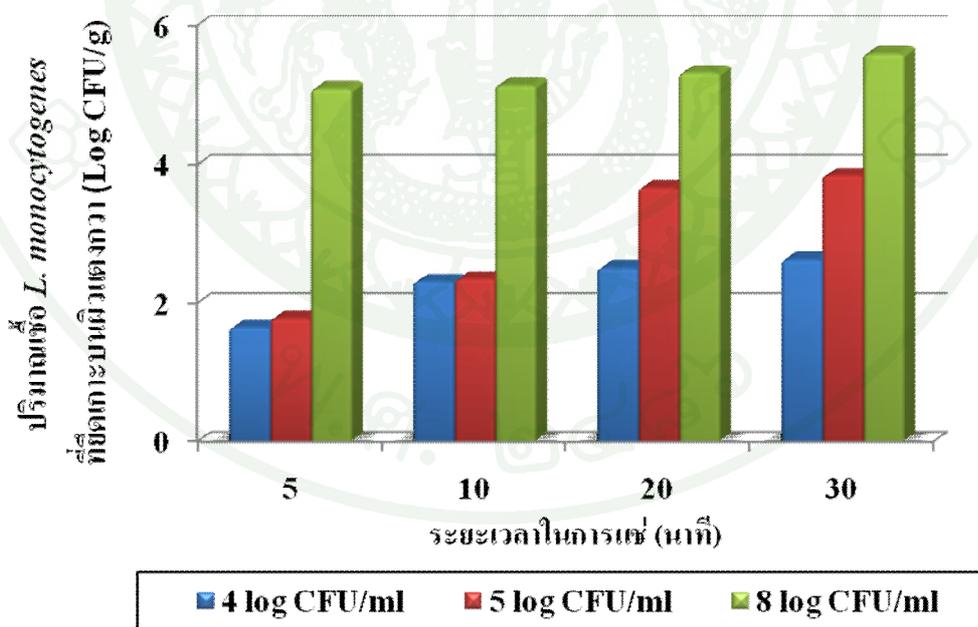




ภาพที่ 22 ประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซิน ความเข้มข้น 512 AU/ml ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ในน้ำแดงกวางปลอดเชื้อเมื่อมีปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระดับ 2 log CFU/ml (ต่ำ, A) และ 5 log CFU/ml (สูง, B) และบ่มที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-10 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส)

### 13. การศึกษาระยะเวลาในการเกาะของเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 บนผิวแตงกวาสด

เมื่อจำลองการปนเปื้อนเทียมเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 บนผิวแตงกวาสด โดยนำแตงกวาสดปอกเปลือกและหั่นเป็นท่อนขนาด  $25 \pm 1$  กรัม แช่ในสารละลายเซลล์ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ระยะเวลาในการแช่ รวมทั้งปริมาณเซลล์เริ่มต้น มีผลต่อการยึดเกาะของเชื้อบนผิวแตงกวา กล่าวคือ ในระยะเวลาที่เท่ากัน ถ้าแช่ในสารละลายเซลล์ที่มีปริมาณเชื้อมากกว่า การยึดเกาะจะเพิ่มขึ้นด้วย (ภาพที่ 23, ตารางผนวกที่ ค14) ในการศึกษาครั้งนี้ การแช่ด้วยระยะเวลา 5 นาทีในสารละลายเซลล์เข้มข้น  $10^4$ - $10^5$  CFU/ml การยึดเกาะบนผิวแตงกวาจะน้อยกว่า 2 Log CFU/g ส่วนที่สารละลายเซลล์  $10^8$  CFU/ml เชื้อสามารถยึดเกาะได้สูงถึง 5 Log CFU/g แต่ถ้าเพิ่มระยะเวลาการแช่ให้นานขึ้นเป็น 10, 20 และ 30 นาที การยึดเกาะจะเพิ่มขึ้นตามลำดับ อย่างไรก็ตามการแช่นาน 20 นาทีไม่แตกต่างจากการแช่นาน 30 นาที แต่การแช่นานเกินไปอาจทำให้น้ำซึมเข้าไปในผิวแตงกวาและอาจทำให้ลักษณะทางกายภาพเสียไป เช่น บวมน้ำ ดังนั้นจึงเลือกระยะเวลาที่ 20 นาทีในการจำลองการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 บนผิวแตงกวาในการศึกษาต่อไป

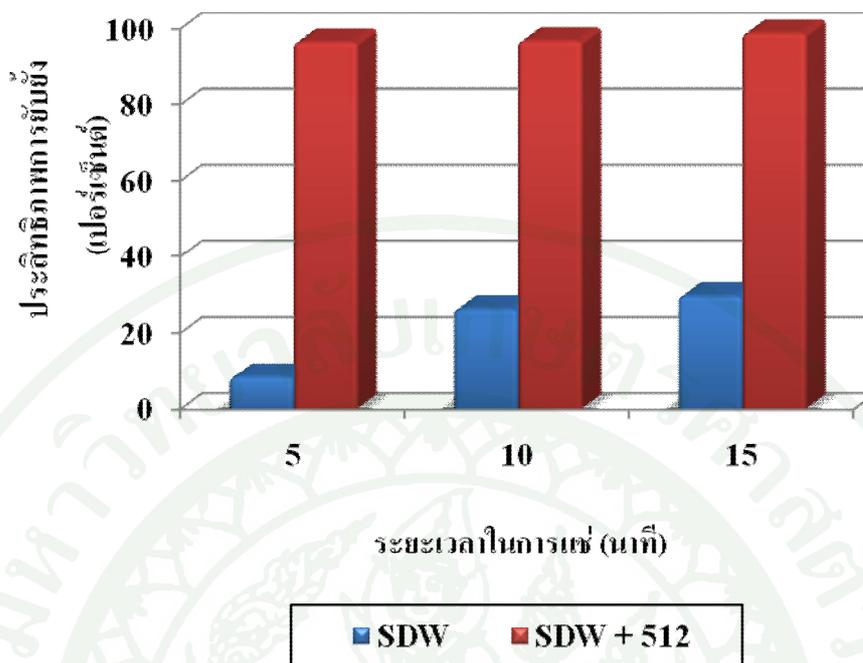


ภาพที่ 23 การยึดเกาะของเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 บนผิวแตงกวาสดเมื่อแช่ในสารละลายเซลล์ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกัน

#### 14. การศึกษาระยะเวลาของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 บนผิวแตงกวาสด

ในการศึกษานี้ได้ประยุกต์สารแบคทีเรียโอซินในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (SDW) จากนั้นนำแตงกวาสดที่มีการปนเปื้อนเทียมด้วยเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ในปริมาณ  $2.77 \log \text{CFU/g}$  มาแช่เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที เพื่อดูประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อบนผิวแตงกวา พบว่า ถ้าแช่แตงกวาที่มีการปนเปื้อนเทียมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ไม่ได้เติมสารแบคทีเรียโอซิน เป็นเวลา 5 นาที ประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 มีเพียง 8.50 เปอร์เซ็นต์ และจะลดลงเพิ่มขึ้นเป็น 27 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่นานขึ้นเป็นเวลา 10 และ 15 นาที ทั้งนี้ปริมาณเชื้อบนผิวแตงกวาส่วนนี้อาจหลุดออกมาอยู่ในน้ำที่แช่เนื่องจากสามารถตรวจพบเชื้อปริมาณ  $2.14 \log \text{CFU/ml}$  ในน้ำแช่ที่ไม่ได้เติมสารแบคทีเรียโอซิน ซึ่งเชื่อเหล่านี้อาจมีโอกาสดูดซับบนผิวแตงกวาได้อีกถ้าแช่แตงกวาต่อไป แต่สำหรับการแช่แตงกวาที่มีการปนเปื้อนเทียมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมสารแบคทีเรียโอซิน (SDW+512) เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที พบว่าสารแบคทีเรียโอซินมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อได้ถึง 96.6, 96.9 และ 98.97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 24, ตารางผนวกที่ ค15) และตรวจไม่พบเชื้อในน้ำที่ผ่านการแช่แตงกวา ถึงแม้ว่าเชื้อจะหลุดจากผิวแตงกวามาอยู่ในน้ำ ก็สามารถถูกทำลายได้โดยสารแบคทีเรียโอซินที่ละลายอยู่ในน้ำ แสดงว่าสารแบคทีเรียโอซินที่เติมลงไปมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อทั้งที่อยู่บนผิวแตงกวาและที่หลุดออกมาอยู่ในน้ำ จากผลการทดลองนี้เลือกการแช่ที่ 5 นาที ในการศึกษาต่อไป เพื่อรักษาสภาพทางกายภาพของแตงกวาไม่ให้เกิดการบวมน้ำมากเกินไป

ในการศึกษานี้พบว่า ปริมาณเซลล์เริ่มต้นบนผิวแตงกวาเท่ากับ  $2.77 \log \text{CFU/g}$  ซึ่งมากกว่าในการทดลองข้อที่ 10.1 และ 10.2 ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเพียง  $2.13 \log \text{CFU/ml}$  ดังนั้นทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งไม่ถึง 100 % อีกประการหนึ่งการทดลองในข้อ 10.1 และ 10.2 ศึกษาในอาหารเหลว ทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งดีกว่าในการทดลองนี้ ซึ่งศึกษาในแตงกวาสด ที่การยึดเกาะของเซลล์บนผิวแตงกวา อาจขึ้นกับลักษณะทางกายภาพของแตงกวาด้วย



ภาพที่ 24 ประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซินความเข้มข้น 512 AU/ml ในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่ปนเปื้อนเทียมบนผิวแดงกวาสดที่ระยะเวลาการแช่ต่างๆ (SDW = Sterile distilled water, SDW+512 AU/ml = Sterile distilled water + bacteriocin activity 512 AU/ml)

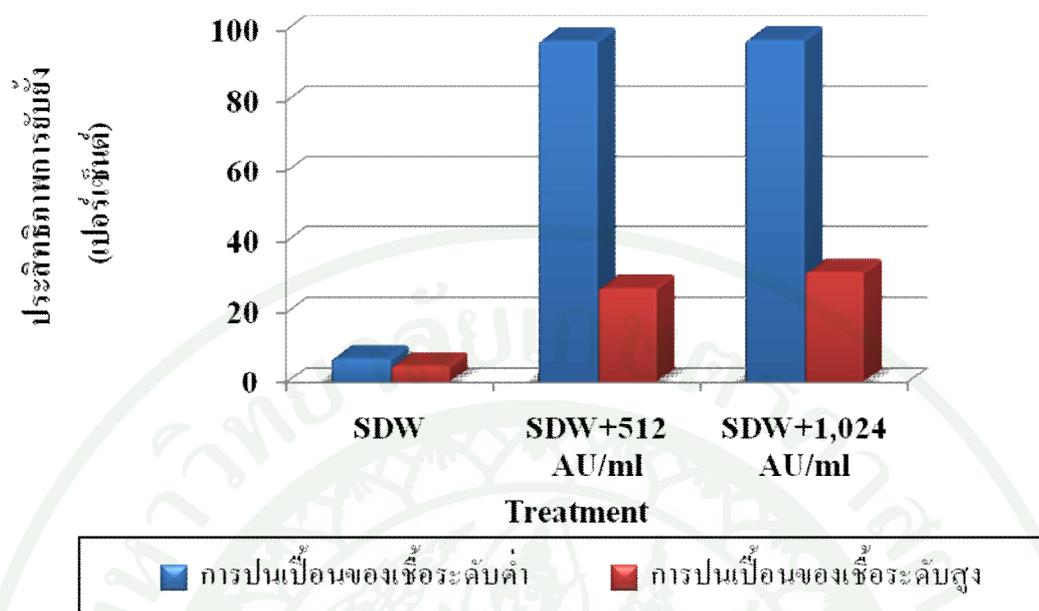
#### 15. การประยุกต์สารแบคทีริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 บนผิวแดงกวาสดที่มีการปนเปื้อนเทียม

