



การยับยั้งเชื้อ *PSEUDOMONAS* SPP. ที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนในนม
โดยใช้แบคทีริโอเฟจ

INHIBITION OF *PSEUDOMONAS* SPP. PRODUCING HEAT-RESISTANT PROTEASE
IN MILK BY BACTERIOPHAGES

จินจตรี วงศ์อยู่

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2565

การยับยั้งเชื้อ *PSEUDOMONAS* SPP. ที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนในนม
โดยใช้แบคทีเรียโอเฟจ



ปริญญาานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

INHIBITION OF *PSEUDOMONAS* SPP. PRODUCING HEAT-RESISTANT PROTEASE
IN MILK BY BACTERIOPHAGES



RINRATREE WONGYOO

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Applied Microbiology)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2022

Copyright of Srinakharinwirot University

ปรินญาณินพนธ์
 เรื่อง
 การยับยั้งเชื้อ *PSEUDOMONAS* SPP. ที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนในนม
 โดยใช้แบคทีเรียโอเฟจ
 ของ
 รินรตรี วงศ์อยู่

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
 ปรินญาณินพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์
 ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)
 คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปรินญาณินพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
 (รองศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งสุลกะ) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
 (รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รั้งษิรุจิ) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริรักษ์ ศรฉวีรักษ์)

ชื่อเรื่อง	การยับยั้งเชื้อ <i>PSEUDOMONAS</i> SPP. ที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนในนม โดยใช้แบคทีเรียโอเฟจ
ผู้วิจัย	รินรตรี วงศ์อยู่
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. อรอนงค์ พึ่งสุกุลกะ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. อัจฉริยา รังษิรุจิ

การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยอาศัยเฟจถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันและควบคุมการเน่าเสียในผลิตภัณฑ์นม โดยสาเหตุของการเน่าเสียในนมมักเกิดจากเชื้อในกลุ่ม *Pseudomonas* ซึ่งเป็นแบคทีเรียทนเย็นที่มักพบการปนเปื้อนในนมดิบมากที่สุด โดยเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนที่ทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนเคซีนในนมที่ผ่านการความร้อน ทำให้เน่าเสีย การศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรีย *Pseudomonas* จากนมและนำมาศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องได้แก่ ยีน *aprX* และกิจกรรมของเอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้น จากการศึกษาพบว่า สามารถแยกเชื้อ *Pseudomonas* ที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสและตรวจพบยีน *aprX* ได้ 14 สายพันธุ์ โดยทุกสายพันธุ์จะถูกใช้เป็นโฮสต์ในการคัดแยกเฟจ โดยสามารถคัดแยกเฟจได้ 3 ตัว ได้แก่ Φ C106, Φ 21A และ Φ 1887 เมื่อใช้เชื้อ *P. mosselii* C24, *P. mosselii* N1 และ *P. fluorescens* TISTR 1887 เป็นโฮสต์ ตามลำดับ การศึกษารูปร่างของเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงให้เห็นว่าเฟจ Φ C106 และ Φ 21A จัดอยู่ในแฟมิลี *Podoviridae* และ เฟจ Φ 1887 จัดอยู่ในแฟมิลี *Myoviridae* โดยเฟจ Φ C106 และ Φ 21A มีความสามารถในการติดเชื้อ *Pseudomonas* ได้มากที่สุด อัตราส่วนของเฟจต่อโฮสต์ที่เหมาะสมในการติดเชื้อของเฟจ Φ C106 และ Φ 21A เท่ากับ 10 จากกราฟการเจริญของเฟจแสดงให้เห็นว่าเฟจ Φ C106 และ Φ 21A มีช่วง latent period เท่ากับ 20 นาที และ burst sizes เท่ากับ 1,862 และ 331 PFUs/infected cells ตามลำดับ โดยเฟจ Φ C106 and Φ 21A มีความเสถียรต่อ pH และอุณหภูมิในช่วงกว้าง จากผลการศึกษากายยับยั้งเชื้อ *P. mosselii* C24 และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยเฟจ Φ C106 และ Φ 21A ในรูปแบบเดี่ยวและแบบผสม พบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียได้มากที่สุดเท่ากับ 4-5 log CFU/ml และสามารถลดกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสได้มากที่สุดเท่ากับ 0.01 unit ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเฟจทั้งสองตัวมีประสิทธิภาพในการควบคุม *P. mosselii* ที่เป็นสาเหตุในการเน่าเสียในผลิตภัณฑ์นม และจากการศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของ *P. mosselii* C24 พบว่าโครโมโซมมีความยาว 5,754,740 คู่เบส และพบยีนที่แสดงออกเป็นเอนไซม์โปรติเอสที่หลากหลาย สำหรับลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจ Φ C106 และ Φ 21A พบว่าเป็นดีเอ็นเอเส้นตรงสายคู่ มีความยาว 