15.1 การศึกษาประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ที่มีการปนเปื้อนเทียมในระดับต่ำและระดับสูงและผลต่ออายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น

เมื่อนำแดงกวาสดที่มีการปนเปื้อนเทียมด้วยเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ในระดับต่ำและระดับสูงมาแช่ในสารละลายน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมสารแบคทีริโอซินความเข้มข้น 512 และ 1,024 AU/ml พบว่าถ้าการปนเปื้อนอยู่ในระดับต่ำ (2.88 LogCFU/g) ประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซินสามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้สูงถึง 97.03 และ 97.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่แดงกวาสดที่มีการปนเปื้อนระดับสูง (5.64 Log CFU/g)

ประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซินสามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้เพียง 26.95 และ 31.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 25, ตารางผนวกที่ ค16) อย่างไรก็ตามการยับยั้งในสถานะที่มีสารแบคทีเรียโอซินยังคงมีประสิทธิภาพดีกว่าการล้างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ไม่ได้เติมสารแบคทีเรียโอซิน ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้เพียง 6.94 และ 4.96 เปอร์เซ็นต์ ที่การปนเปื้อนระดับต่ำและสูง ตามลำดับ

นอกจากนี้เมื่อนำแตงกวาทั้งหมดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายต่างๆ ไปบ่มที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนับปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ที่เพิ่มขึ้น พบว่า ในชุดควบคุม ที่ไม่ผ่านการล้างในสารละลายใดๆเลย ปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 เพิ่มขึ้น 0.67 และ 1.67 Log CFU/g สำหรับแตงกวาที่มีการปนเปื้อนในระดับ 2.88 และ 5.64 Log CFU/g ส่วนแตงกวาที่ผ่านการล้างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ไม่ได้เติมสารแบคทีเรียโอซิน ปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ที่เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับชุดควบคุมทั้ง 2 กรณี คิดเป็นปริมาณเชื้อที่เพิ่มขึ้น 24 และ 34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่แตงกวาที่ผ่านการล้างในสารละลายน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมสารแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรม 512 และ 1,024 AU/ml หลังจากเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 7 วัน ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และบางกรณีเชื้อลดลง แสดงว่าสารแบคทีเรียโอซินที่ดูดซับอยู่บนผิวแตงกวายังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่อไปด้วย (ภาพที่ 26A และ 26B, ตารางผนวกที่ ค17)



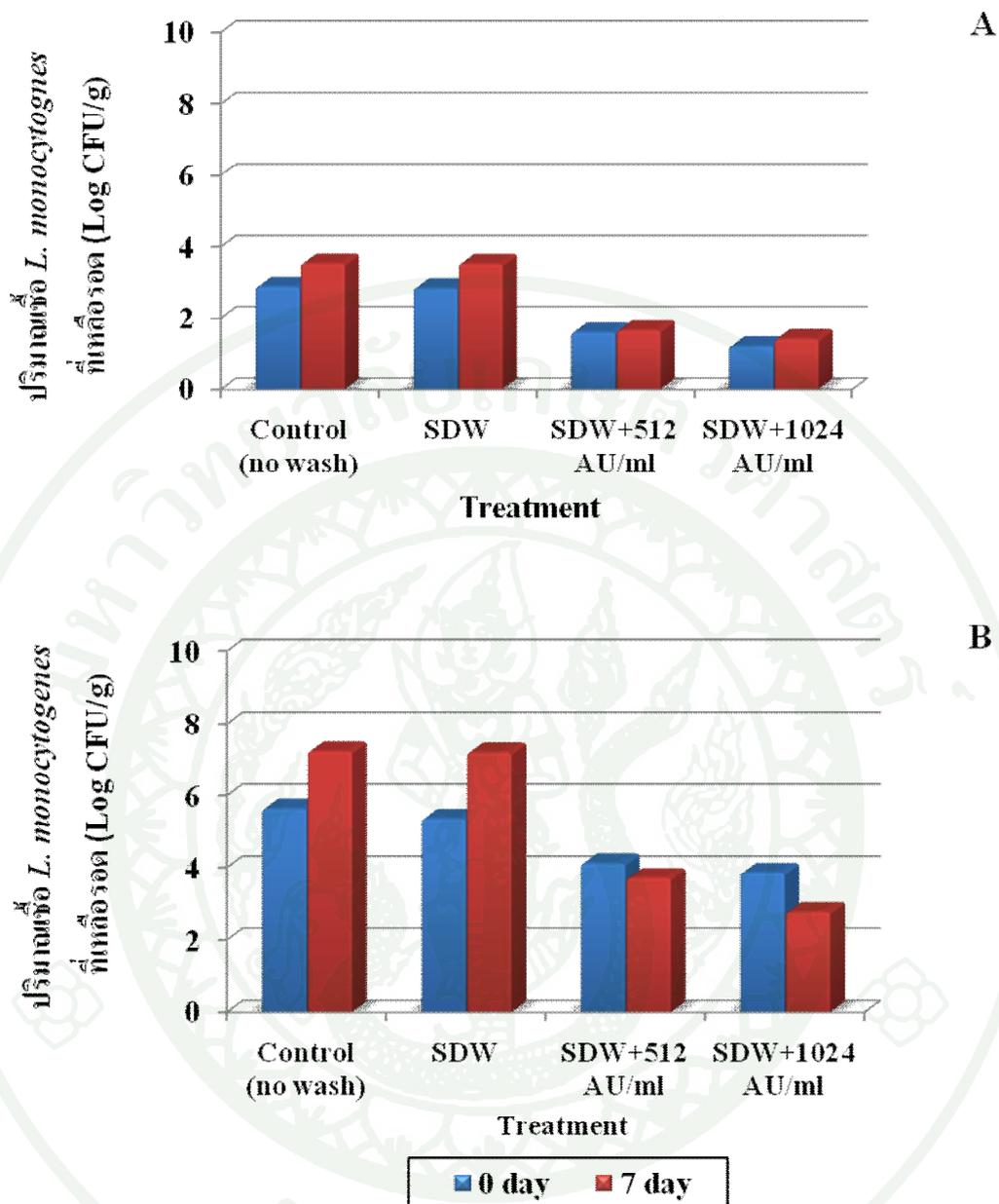
ภาพที่ 25 ประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 บนผิวแตงกวาสด ที่มีการปนเปื้อนในระดับต่ำ/ ระดับสูง (SDW = Sterile distilled water, SDW+512 AU/ml = Sterile distilled water+ bacteriocin activity 512 AU/ml, SDW+1,024 AU/ml = Sterile distilled water+ bacteriocin activity 1,024 AU/ml)

อย่างไรก็ตามสารแบคทีริโอซินที่ค่ากิจกรรม 1,024 AU/ml ก็ยังไม่เพียงพอในการยับยั้ง จุลินทรีย์ปนเปื้อนที่ระดับสูง แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อในน้ำที่ผสมแบคทีริโอซินหลัง การแช่แตงกวา พบว่าตรวจไม่พบเชื้อเลย ทั้งที่ 512 และ 1,024 AU/ml แสดงว่าถ้ามีเซลล์หลุดออก จากผิวแตงกวามาอยู่ในน้ำ สารแบคทีริโอซินยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดี แต่เชื้อที่เกาะ บนผิวแตงกวาในปริมาณสูง อาจยึดเกาะไม่สม่ำเสมอ และสารแบคทีริโอซินอาจทำลายได้ เฉพาะเซลล์ที่อยู่นอกสุดได้ง่ายกว่า ดังนั้นถ้ามีการปนเปื้อนของเชื้อในปริมาณสูง นอกจากจะต้อง เพิ่มความเข้มข้นของสารที่ใช้แล้ว ยังอาจต้องเพิ่มระยะเวลา หรืออาศัยวิธีการอื่นร่วมด้วยเช่น การกวน

จากผลการศึกษานี้จะเห็นได้ว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *P. pentosaceus* KU-F2 มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้ดี เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Allende *et al.* (2007) พบว่าเมื่อใช้ nisin ที่มีค่ากิจกรรม 200 AU/ml ร่วมกับ coagulin สามารถลด

จำนวนเชื้อ *L. monocytogenes* ที่ปนเปื้อนบนผักกาดขาวได้ 3.2-3.5 Log CFU/g ภายในเวลา 3 วัน เมื่อป่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ Randazzo *et al.* (2008) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของ bacteriocin RUC9 ที่ผลิตโดย *L. lactis* RUC9 ในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ที่ปนเปื้อนใน lettuce iceberg ที่ป่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยสามารถลดจำนวนเชื้อได้ 2.4 Log CFU/g



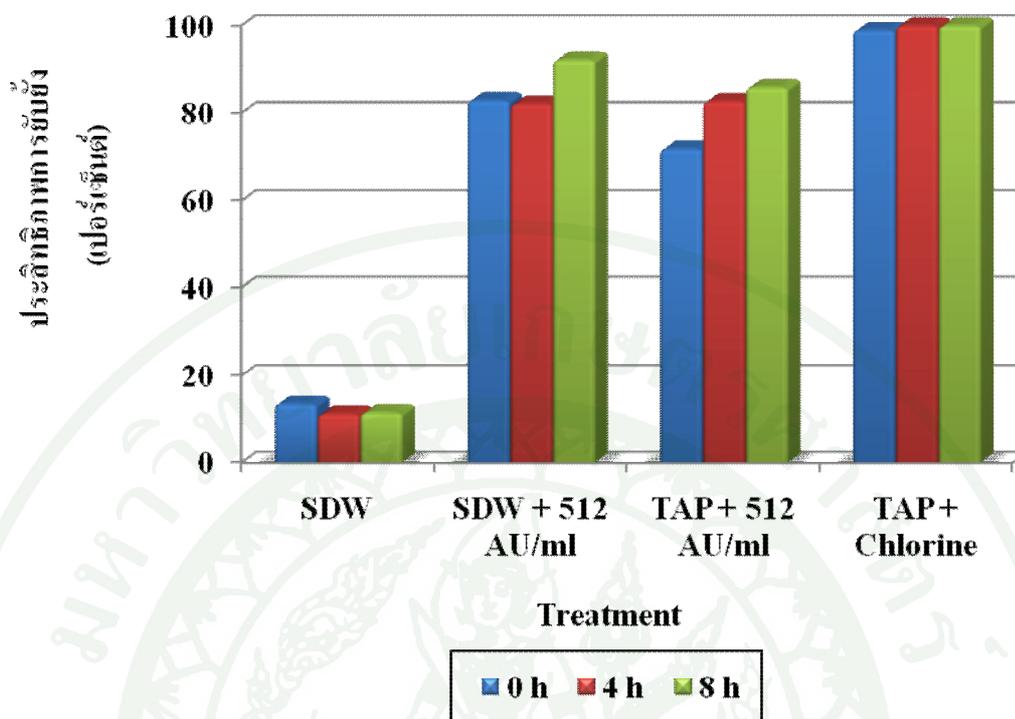


ภาพที่ 26 ผลของสารแบคทีริโอซิน ต่ออายุการเก็บรักษาของแตงกวาสดที่ปนเปื้อนเทียมด้วย *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ในระดับต่ำ (A) และระดับสูง (B) เมื่อเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 7 วัน (SDW = Sterile distilled water, SDW+512 AU/ml = Sterile distilled water+ bacteriocin activity 512 AU/ml, SDW+1,024 AU/ml = Sterile distilled water+ bacteriocin activity 1,024 AU/ml)

## 16. การประยุกต์สารแบคทีเรียโอซินในน้ำประปาเพื่อยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 บนผิวเตงกวาสด

เพื่อให้ง่ายต่อการนำไปปฏิบัติจริง ในการศึกษานี้ได้ประยุกต์สารแบคทีเรียโอซินในน้ำประปาที่ใช้กันอยู่ทั่วไป จากนั้นนำเตงกวาสดที่มีการปนเปื้อนเทียมด้วยเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ในปริมาณ 2.58 Log CFU/g มาแช่ในน้ำประปาที่เติมสารแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรม 512 AU/ml เป็นเวลา 5 นาที เปรียบเทียบกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมสารแบคทีเรียโอซิน และน้ำประปาที่เติมสารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm พบว่าน้ำประปาที่เติมสารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm ซึ่งเป็นสารที่ใช้มาเชื่อในการล้างผักต่างๆไป สามารถลดปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ที่ปนเปื้อนเทียมบนผิวเตงกวาสดได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ข้อเสียของการใช้สารเคมีอาจก่อให้เกิดสารเคมีตกค้างได้ ดังนั้นการลดปริมาณเชื้อโดยใช้สารชีวภาพน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ซึ่งในการทดลองนี้ใช้สารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ได้รับการยอมรับว่าเป็น GRAS จึงน่าจะปลอดภัยมากกว่า จากการทดลองพบว่า การเติมสารแบคทีเรียโอซินในน้ำประปาที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อก็มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้เช่นเดียวกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมสารแบคทีเรียโอซิน แม้ว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งจะไม่ดีเทียบเท่ากับสารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ แต่ก็สามารถยับยั้งเชื้อได้มากกว่า 80-90% (ภาพที่ 27, ตารางผนวกที่ ค18) นอกจากนี้เมื่อเก็บรักษาเตงกวาสดที่ผ่านการแช่ในน้ำที่เติมสารแบคทีเรียโอซินไว้นานถึง 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิตู้เย็น ปริมาณเชื้อก็ไม่เพิ่มขึ้นแต่อย่างใด

จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าการประยุกต์สารแบคทีเรียโอซินในน้ำประปา อาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เนื่องจากน้ำประปาที่ใช้อาจมีสารคลอรีนหลงเหลืออยู่เล็กน้อย ซึ่งอาจมีผลต่อประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซินได้



ภาพที่ 27 ประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซินเมื่อละลายในน้ำประปา ต่อการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่ปนเปื้อนเทียมบนผิวแตงกวาสด ที่ระยะเวลาการเก็บต่าง ๆ (SDW = Sterile distilled water, SDW+512 AU/ml = Sterile distilled water+bacteriocin activity 512 AU/ml, Tap+512 AU/ml = Tap water+bacteriocin activity 512 AU/ml, Tap+chlorine = TAP+ Sod. Hypochlorite 100 ppm)

จากการศึกษานี้จะเห็นได้ว่าสารโซเดียมไฮโปคลอไรต์มีประสิทธิภาพในการทำละลายเชื้อได้ดีกว่าสารแบคทีริโอซิน แต่สารโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ใช้เป็นสารเคมีซึ่งอาจตกค้างในผักส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ นอกจากนี้ในกระบวนการเตรียมต้องใช้ความระมัดระวังอย่างมาก เพราะเป็นสารเคมีที่อันตรายต่อผิวหนังและตา ส่วนแบคทีริโอซินเป็นสารที่สร้างจากจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ซึ่งหากเพิ่มค่ากิจกรรมให้เพียงพอต่อการทำลายเชื้อ จะสามารถทำลายเชื้อได้หมด ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารแบคทีริโอซินไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการล้างผัก เพื่อความปลอดภัยต่อสุขภาพและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

1. ในการศึกษาสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากผักและผลไม้ และสามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลต จากจำนวนทั้งหมด 769 ไอโซเลต คิดเป็น 0.4 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลต KU-F2 สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงที่สุดคือ 12,800 AU/ml ต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *Lb. sakei subsp. sakei* JCM 1157 และ *L.monocytogenes* DMST 17303
2. แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต KU-F2 จัดจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น *Pediococcus pentosaceus* KU-F2
3. การสร้างสารแบคทีเรียโอซินเป็นแบบ primary metabolite production ซึ่งสัมพันธ์กับการเจริญ โดยสร้างได้สูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 15 ของการเจริญซึ่งเป็นระยะปลาย log phase
4. ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้แก่ อุณหภูมิ, ค่าความเป็นกรด-ด่าง, ปริมาณกลูโคสและปริมาณเกลือ โดยที่ 37 องศาเซลเซียส, ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.8, ปริมาณกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ และ ปริมาณเกลือ 0-2 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ *P. pentosaceus* KU-F2 จะสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมสูงสุดคือ 12,800 AU/ml
5. ในการศึกษาเบื้องต้นถึงประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *P. pentosaceus* KU-F2 ในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ในอาหารเหลว พบว่าสารแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรม 512 AU/ml สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ที่มีปริมาณเชื้อ  $10^2$  CFU/ml ได้อย่างมีประสิทธิภาพ
6. สารแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้ง 512 AU/ml สามารถประยุกต์ในน้ำล้างผัก โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 บนผิวแตงกวาสดที่มีการปนเปื้อนเทียมปริมาณ 2 Log CFU/g

7. สารแบคทีเรียโอซินสามารถประยุกต์กับน้ำประปาในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 บนผิวแตงกวาสดเช่นเดียวกัน

### ข้อเสนอแนะ

1. ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อดูประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซิน ที่ผลิตจาก *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคบนผักสดซึ่งได้เลือกแตงกวาเป็นตัวแทนของการศึกษา ซึ่งพบว่า ในแต่ละชุดของการทดลองที่มีการปนเปื้อนเทียม ไม่สามารถควบคุมให้ปนเปื้อนในปริมาณที่เท่ากันได้ทุกครั้ง เนื่องจากแตงกวาแต่ละครั้งมีขนาดและรูปร่างไม่สม่ำเสมอ นอกจากนี้เมื่อทำการปอกเปลือกผิวแตงกวาออกก่อนทำการปนเปื้อน จะมีน้ำสีขาวไหลออกมาด้วย ซึ่งน้ำสีขาวดังกล่าวอาจมีผลต่อการยึดเกาะของเชื้อบนผิวแตงกวา หรือ อาจมีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซินได้ ซึ่งน่าจะได้มีการศึกษาเพิ่มเติมถึงปัจจัยเหล่านี้
2. ในการศึกษาที่ยังไม่ได้ทำการศึกษาโครงสร้างของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *P. pentosaceus* KU-F2 ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ต่อการอธิบายถึงกลไกการยับยั้งของเชื้อก่อโรคได้ชัดเจนขึ้น
3. ผลจากการศึกษานี้ น่าจะเป็นแนวทางในการศึกษาถึงการใช้ประโยชน์ของสารแบคทีเรียโอซินเป็นสารถนอมอาหารชีวภาพกับผักสดประเภทอื่นได้
4. ในการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซิน สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 ได้ดี อย่างไรก็ตามเชื่อดังกล่าว เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งมีความใกล้ชิดกับแบคทีเรียกรดแลคติก แต่ถ้าต้องการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ อาจต้องประยุกต์ร่วมกับวิธีการอื่น เช่น กรดอินทรีย์ เป็นต้น
5. ควรพัฒนาการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน ในสับสเตรทที่มีราคาถูกลงกว่าอาหารสังเคราะห์ เพื่อให้การนำไปประยุกต์เป็นรูปธรรมมากขึ้น

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ชุตินันท์ รัตนไพบูลย์สวัสดิ์. 2547. การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นภา โล่ทอง. 2534. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. พิมพ์ครั้งที่ 3. ฟันนี้ พับบลิชชิง, กรุงเทพฯ.
- พงษ์เทพ วิไลพันธ์. 2546. แบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในปลาร้า. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549. ตำราจุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2. จามจุรีโปรดักท์, กรุงเทพฯ.
- อดิศร เสวตวิวัฒน์ และ ปรีชา จึงสมานกุล. 2538. ซาลโมเนลลาและลิสทีเรียในผักสด. วารสารอาหาร. 25: 185-189.
- อรอนงค์ พริ้งสุทธกะ. 2550. แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. วารสารวิทยาศาสตร์. 23 : 145 - 160.
- Ahn, C. and M.E. Stiles. 1990. Antibacterial activity of lactic acid bacteria from vacuum-packaged meats. **J. Appl. Bacteriol.** 69: 302-310.
- Albano, H., S.D. Todorov, C.A. Reenen, T. Hogg, L.M.T. Dicks and P. Teixeira. 2007. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. **Int. J. Food Microbiol.** 116: 239-247.
- Allende, A., B. Martinez, V. Selma, M.I. Gil, J.E. Suarez and A. Rodriguez. 2007. Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce. **Food Microbiol.** 24: 759-766.

Anastasiadou, S., M. Papagianni, G. Filiouis, I. Ambrosiadis and P. Koidis. 2008a. Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: production condition, purification and characterization. **Bioresour. Technol.** 99: 5384-5390.

---

. 2008b. Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation purification, characterization and properties of the produced pediocin SM-1. **Enzyme Microb. Technol.** 43: 448-454.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology, pp. 1-72. In S. Salminen, V. Wright A Ouwehand, eds. **Lactic acid bacteria: Microbiology and Functional Aspects.** Marcel Dekker, Inc. New York.

Axelsson, L. and A. Holck. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology, pp. 1-66. In S. Salminen, V. Wright and A. Ouwehand, eds. **Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects.** Marcel Dekker, Inc. New York.

Bagenda, D.K., K. Hayashi, K. Yamazaki and Y. Kawai. 2008. Characterization of an antibacterial substance produced by *Pediococcus pentosaceus* Iz3. 13 isolated from Japanese fermented marine food. **Fisheries Sci.** 74: 439-448.

Beck, T. 1978. The microbiology of silage fermentation, pp. 61-115. In M.E. McCullough, ed. **Fermentation of Silage-a Review.** National Feed Ingredients Assoc. West Des Moines, IA.

Bell, C. and A. Kyriakides. 2005. Outbreak: causes and lesson to be learnt, pp. 22-27. In C. Bell and A. Kyriakides, eds. **Listeria : a practical approach to the organism and its control in foods.** Oxford : Blackwell Pub, United States of America.

Bennik, M.H.J., E.J. Smid and L.G.M. Gorris. 1997. Vegetable-Associated *Pediococcus parvulus* produces pediocin PA-1. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 2074-2076.

- Bennik, M.H.J., W. Van Overbeek, E.J. Smid, L.G.M. Gorris. 1999. Biopreservation in modified atmosphere stored mungbean sprouts: the use of vegetable-associated bacteriocinogenic lactic acid bacteria to control the growth of *Listeria monocytogenes*. **Lett. Appl. Microbiol.** 28: 226-32.
- Beuchat, L.R. 1996. *Listeria monocytogenes*: Incidence on vegetables. **Food Control.** 7:223-228.
- \_\_\_\_\_. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruit and vegetables. **Microbes Infect.** 4: 413-423.
- Biswas, S.R., P. Ray, M.C. Johnson and B. Ray. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 1265-1267.
- Blendon, D.C. and F.T. Szatalowicz. 1967. Ecological aspects of listeriosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 151: 1761-1766.
- Brackett, R.E. 1999. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in products of Plant origin, pp. 631–655. In E.T. Ryser and E.H. Marth, eds. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. Marcel Dekker, New York.
- Breidt, F., K.A. Crowley and H.P. Fleming. 1995. Controlling cabbage fermentations with nisin and nisin-resistant *Leuconostoc mesenteroides*. **Food Microbiol.** 12: 109–116.
- Cai, Y., L.K. Ng and J.M. Farber 1997. Isolation and characterization of nisin producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from bean-sprouts. **J. Appl. Microbiol.** 83: 499–507.
- Casaus, P., T. Nilsen, L.M. Cintas, I.F. Nes, P.E. Hernandez and H. Holo. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. **Microbiol.** 143: 2287-2294.

- Cintas, L.M., P. Casaus, C. Herranz, L.S. Havarstein, H. Holo, P.E. Hernandez and I.F. Nes. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a Novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. **J. Bacteriol.** 182: 6806-6814.
- Cleveland, J., T.J. Montville, I.F. Nes, and M.L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int. J. Food Microbiol.** 71: 1-20.
- Daeschel, M.A., R.E. Anderson and H.P. Fleming. 1987. Microbial ecology of fermenting plant material. **FEMS Microbiol. Lett.** 46: 357-367.
- De Klerk, H.C. and J.A. Smit. 1967. Properties of a *Lactobacillus fermenti* bacteriocin. **J. Gen. Microbiol.** 48: 309-316.
- De Vuyst, L. and E.J. Vandamme. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, pp. 91-142. In De Vuyst, L. and E.J. Vandamme, eds. **Bacteriocins of lactic acid bacteria, Microbiology, Genetics and Applications.** Blackie Acad and professional, London.
- Earnshaw, R.G. 1992. The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems, pp. 161-200. In B.J.B. Wood, ed. **The lactic acid bacteria in health and disease.** Elsevier, New York.
- Eckner, K.F. 1992. Bacteriocins and food application. **Dairy. Food Environ. Sanit.** 12: 4-209.
- Farber, J.M., G.W. Sanders and M.A. Johnston. 1989. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. **J. Food. Prot.** 52: 456-458.
- Fraser, J.A. and W.H. Sperber. 1988. Rapid detection of *Listeria*. **Protection** 56, 616-618.
- Franz, C.M.A.P., U. Schillinger and W.H. Holzapfel. 1996. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. **Int. J. Food Microbiol.** 29: 255-270.

- Galvez, A., H. Abriouel, R.L. Lopez and N.B. Omar. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **Int. J. Food Microbiol.** 120: 51–70.
- Garcia-Gimeno, R.M. and G. Zurera-Cosano. 1991. Determination of ready-to-eat vegetable salad shelf-life. **Int. J. Food Microbiol.** 36: 31-38.
- Gratia, A. 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. **Compt. Rend. Soc. Biol.** 93: 1040–1042.
- Green, G., L.M.T. Dicks, G. Bruggeman, E.J. Vandamme and M.L. Chikindas. 1997. Pediocin PD-1, a bactericidal antimicrobial peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. **J. Appl. Microbiol.** 83: 127–132.
- Hastings, J.W., M. Sailer, K. Johnson, K.L. Roy, J.C. Vederas and M.E. Stiles. 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. **J. Bacteriol.** 173: 7491-7500.
- Heard, G. 1999. Microbial safety of ready-to-eat salads and minimally processed vegetables and fruits. **Food Australia.** 51: 414–420.
- Heisick, J.E., F.M. Harrell, E.H. Peterson, S. McLaughlin, D.E. Wagner, I.V. Wesley and J. Bryner. 1989. Comparison of four procedures to detect *Listeria* spp. in foods. **J. Food Prot.** 52: 154-157.
- Ho, J.L., K.N. Shands, G. Friedland, P. Eckind and D.W. Fraser. 1986. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. **Arch. Intern. Med.** 146: 520–524.
- Holzappel, W. H. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **Int. J. Food Microbiol.** 24: 343–362.

- Huang, Y., Y. Luo, Z. Zhai, H. Zhang, C. Yang, H. Tian, Z. Li, J. Feng, H. Liu and Y. Hao. 2009. Characterization and application of an anti-Listeria bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 05-10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China. **Food Control**. 20: 1030–1035.
- Iwatani, S., T. Zendo, F. Yoneyama, J. Nakayama and K. Sonomoto. 2007. Characterization and structure analysis of a novel bacteriocin, lacticin Z, produced by *Lactococcus lactis* QU 14. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 7: 1984-1992.
- Jack, R.W., J.R. Tagg and B. Ray. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiol. Rev.** 59: 171-200.
- Jacob, F., A. Lwoff, A. Siminovitch and E.L. Wollman. 1953. Définition de quelques Termes relatifs a la lysogenie. **Ann. Inst. Pasteur Paris**. 84: 222-224.
- Jamuna, M. and K. Jeevaratnam. 2004. Isolation and partial characterization of bacteriocins from *Pediococcus* species. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 65: 433-439.
- Jay, J.M. 1992. **Modern Food Microbiology**. 4th ed. Chapman and Hall, New York.
- Jumriagrit, P. 2004. **Characterization and purification of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* PMU33 from fermented fish products**. M.S. thesis, Mahidol University.
- Juven, B.J., P. Lindner and H. Weisslowicz. 1985. Pectin degradation in plant material by *Leuconostoc mesenteroides*. **J. Appl. Bacteriol.** 58: 533–538.
- Kaiser, A.L. and T.J. Montville. 1993. The influence of pH and growth rate on production of bacteriocin, bavaricin MN, in batch and continuous fermentations. **J. Appl. Bacteriol.** 75: 536-540.

- King, A.D., J.A. Magnuson, T. Torok and N. Goodman. 1991. Microbial flora and storage quality of partially processed lettuce. **J. Food Sci.** 56: 459–461.
- Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic bacteria. **Biochimie.** 70: 337- 349.
- Konisky, J. 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. **Annu. Rev. Microbiol.** 36: 125-144.
- Lewus, C.B., S. Sun and T.J. Montville. 1992. Production of an Amylase-Sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 143-149.
- Little, C.L., H.A. Monsey, G.L. Nichols and J. de Louvais. 1997. The microbiological quality of refrigerated salads and crudites. **PHLS. Microbiol. Digest.** 14: 142-146.
- Lund, B.M. 1992. Ecosystems in vegetable food. **J. Appl. Bacteriol.** 73: 115-126.
- Mandal, V., S.K. Sen and N.C. Mandal. 2008. Optimized culture conditions for bacteriocin production by *Pediococcus acidilactici* LAB 5 and its characterization. **Indian J. Biochem. Biophys.** 45: 106-110.
- Marriott, N.G. 1997. **Essentials of Food Sanitation.** Chapman and Hall., New York.
- Maxcy, R.B. 1978. Lettuce salad as a carrier of microorganisms of public health significance. **J. Food Prot.** 41: 435-438.
- McClain, D. and Lee W.H. 1988. Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 71: 660–664.

- Montville, T.J. and A.L. Kaiser. 1993. Antimicrobial proteins : classification, nomenclature, diversity and relationship to bacteriocins, pp. 1-22. In D.G. Hoover and L.R. Steenson, eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. Academic Press, Inc., New York.
- Muriana, P.M. and J.B. Luchansky. 1993. Biochemical methods for purification of bacteriocins, pp. 41-61. In D. G. Hoover and L. R. Steenson, eds. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. Academic Press, New York.
- \_\_\_\_\_. 1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. **J. Food Prot.** Suppl. 59: 54-63.
- National Center for Biotechnology Information. 2009. **BLAST Assembled Genomes**. Available Source: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. October 28, 2009.
- Nel, H.A., R. Bauer, E.J. Vandamme and L.M.T. Dicks. 2001. Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB 1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. **J. Appl. Microbiol.** 91: 1131-1138.
- Nettles, C.G. and S.F. Barefoot. 1993. Biochem and genet characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria. **J. Food Prot.** 56: 338-356.
- Ogunbanwo, S.T., A.I. Sanni and A.A. Onilude. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. **Afr. J. Biotechnol.** 2: 219-227.
- Osmanagaoglu, O., U. Gunduz, Y. Beyatli and C. Cokmus. 1998. Purification and characterization of pediocin F, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* F. **J. Biol.** 22: 217-228.
- Ouwehand, A.C. and S. Vesterlund. 2004. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, pp. 375-395. In S. Salminen, V. Wright and A. Ouwehand, eds. **Lactic Acid Bacteria, Microbiology and Functional Aspects**. Marcel Dekker, Inc. New York.

Parente, E. and A. Ricciardi. 1994. Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. **Lett. Appl. Microbiol.** 19: 12-15.

\_\_\_\_\_ 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 52: 628-638.

Parish, M.E., L.R. Beuchat, T.V. Suslow, L.J. Harris, E.H. Garrett, J.N. Farber and F.F. Busta. 2003. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. **Comp. Rev. Food Sci. Food Safety.** Suppl. 2: 161-178.

Piard, J.C. and M. Desmazaud. 1992. Inhibiting factor produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. **Lait.** 72: 113-142.

Pilasombut, K. 2006. **Purification and characterization of bacteriocins produced by *Lactobacillus salivarius* K4 and K7 isolated from chicken intestine.** Ph.D.thesis, Kasetsart University.

Prescott, S.C. and C.G., Dunn. 1995 *Industry Microbiology*. 3<sup>rd</sup> ed., Kogakushi Co., Ltd., Tokyo.

Ragaert, P., F. Devlieghere and J. Debevere. 2007. Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. **Postharv. Biol. Technol.** 44: 185-194.

Randazzo, C.L., I. Pitino, G.O. Scif and C. Caggia. 2009. Biopreservation of minimally processed iceberg lettuces using a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* wild strain. **Food Control.** 20: 756-763.

Ray, B. 1995. *Pediococcus* in Fermented Foods, pp. 745-795. In Y.H. Hui and G.G. Khachatourians, eds. **Food Biotechnology: Microorganisms.** Wiley-VCH, New York.

- Robinson, R.K., C.A. Batt, and P.D. Patel. 2000. **Encyclopedia of Food Microbiology**, Vol.2. Academic Press, New York.
- Rocourt, J. and P. Cossart. 1997. *Listeria monocytogenes*, pp. 337-352. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat, and T.J. Montville, eds. **Food Microbiology Fundamental and Frontiers**. ASM Press, Washington, D.C.
- \_\_\_\_\_. Ch. Jacquet, and A. Reilly. 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafood. **Int. J. Food Microbiol.** 62: 197-209.
- Rohm and Haas Company is a wholly owned subsidiary of The Dow Chemical. 2009 **Advanced Biosciences**. Available Source: <http://www.advancedbiosciences.com>. December 27, 2009.
- Rusemeechan, S. 1994. Listeria Meningitis : Report of two case in Thailand. **J. Infect. Dis. Agents.** 12: 69-71.
- Sagoo, S.K., C.L. Little and R.T. Mitchell. 2001. The microbiological examination of ready-to-eat organic vegetables from retail establishments in the United Kingdom. **Lett Appl. Microbiol.** 33: 434-439.
- \_\_\_\_\_. L. Ward, I.A. Gillespie and R.T. Mitchell. 2003. Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishments Uncovers a National Outbreak of Salmonellosis. **J. Food Prot.** 7: 403-409.
- Schillinger, U. and F.K. Lucke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.** 55: 1901-1906.
- \_\_\_\_\_. R. Geisen and W.H. Holzapfel. 1996. Potential of antagonistic micro-organisms for the biological preservation of foods. **Trends Food Sci. Technol.** 7: 158-164.

- Shin, M.S., S.K. Han, J.S. Ryu, K.S. Kim and W.K. Lee. 2008. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* K23-2 isolated from Kimchi. **J. Appl. Microbiol.** 105: 331-339.
- Stevens, K.A., B.W. Sheldon, N.A. Klapes and T. R. Klaenhammer. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram negative bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 3613-3615.
- Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. **Ant. v. Leeuwenhoek.** 70: 331-345.
- Strasser de Saad, A.M., S.E. Pasteris and M.C. Manca de Nadra. 1995. Production and stability of pediocin N5p in grape juice medium. **J. Appl. Bacteriol.** 78: 473-476.
- Tagg, J.R., A.S. Dajani and L.W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriol. Rev.** 40: 722-756.
- Thomas, L.V., M.R. Clarkson and J. Delves-Broughton. 2000. Nisin, pp. 463-524. In A.S. Naidu, ed. **Natural food antimicrobial systems.** CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Thunberg R.L., T.T. Tran., R.W. Bennett, R.N. Matthews and N. Belay. 2002. Microbial evaluation of selected fresh produce obtained at retail markets. **J. Food Prot.** 65: 677-682.
- Todorov, S.D. and L.M.T. Dicks. 2005. Pediocin ST-18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST-18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. **Process Biochem.** 40: 365-370.
- Treepachatsakul, P. 2006. Brain Abscess Due to *Listeria monocytogenes*: First Case Report in Thailand. **J. Med. Assoc. Thai;** 89: 1516-20

- Trias, R., L. Baneras, E. Badosa and E. Montesinos 2008. Bioprotection of golden delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiol.** 123: 50-60.
- Trittsler, R.P., C.S. Pederson, E.E. Shell, D. Handlin and C.F. Niven, Jr. 1952. Symposium on the lactic acid bacteria. **Bacteriol Rev.** 16: 227-260.
- Upreti, G.C. and R.D. Hinsdill. 1973. Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 4: 487-494.
- Vescovo, M., S. Torriani, G. Scolari and L.M.T. Dicks. 1995. *Lactobacillus casei* and related species: a review. **Ann. Microbiol. Enzymol.** 45: 51-83.
- Vignolo, G.M., M.N. Kairuz, A.A.P. Ruiz Holgado and G. Oliver. 1995. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. **J. Appl. Bacteriol.** 70: 5-10.
- Visser R., W.H. Holzapfel, J.J. Bezuidenhout and J.M. Kotze. 1986. Antagonism of lactic acid bacteria against phytopathogenic bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 52: 552-555.
- Wu, C.W., L.J. Yin and S.T. Jiang. 2004. Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. **J. Agric. Food. Chem.** 52: 1146-1151.
- Yousef, A.E. 2003. Lactic acid fermentation and bacteriocin production, p. 227. In A.E. Yousef and C. Carlstrom, eds. **Food Microbiology A Laboratory Manual**. Wiley-Interscience, United States of America.
- Zagory, D. 1999. Effects of post-processing handling and packaging on microbial populations. **Postharv. Biol. Technol.** 15: 313-321.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก  
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายเคมี

## อาหารเลี้ยงเชื้อ

### 1. Tryptic soy broth

Peptone from casein	17	กรัม
Peptone from soymeal	3	กรัม
Dextrose	2	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ค่าความเป็นกรด-เบส	7.3	

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar ให้เติมวุ้นผงลงไป 15 กรัม

### 2. De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth

Peptone from casein	10	กรัม
Meat extract	8	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Di-ammonium hydrogen citrate	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganese sulfate	0.04	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ค่าความเป็นกรด-เบส	5.8	

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ De Man, Rogosa and Sharpe agar ให้เติมวุ้นผงลงไป 15 กรัม

### 3. PALCAM Listeria Agar Base

Columbia Blood Agar Base	39	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Glucose	0.5	กรัม
Esculin	0.8	กรัม
Ferric ammonia citrate	0.5	กรัม
Mannitol	10	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
Lithium chloride	15	กรัม
ค่าความเป็นกรด-เบส	7.2	

### 4. PALCAM Selective supplement

Polymyxin B	10	มิลลิกรัม
Acriflavine hydrochloride	5	มิลลิกรัม
Ceftazidime	20	มิลลิกรัม

### 5. Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ค่าความเป็นกรด-เบส	5.6	

ปอกเปลือกมันฝรั่งแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปชั่งจนครบ 200 g แล้วนำมาต้มกับน้ำกลั่น นาน 15-20 นาที กรองเอาส่วนที่เป็นกากออก เติมส่วนประกอบที่เหลือแล้วนำไปต้มจนวุ้นละลาย ให้นำเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 6. Nutrient broth (NB)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีในกรณีที่ต้องการ เตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) ให้เติมวุ้นผงลงไป 15 กรัม

## 7. Agar *Listeria* acc. to Ottaviani & Agosti (ALOA) (g/l)

Meat peptone	18	กรัม
Tryptone	6	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Sodium pyruvate	2	กรัม
Glucose	2	กรัม
Magnesium glycerophosphate	1	กรัม
Magnesium sulphate	0.50	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Lithium chloride	10	กรัม
Disodium hydrogen phosphate anhydrous	2.5	กรัม
5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucopyranoside	0.05	กรัม
Agar	13.5	กรัม

## 8. ALOA Selective Supplement (vial contents for 500 ml of medium)

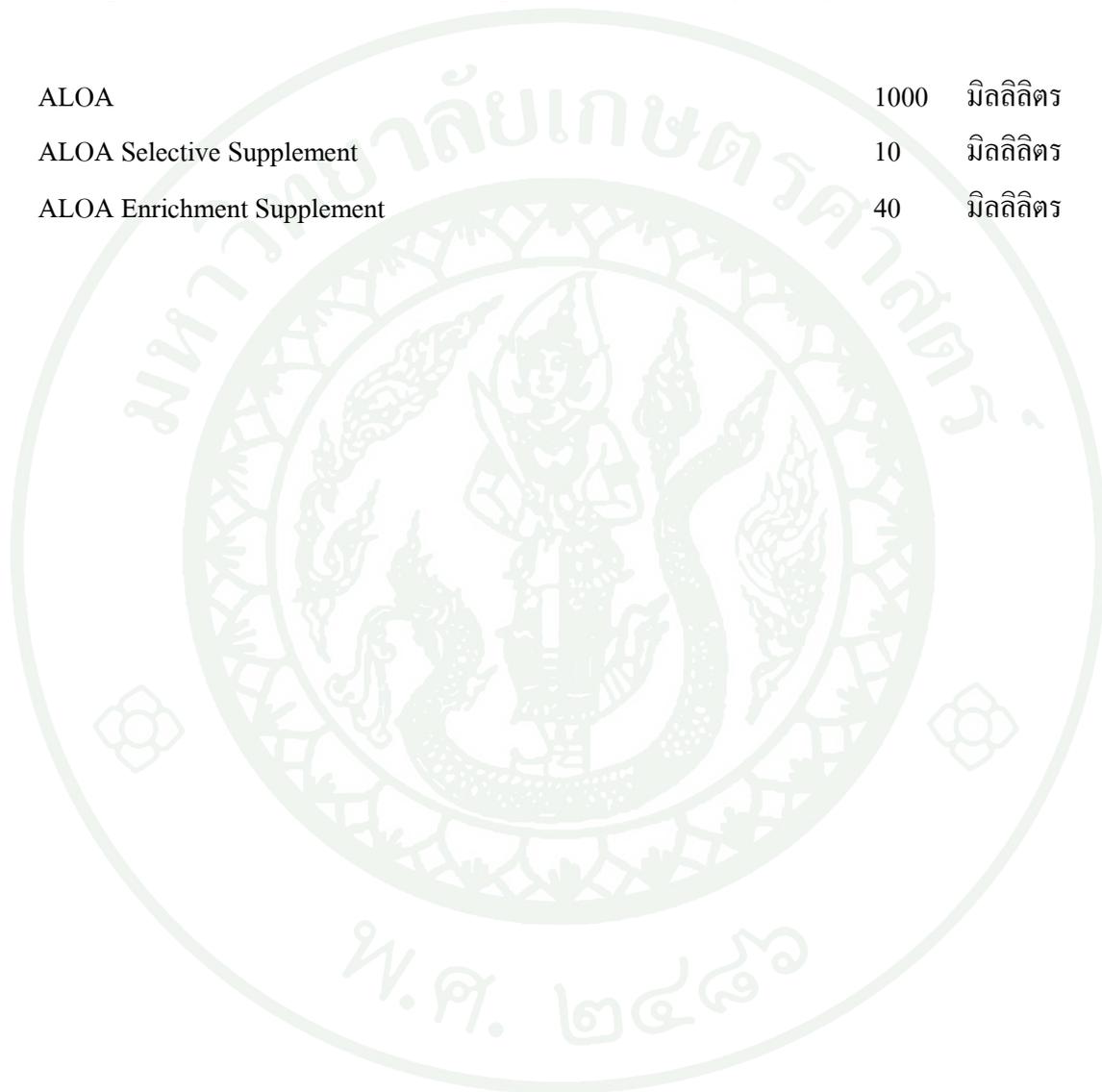
Nalidixic Acid	10	มิลลิกรัม
Ceftazidime	10	มิลลิกรัม
Cycloheximide	25	มิลลิกรัม
Polymyxin B 3	8350	IU

**9. ALOA Enrichment Supplement (vial contents for 500 ml of medium)**

L- $\alpha$ -phosphatidylinositol	1	กรัม
-----------------------------------	---	------

**10. Agar Listeria acc. to Ottaviani & Agosti (ALOA) - ready to use plates**

ALOA	1000	มิลลิลิตร
ALOA Selective Supplement	10	มิลลิลิตร
ALOA Enrichment Supplement	40	มิลลิลิตร



## สารละลายเคมี

### 1. สารละลายอะซิติคเข้มข้น 0.2 โมลาร์

เตรียมโดยเจือจางกรดอะซิติคเข้มข้น 11.55 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

### 2. สารละลายโซเดียมอะซิเตตเข้มข้น 0.2 โมลาร์

เตรียมโดยละลายโซเดียมอะซิเตต 16.4 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

### 3. สารละลายไกลซีนเข้มข้น 0.2 โมลาร์

เตรียมโดยละลายไกลซีน 15.01 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

### 4. สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์พีเอช 4.5

เตรียมโดยผสมสารละลายกรดอะซิติคเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 305 มิลลิลิตร กับ สารละลายโซเดียมอะซิเตตเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 195 มิลลิลิตร ให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตร เป็น 1,000 มิลลิลิตร โดยน้ำกลั่น

### 5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 นอร์มัล

เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 กรัมในน้ำกลั่นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรให้ เป็น 1 ลิตร

#### 6. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 นอร์มัล

เตรียมโดยนำกรดไฮโดรคลอริก 12.06 นอร์มัล ปริมาตร 414.59 มาปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรโดยน้ำกลั่น

#### 7. สารละลายไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์พีเอช 9.6

เตรียมโดยผสมสารละลายไกลซีนเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 224 มิลลิลิตร ให้เข้ากันและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตรโดยน้ำกลั่น



## การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยา, สรีระวิทยา และสมบัติทางชีวเคมี

### 1. ทดสีแกรม

เจียเชื้อบริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS อายุ 18-24 ชั่วโมง ลงบนแผ่นสไลด์ ย้อมด้วยสารละลาย Crystal violet เวลา 1 นาที เทสีที่ขจัด หยอดสารละลายไอโอดีนให้ท่วม เวลา 1 นาที เทล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เบาๆ ล้างด้วยน้ำประปา แล้วจึงย้อมด้วยสารละลาย Safranin-O เวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำประปาอีกครั้ง ซับให้แห้ง ตรวจสอบรูปร่าง การติดสี การเรียงตัวด้วยกล้องจุลทรรศน์

### 2. การสร้างเอนไซม์ คะตะเลส (catalase)

เจียเชื้อบริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ลงบนแผ่นสไลด์ หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) 3 เปอร์เซ็นต์ บนแผ่นสไลด์ สังเกตฟองอากาศ แบคทีเรียกรดแลคติกจะไม่สร้างเอนไซม์คอะเลส จึงไม่เกิดฟองอากาศจากปฏิกิริยา

### 3. การเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นต่างๆ

เจียเชื้อบริสุทธิ์ที่มีอายุ 18-24 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลว MRS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญ 7 วัน

### 4. การตรวจสอบการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับ pH ต่างๆ

เตรียมอาหารเหลว MRS ที่ระดับความเป็นกรดต่าง 9.6 โดยใช้สารละลายไกลซีนเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำสารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าวใช้

แทนน้ำกลั่นในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเติมส่วนผสมต่างๆครบแล้วนำไปปรับระดับความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 9.6 นำมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

เตรียมอาหารเหลว MRS ที่ระดับความเป็นกรดต่าง 4.5 โดยใช้อะซิเตดบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำสารละลายบัฟเฟอร์นี้ใช้แทนน้ำกลั่นในการเตรียมอาหาร เมื่อเติมสารอาหารต่างๆจนครบแล้วปรับระดับความเป็นกรดต่างของอาหารเป็น 4.5 ด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตด หรือสารละลายกรดอะซิติกเจือจาง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

เขียนเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 4.5 และ 9.6 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญ โดยดูความขุ่นเมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และภายในเวลา 7 วัน

#### 5. การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

เขียนเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญโดยดูความขุ่นเมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และภายในเวลา 7 วัน

#### 6. การตรวจสอบการสร้างก๊าซ

เขียนเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS ที่ใส่หลอดดักก๊าซ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง แบคทีเรียกลุ่ม Heterofermentative จะพบก๊าซในหลอดดักก๊าซ ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม Homofermentative จะไม่พบก๊าซในหลอดดักก๊าซ



ภาคผนวก ค  
ข้อมูลการทดลองและกราฟการเจริญ

ตารางผนวกที่ ๑1 สัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากผัก ผลไม้ และผักสลัดพร้อมบริโภครวม ๒๑ สายพันธุ์

ตัวอย่าง	จำนวนครั้งที่แยกเชื้อ (รหัส) <sup>a</sup>	จำนวนไอโซเลต	รูปร่าง		การผลิตกรดแลคติก		จำนวนไอโซเลตเจริญที่สภาวะต่างๆ						
			rod	coccus	Homo fermentative	Hetero fermentative	10°C	45°C	6.5% NaCl	18% NaCl	pH 4.4	pH 9.6	
1. ผักสด													
มะเขือเทศ	1(V1)	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	
	2(V29-V38)	10	10	0	10	0	1	7	3	0	6	0	
แตงกวา	1(V66-V67)	2	2	0	1	1	1	0	1	0	0	0	
กะหล่ำปลี	1(V151-V174)	24	21	3	24	0	12	7	24	0	8	0	
	2(V175-V210)	37	37	0	37	0	4	15	22	5	21	0	
หอมหัวใหญ่	1(V227-V232)	6	4	2	4	2	0	6	4	2	2	0	
	2(V267-V290)	24	24	0	23	1	2	4	23	22	20	0	
	3(V237-V266)	30	26	4	29	1	11	5	20	0	11	0	
ผักคะน้า	1(V381-V422)	42	42	0	40	2	8	10	39	0	21	0	
	2(V423-V439)	17	15	2	17	0	2	2	17	0	13	0	
ผักบุงจีน	1(V440-V446)	7	7	0	7	0	2	6	1	0	4	0	
	2(V447-V459)	13	13	0	13	0	0	0	11	0	1	0	

ตารางผนวกที่ ๑1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	จำนวนครั้งที่แยกเชื้อ (รหัส) <sup>a</sup>	จำนวนไอโซเลต	รูปร่าง		การผลิตกรดแลคติก		จำนวนไอโซเลตเจริญที่สภาวะต่างๆ					
			rod	coccus	Homo fermentative	Hetero fermentative	10°C	45°C	6.5% NaCl	18% NaCl	pH	
											4.4	9.6
ผักกาดขาว	1(V460-V492)	33	33	0	33	0	18	14	26	9	13	0
	2(V493-V512)	20	15	5	18	2	12	8	12	4	7	0
	3(V513-V539)	27	25	2	27	0	8	7	23	12	18	0
ผักคื่นฉ่าย	1(V540-V573)	34	31	3	34	0	18	7	34	3	13	0
มะเขือยาว	1(V574-V578)	5	5	0	3	2	5	1	2	0	0	0
สลัดแก้ว	2(V583-F594)	12	1	11	12	0	11	10	11	0	0	0
ดอกแค	1(D36-D68)	32	30	2	24	8	10	11	31	18	21	0
2. ผักสลัดพร้อมบริโภค												
มะเขือเทศ	1(V2-V28)	27	26	1	27	0	3	2	27	0	13	0
	2(V39-V62)	24	21	3	23	1	17	3	23	6	9	1
ฟักทอง	1(V63-V65)	3	3	0	2	1	3	0	3	0	0	0
แตงกวา	1(V68-V138)	71	62	9	71	0	48	45	61	0	5	0
ข้าวโพด	1(V139-V141)	3	2	1	3	0	0	1	2	1	2	0

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	จำนวนครั้งที่แยกเชื้อ (รหัส) <sup>a</sup>	จำนวนไอโซเลต	รูปร่าง		การผลิตกรดแลคติก		จำนวนไอโซเลตเจริญที่สภาวะต่างๆ					
			rod	coccus	Homo fermentative	Hetero fermentative	10°C	45°C	6.5% NaCl	18% NaCl	pH 4.4	pH 9.6
กะหล่ำปลี	2(V142-V147)	6	6	0	5	1	5	0	1	1	1	0
มันฝรั่ง	1(V148-V150)	3	1	2	3	0	1	3	2	2	2	0
ถั่วลันเตา	1(V211-V215)	4	1	3	4	0	1	4	3	3	3	0
เผือก	1(V216-V224)	9	9	0	7	2	8	5	3	0	0	0
หอมหัวใหญ่	1(V225-V226)	2	2	0	1	1	1	1	0	0	1	0
บร็อคโคลี่	1(V233-V236)	4	4	0	4	0	0	2	0	0	0	0
พริกหยวก	1(V291-V310)	20	17	3	14	6	8	4	13	12	9	0
หน่อไม้ฝรั่ง	1(V311-V338)	28	17	11	26	2	24	12	16	0	8	0
กรีนโอ๊ค	2(V339-V348)	10	5	5	9	1	7	3	7	0	3	0
กระหล่ำปลี (สีม่วง)	1(V349-V351)	3	3	0	3	0	0	2	1	0	2	0
สลัดแก้ว	1(V352-V363)	12	4	8	12	0	12	8	12	0	0	0
	1(V364-V380)	17	16	1	17	0	9	1	9	0	8	0
	1(V579-V582)	4	3	1	4	0	1	4	1	0	2	0

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	จำนวนครั้งที่แยกเชื้อ (รหัส) <sup>a</sup>	จำนวนไอโซเลต	รูปร่าง		การผลิตกรดแลคติก		จำนวนไอโซเลตเจริญที่สภาวะต่างๆ						
			rod	coccus	Homo fermentative	Hetero fermentative	10°C	45°C	6.5% NaCl	18% NaCl	pH 4.4	pH 9.6	
<b>3. ผลไม้</b>													
สับปะรด	1(F1-F2)	2	0	2	2	0	1	2	1	1	1	0	
	2(F3-F22)	20	20	0	20	0	6	6	20	0	11	0	
	3(F23-F64)	42	40	2	39	3	11	10	34	31	26	0	
แอปเปิ้ล	1(F65-F81)	17	11	6	14	3	16	6	7	0	1	0	
แคนตาลูป	1(F82-F88)	7	0	7	7	0	7	7	7	0	0	0	
	2(F89-F90)	2	0	2	2	0	2	2	2	0	0	0	
<b>4. ดอกไม้</b>													
ดอกดาวเรือง	1(D1-D3)	3	0	3	3	0	3	3	3	0	0	0	
	2(D4-D13)	10	9	1	10	0	7	6	7	3	3	0	
กุหลาบ	1(D14-D23)	10	7	3	6	4	1	2	9	9	7	0	
เขอบีร่า	1(D24-D30)	7	6	1	7	0	4	7	7	3	0	0	
ยิปโซ	1(D31-D32)	2	2	0	2	0	0	0	2	0	0	0	

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	จำนวนครั้งที่แยกเชื้อ (รหัส) <sup>a</sup>	จำนวนไอโซเลต	รูปร่าง		การผลิตกรดแลคติก		จำนวนไอโซเลตเจริญที่สภาวะต่างๆ					
			rod	coccus	Homo fermentative	Hetero fermentative	10 °C	45 °C	6.5% NaCl	18% NaCl	pH 4.4	pH 9.6
แอสเตอร์	1(D33-D35)	3	3	0	3	0	1	1	1	0	0	0
5. วัสดุทางการเกษตร												
กากมัน	1(M1-M18)	18	18	0	18	0	7	8	18	11	9	0
รวม	-	769	659	110	725	44	339	281	607	159	306	1

หมายเหตุ <sup>a</sup>: รหัสเชื้อ KU.....(หมายเลข).....

ตารางผนวกที่ ๑๒ การยับยั้งที่เกิดจากแบคทีเรียกรดแลคติกกับเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี Direct spot

Isolate	Indicator strain																	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
KU-V42	-	+	+	++	+	-	-	+++	++	+	+	+	-	+++	-	++	-	+++
KU-V43	-	+	++	++	++	-	-	+	++	-	++	+	-	+++	-	+	-	++
KU-V141	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	+++	+++	++	+	+	++
KU-V166	+++	-	-	-	+	-	-	-	++	+++	+++	-	++	+	-	-	-	++
KU-V227	+++	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	++	+	+
KU-V232	+	+	+	+	+	++	+	-	++	-	+	+	+	+	++	-	+	+
KU-V234	++	+	+	+	+	+	+	-	+	++	-	-	+	+	++	+	+	+
KU-V289	+	+	++	++	-	+	+	+	+	+	+	++	+	+	++	+	++	+
KU-V290	-	+	-	++	+	++	++	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++
KU-V309	++	-	+	+	+	+	+	-	-	+++	+	++	+	+	++	+	+	+
KU-V349	-	-	-	+	+++	+	-	-	+	++	+	++	+++	+	+++	-	-	++
KU-V477	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+	++	++	+	+	+	+	+	++
KU-V478	-	-	-	+++	++	-	+	-	-	-	-	+++	-	-	-	++	-	++
KU-V479	+	-	-	+++	+	++	++	+	++	+	+++	+	+	+	+	++	++	-
KU-V503	+	+	+	+	+	+	-	++	-	-	+	+	++	+	+	-	++	+

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

Isolate	Indicator strain																	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
KU-V504	+	+	-	+++	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	++	+
KU-V509	++	+	-	+	-	-	-	+	+++	-	+	++	+	-	+	-	+++	++
KU-V537	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	++	+	+	+	+
KU-V538	+	++	+	++	-	+	+	++	+	+++	+	+	+	+	-	+	+	+
KU-V539	-	-	+	-	+	-	-	-	+++	-	+	++	-	++	-	+	+	++
KU-F2	+++	+	-	+	++	++	-	++	+	+	+	+	+++	+++	++	++	++	++
KU-F31	+++	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	++	-	+	-	++
KU-F72	+++	+	-	+	++	+	-	+++	++	+++	++	-	+++	++	+++	++	+++	++
KU-F81	-	-	-	+	+++	+	-	-	+	++	+	++	+++	+	+++	-	-	++
KU-D1	+++	-	-	+	+	-	-	++	+	+	+	+	++	+++	+++	+	+++	++
KU-M1	-	+	+	+	-	+	+	++	++	++	+	+	+	-	+	+	-	++
KU-M2	+	+	+	+	+	++	+	-	+	+++	++	+++	+	+	+	+	+	+
KU-M3	-	+	+	++	-	+	-	+++	-	-	-	+++	+	-	++	+	+	+
KU-M4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+
KU-M5	+	+	+	++	-	+	+	+	++	+	+	++	+	+	+	+	+	+++

ตารางผนวกที่ ๑๒ (ต่อ)

Isolate	Indicator strain																	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
KU-M6	-	+	-	++	++	+	-	-	-	+	+	+	++	-	++	+	+	-
KU-M7	+	-	-	+	-	+	-	++	+	++	+	+	+	+	+	++	+++	++
KU-M8	-	-	++	+	+++	+	-	-	+	++	+	++	+++	+	-	-	+	-
KU-M9	+	+	-	++	+	+	-	-	+	+++	+	+	+	+	++	+	+	++
KU-M10	+	+	+	-	-	+++	-	++	++	++	+	++	-	+	+	+	+	++
KU-M11	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+++	+	++	+	+	+	-	+	++
KU-M12	-	+	++	+	-	+	+	++	+	-	+	++	+	+	+	++	++	++
KU-M13	+	-	+	++	+	+	-	++	++	++	+	+	+	+	+	++	+	++
KU-M14	-	-	+	-	-	+	-	++	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
KU-M15	-	+++	-	+	-	+	++	+++	++	++	+	++	+	+	+	+	+	+
KU-M16	+	+	+	+	-	+	-	-	++	++	+	++	+	+	+	++	++	-
KU-M17	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	++	+	+	+	-	-	-
KU-M18	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ -: ไม่สร้างบริเวณใส, +: สร้างบริเวณใสไม่เกิน 10 มิลลิเมตร, ++: สร้างบริเวณใสตั้งแต่ 11-20 มิลลิเมตร, +++ : สร้างบริเวณใสมากกว่า 20 มิลลิเมตร

A: *Lactobacillus sakei subsp. sakei* JCM 1157, B: *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* JCM 6124, C: *Escherichia coli* JM 109, D: *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM 7638, E: *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536, F: *Enterococcus faecium* JCM 5804, G: *Staphylococcus aureus*, H: *Erwinia carotovora*, I: *Bacillus coagulans* JCM 2257, J: *Bacillus subtilis* JMC 1465, K: *Bacillus circulans* JCM 2504, L: *Micrococcus luteus* IFO 12708, M: *Listeria innocua* ATCC 33090, N: *Pediococcus pentosaceus* JCM 5885, O: *Enterococcus faecalis* JCM 5803, P: *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 19435, Q: *Enterococcus faecium* TUA 1344L, R: *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917

ตารางผนวกที่ ค3 ค่าการเจริญ (LogOD 600nm) ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อและค่ากิจกรรมการยับยั้งของ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 เมื่อเจริญในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

Time (hr.)	Growth (LogOD600)	pH of culture broth	Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>
0	-0.73±0.00	5.86±0.01	0
6	-0.30±0.01	5.75±0.00	0
12	0.42±0.11	5.66±0.01	6,400
15	0.49±0.04	4.53±0.33	12,800
18	0.44±0.10	4.33±0.01	12,800
21	0.44±0.03	4.18±0.05	12,800
24	0.44±0.03	4.17±0.03	12,800

หมายเหตุ <sup>a</sup>: *Listeria monocytogenes* DMST 17303 was used as an indicator strain.

<sup>1</sup>: ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

ตารางผนวกที่ 4 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสร้างสารแบคทีริโอซินของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารเหลว MRS

Temperature/Parameter	Time (hr)					
	0 hr	12 hr	15 hr	18 hr	21 hr	24 hr
7 - 10°C						
OD (600 nm) <sup>1</sup>	0.08±0.00	0.15±0.04	0.18±0.01	0.15±0.00	0.17±0.00	0.17±0.00
pH of culture <sup>1</sup>	5.81±0.00	5.78±0.00	5.80±0.00	5.80±0.00	5.80±0.00	5.80±0.00
Antilisterial activity(AU/ml) <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0
20°C						
OD (600 nm) <sup>1</sup>	0.08±0.00	0.29±0.00	0.46±0.00	1.48±0.01	1.66±0.01	1.68±0.02
pH of culture <sup>1</sup>	5.81±0.00	5.17±0.00	5.04±0.01	4.63±0.00	4.55±0.01	4.54±0.01
Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>	0	200	400	800	800	800
30°C						
OD (600 nm) <sup>1</sup>	0.08±0.00	1.58±0.00	2.22±0.01	2.56±0.01	2.58±0.00	2.54±0.01
pH of culture <sup>1</sup>	5.81±0.00	4.65±0.01	4.48±0.01	4.28±0.01	4.24±0.00	4.22±0.00
Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>	0	6,400	12,800	12,800	12,800	12,800
37°C						
OD (600 nm) <sup>1</sup>	0.08±0.00	1.92±0.00	2.69±0.01	2.73±0.00	2.71±0.00	2.70±0.00
pH of culture <sup>1</sup>	5.80±0.01	4.33±0.00	4.12±0.01	4.11±0.00	4.05±0.00	4.01±0.00
Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>	0	6,400	12,800	12,800	12,800	12,800
42°C						
OD (600 nm) <sup>1</sup>	0.08±0.00	0.98±0.01	1.37±0.00	1.55±0.00	1.52±0.02	1.52±0.02
pH of culture <sup>1</sup>	5.82±0.01	5.01±0.05	4.83±0.02	4.70±0.00	4.63±0.00	4.63±0.00
Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>	0	1,600	3,200	3,200	3,200	3,200

หมายเหตุ <sup>a</sup>: *Listeria monocytogenes* DMST 17303 was used as an indicator strain. <sup>1</sup>: ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ๑๕ ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการเจริญและการสร้างสารแบคทีริโอซินของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารเหลว MRS

pH/ parameter	Time (hr)					
	0 hr	12 hr	15 hr	18 hr	21 hr	24 hr
pH 3						
OD (600 nm) <sup>1</sup>	0.11±0.01	0.29±0.05	0.26±0.02	0.28±0.01	0.25±0.01	0.25±0.00
pH of culture	3.10±0.02	2.97±0.01	2.93±0.03	2.89±0.01	2.86±0.01	2.83±0.01
Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>	0	200	400	400	400	400
pH 5						
OD (600 nm) <sup>1</sup>	0.08±0.01	0.51±0.00	1.38±0.18	1.26±0.09	1.16±0.06	1.24±0.02
pH of culture <sup>1</sup>	5.04±0.08	4.27±0.06	4.07±0.03	4.02±0.04	3.97±0.01	3.95±0.00
Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>	0	1,600	3,200	3,200	3,200	3,200
pH 5.8						
OD (600 nm) <sup>1</sup>	0.19±0.00	3.08±0.04	2.63±0.11	2.78±0.10	2.76±0.03	2.6±0.03
pH of culture <sup>1</sup>	5.86±0.01	5.66±0.01	4.53±0.33	4.33±0.01	4.18±0.05	4.17±0.03
Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>	0	6,400	12,800	12,800	12,800	12,800
pH 7						
OD (600 nm) <sup>1</sup>	0.08±0.00	0.74±0.02	1.56±0.47	1.84±0.34	1.67±0.32	1.88±0.04
pH of culture <sup>1</sup>	7.08±0.14	4.52±0.02	4.36±0.04	4.17±0.03	4.13±0.04	4.03±0.11
Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>	0	3,200	6,400	6,400	6,400	6,400
pH 9						
OD (600 nm) <sup>1</sup>	0.11±0.01	0.25±0.01	0.24±0.00	0.32±0.01	0.30±0.00	0.31±0.01
pH of culture <sup>1</sup>	8.98±0.00	8.95±0.00	8.92±0.00	8.89±0.00	8.83±0.00	8.58±0.00
Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0

หมายเหตุ <sup>a</sup>: *Listeria monocytogenes* DMST 17303 was used as an indicator strain. <sup>1</sup>: ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ๑๖ ผลของปริมาณกลูโคสต่อการเจริญและการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารเหลว MRS

Glucose (%)/ parameter	Time (hr)					
	0 hr	12 hr	15 hr	18 hr	21 hr	24 hr
0% Glucose						
OD (600 nm) <sup>1</sup>	0.06±0.00	0.24±0.04	0.24±0.00	0.24±0.02	0.23±0.00	0.23±0.00
pH of culture <sup>1</sup>	6.96±0.02	6.89±0.01	6.88±0.01	6.84±0.01	6.85±0.02	6.83±0.01
Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>	0	200	400	400	400	400
0.5% Glucose						
OD (600 nm) <sup>1</sup>	0.07±0.00	0.49±0.00	1.56±0.00	1.55±0.00	1.48±0.08	1.48±0.01
pH of culture <sup>1</sup>	6.94±0.00	5.58±0.00	4.97±0.10	4.91±0.00	4.91±0.10	4.89±0.10
Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>	0	1,600	3,200	3,200	3,200	3,200
1.0% Glucose						
OD (600 nm) <sup>1</sup>	0.06±0.00	0.67±0.02	1.40±0.10	1.57±0.01	1.51±0.01	1.54±0.00
pH of culture <sup>1</sup>	6.94±0.01	4.87±0.03	4.31±0.02	4.24±0.01	3.95±0.01	3.93±0.04
Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>	0	3,200	6,400	6,400	6,400	6,400
2.0% Glucose						
OD (600 nm) <sup>1</sup>	0.09±0.000	1.32±0.013	1.75±0.008	1.83±0.028	1.94±0.099	1.93±0.008
pH of culture <sup>1</sup>	6.96±0.01	4.45±0.02	4.05±0.01	4.01±0.01	3.98±0.02	3.95±0.03
Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>	0	6,400	12,800	12,800	12,800	12,800
5.0% Glucose						
OD (600 nm) <sup>1</sup>	0.1±0.00	1.62±0.28	2.23±0.04	2.34±0.02	2.33±0.04	2.35±0.01
pH of culture <sup>1</sup>	6.94±0.03	4.25±0.02	4.06±0.01	3.96±0.01	3.93±0.02	3.89±0.01
Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>	0	1,600	3,200	3,200	3,200	3,200

หมายเหตุ <sup>a</sup>: *Listeria monocytogenes* DMST 17303 was used as an indicator strain. <sup>1</sup>: ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางผนวกที่ ๑๗ ผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการสร้างสารแบคทีริโอซินของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารเหลว MRS

NaCl (%) / parameter	Time (hr)					
	0 hr	12 hr	15 hr	18 hr	21 hr	24 hr
<b>0% NaCl</b>						
OD (600 nm) <sup>1</sup>	0.1±0.00	1.23±0.00	1.30±0.00	1.38±0.00	1.40±0.00	1.38±0.00
pH of culture <sup>1</sup>	6.53±0.00	3.78±0.00	3.59±0.00	3.73±0.00	3.77±0.00	3.73±0.00
Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>	0	6,400	12,800	12,800	12,800	12,800
<b>0.5% NaCl</b>						
OD (600 nm) <sup>1</sup>	0.08±0.00	1.27±0.00	1.37±0.00	1.37±0.00	1.38±0.00	1.37±0.00
pH of culture <sup>1</sup>	6.24±0.00	3.68±0.01	3.64±0.02	3.51±0.00	3.50±0.01	3.49±0.01
Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>	0	6,400	12,800	12,800	12,800	12,800
<b>1.0% NaCl</b>						
OD (600 nm) <sup>1</sup>	0.1±0.000	1.30±0.011	1.30±0.008	1.38±0.020	1.29±0.028	1.38±0.235
pH of culture <sup>1</sup>	6.37±0.01	3.64±0.02	3.56±0.04	3.50±0.01	3.47±0.03	3.47±0.02
Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>	0	6,400	12,800	12,800	12,800	12,800
<b>2.0% NaCl</b>						
OD (600 nm) <sup>1</sup>	0.07±0.00	1.28±0.01	1.30±0.00	1.34±0.00	1.33±0.00	1.31±0.01
pH of culture <sup>1</sup>	6.18±0.00	4.07±0.00	4.07±0.00	3.57±0.00	3.51±0.00	3.50±0.00
Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>	0	6,400	12,800	12,800	12,800	12,800
<b>5.0% NaCl</b>						
OD (600 nm) <sup>1</sup>	0.08±0.00	0.12±0.00	0.22±0.00	0.21±0.00	0.24±0.02	0.24±0.00
pH of culture <sup>1</sup>	6.28±0.00	5.87±0.01	5.96±0.04	5.71±0.01	5.767±0.01	5.62±0.02
Antilisterial activity (AU/ml) <sup>a</sup>	0	200	800	800	800	800

หมายเหตุ <sup>a</sup>: *Listeria monocytogenes* DMST 17303 was used as an indicator strain. <sup>1</sup>: ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

**ตารางผนวกที่ ค8** การทำลายเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ในอาหารเหลว TSBYE เมื่อเติมสารแบคทีริโอซินที่ผลิตโดย *Pediococcus pentosaceus* KU-F2

Time (hr)	ปริมาณเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 (LogCFU/ml) <sup>1</sup>		
	Control (no bacteriocin)	256 (AU/ml)	1024 (AU/ml)
0	7.05±0.12	7.11±0.02	7.19±0.83
9	9.11±0.25	8.52±0.04	6.84±0.06
13	9.25±0.01	8.29±0.49	6.74±0.03
17	9.27±0.02	9.39±0.47	8.49±0.59
21	9.20±0.02	9.08±0.01	8.75±0.02
24	9.04±0.28	9.12±0.03	8.28±0.19

หมายเหตุ <sup>1</sup>: ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

**ตารางผนวกที่ ค9** การยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ในอาหารเหลว TSBYE ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้น 10<sup>2</sup> CFU/ml และเติมสารแบคทีริโอซินที่มีค่ากิจกรรมต่าง ๆ

Time (min)	ปริมาณเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 (LogCFU/ml) <sup>1</sup>			
	Control (no bacteriocin)	128 AU/ml	256 AU/ml	512 AU/ml
0	2.15±0.01	1.72±0.00	1.27±0.06	0
5	2.15±0.06	1.68±0.02	1.09±0.02	0

หมายเหตุ <sup>1</sup>: ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

**ตารางผนวกที่ ค10** การยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ในอาหารเหลว TSBYE ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นต่างกัน และเติมสารแบคทีริโอซินที่มีค่ากิจกรรม 512 AU/ml

ปริมาณเซลล์เริ่มต้น (Log CFU/ml)	ปริมาณเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 (Log CFU/ ml) <sup>1</sup>		
	Control (no bacteriocin)	0 min.	5 min.
2	2.13±0.02	0	0
3	3.16±0.07	1.98±0.05	1.72±0.08
4	4.79±0.00	3.62±0.02	3.40±0.07
5	5.59±0.02	4.49±0.08	4.25±0.06

หมายเหตุ <sup>1</sup>: ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

**ตารางผนวกที่ ค11** การเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ในอาหารเหลว TSBYE และน้ำคั้นแตงกวา เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Time (hr)	ปริมาณเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 (Log CFU/ ml) <sup>1</sup>	
	TSB+ 0.6% YE	Cucumber juice extract
0	3.59±0.08	3.69±0.02
6	5.97±0.03	4.23±0.06
12	7.62±0.10	4.83±0.04
18	8.77±0.04	5.79±0.02
24	9.23±0.07	6.72±0.07

หมายเหตุ <sup>1</sup>: ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

**ตารางผนวกที่ ค12** การศึกษาประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระดับต่ำในน้ำ แดงกวางปลอดเชื้อที่บ่มที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-10 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส)

Time (hr)	7-10°C		30-35°C	
	ปริมาณเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 (Log CFU/ ml) <sup>1</sup>			
	Control (no bacteriocin)	512 AU/ml	Control (no bacteriocin)	512 AU/ml
0	2.57±0.04	0	2.68±0.03	0
3	2.62±0.21	0	2.79±0.04	0
6	2.62±0.16	0	2.84±0.00	0
9	2.54±0.09	0	2.84±0.09	0
12	2.64±0.15	0	3.71±0.02	0
15	2.70±0.26	0	4.27±0.13	0
18	2.70±0.15	0	4.64±0.06	0
21	2.71±0.26	0	5.17±0.24	0
24	2.68±0.07	0	5.62±0.30	0

หมายเหตุ <sup>1</sup>: ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

**ตารางผนวกที่ 13** การศึกษาประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระดับสูง ในน้ำแดงกวางปลอดเชื้อ ที่บ่มที่อุณหภูมิตู้เย็น (7- 0 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส)

Time (hr)	7-10°C		30-35°C	
	ปริมาณเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 (Log CFU/ ml) <sup>1</sup>			
	Control (no bacteriocin)	512 AU/ml	Control (no bacteriocin)	512 AU/ml
0	5.45±0.39	3.26±0.03	5.77±0.10	3.57±0.11
3	5.45±0.36	3.37±0.05	5.75±0.17	2.91±0.03
6	5.39±0.30	3.45±0.06	5.80±0.17	2.73±0.11
9	5.15±0.05	3.45±0.05	6.39±0.18	2.56±0.02
12	5.51±0.48	3.50±0.03	6.58±0.12	3.33±0.29
15	5.49±0.45	3.40±0.10	7.55±0.29	3.78±0.08
18	5.40± 0.22	3.17±0.18	7.85±0.06	4.30±0.15
21	5.50±0.26	3.43±0.16	8.07±0.14	5.60±0.11
24	5.64±0.43	3.47±0.07	8.46±0.10	6.47±0.65

หมายเหตุ <sup>1</sup>: ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

**ตารางผนวกที่ 14** ปริมาณเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่ยึดเกาะบนผิว  
 แดงกวาสด เมื่อแช่ในสารละลายเซลล์ความเข้มข้นต่าง ๆ

ปริมาณเชื้อ <i>L. monocytogenes</i> DMST 17303 ในสารละลายเซลล์	ระยะเวลาการแช่ (นาที)			
	5 min.	10 min.	20 min.	30 min.
4 LogCFU/ml	1.65±0.06 <sup>1</sup>	2.31±0.08 <sup>1</sup>	2.51±0.00 <sup>1</sup>	2.63±0.05 <sup>1</sup>
5 LogCFU/ml	1.78±0.10 <sup>1</sup>	2.35±0.04 <sup>1</sup>	3.66±0.12 <sup>1</sup>	3.84±0.16 <sup>1</sup>
8 LogCFU/ml	5.09±0.09 <sup>1</sup>	5.14±0.00 <sup>1</sup>	5.32±0.03 <sup>1</sup>	5.60±0.09 <sup>1</sup>

หมายเหตุ <sup>1</sup>: ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

**ตารางผนวกที่ 15** ประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes*  
 DMST17303 บนผิวแดงกวาสดที่ระยะเวลาการแช่ต่างๆ

Time (min)	ประสิทธิภาพในการยับยั้ง (%)	
	SDW	SDW+512 AU/ml
5	8.50	96.60
10	27.2	96.93
15	30.30	98.97

**ตารางผนวกที่ 16** ประสิทธิภาพการของสารแบคทีริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Listeria*  
*monocytogenes* DMST 17303 บนผิวแดงกวาสดที่มีการปนเปื้อนเทียมในระดับ  
 ต่ำ (Low contamination) และสูง (High contamination)

Treatment	ประสิทธิภาพการยับยั้ง (%)	
	Low contamination (ประมาณ 2 logCFU/g)	High contamination (ประมาณ 5 logCFU/g)
SDW	6.94	4.96
SDW+512 AU/ml	97.03	26.95
SDW+1,024 AU/ml	97.30	31.56

ตารางผนวกที่ ค17 การศึกษาผลของสารแบคทีริโอซินต่ออายุการเก็บรักษาของแตงกวาสดที่มีการปนเปื้อนเทียมของเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ในระดับต่ำและระดับสูง เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น(7-10 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

ปริมาณเชื้อ <i>L. monocytogenes</i> DMST 17303 (Log CFU/g)				
	Low contamination		High contamination	
	0 Day	7 Day	0 Day	7 Day
Control (no wash)	2.88±0.01 <sup>c</sup>	3.54±0.16 <sup>a</sup>	5.64±0.07 <sup>c</sup>	7.24±0.01 <sup>a</sup>
SDW	2.84±0.02 <sup>b</sup>	3.54±0.28 <sup>a</sup>	5.36±0.04 <sup>b</sup>	7.21±0.04 <sup>a</sup>
SDW+512 AU/ml	1.60±2.49 <sup>a</sup>	0.52±1.21 <sup>b</sup>	4.12±0.06 <sup>a</sup>	3.71±0.07 <sup>b</sup>
SDW+1,024 AU/ml	1.22±2.16 <sup>a</sup>	0.42±1.63 <sup>b</sup>	3.86±0.08 <sup>a</sup>	2.79±0.09 <sup>b</sup>
R <sup>2</sup>	0.995	0.863	0.999	0.999

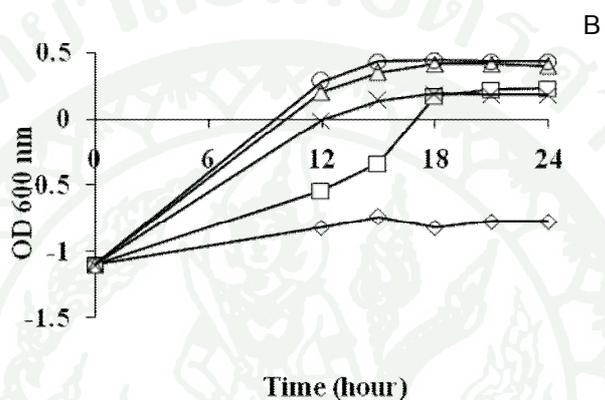
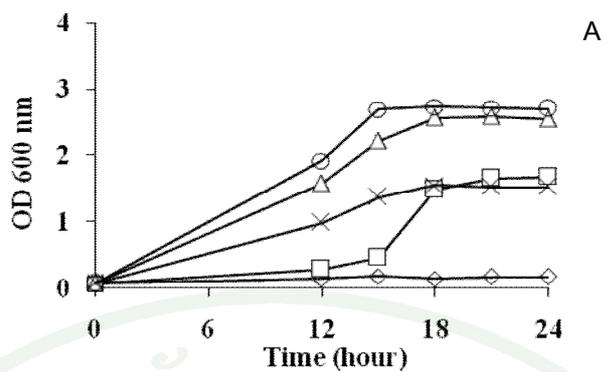
หมายเหตุ<sup>1</sup>: ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

a, b, c: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

R<sup>2</sup>: สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ

ตารางผนวกที่ ค18 การประยุกต์สารแบคทีริโอซินในน้ำประปาเพื่อยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 บนผิวแดงกวาสดที่ระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลา การเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็น	ประสิทธิภาพการยับยั้ง(%)			
	SDW	SDW +512 AU/ml	TAP+ 512 AU/ml	TAP + Sod. Hypochlorite 100 ppm
0 hr	13.54	82.90	71.89	100
4 hr	11.25	82.14	82.68	100
8 hr	11.54	92.24	85.83	100



—◇— T 7-10 °C —□— T 20 °C —△— T 30 °C —○— T 37 °C —×— T 42 °C

ภาพผนวกที่ ๑๑ การเจริญของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU F2 ในอาหารเหลว MRS เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่างๆในสถานะนิ่ง A) OD 600 nm และ B) Log OD 600 nm

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวสุริดา เชื้อพานิช
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 4 มีนาคม พ.ศ. 2526
สถานที่เกิด	กรุงเทพฯ
ประวัติการศึกษา	- มัธยมศึกษาตอนต้นและตอนปลาย โรงเรียนอัมพรไพศาล อ.ปากเกร็ด จ.นนทบุรี พ.ศ. 2544 - วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ว.ท.บ.) (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วิทยาศาสตร์ พ.ศ. 2548
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานทางวิชาการ	สุริดา เชื้อพานิช, นิพนธ์ ทวีชัย, ปทุมพร นิมนต์ และ วรรณมา มาลาพันธุ์ 2552. การคัดเลือกแบคทีเรียกรด แลคติกที่สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซิน และปัจจัยที่มี ผลต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซิน. น. 317-324. ใน เรื่องเต็มการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 47 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สาขาวิทยาศาสตร์) เมื่อวันที่ 17-20 มีนาคม 2552 .
ทุนสนับสนุนการวิจัย	ทุนสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โครงการ ว-ท (ค) 6.49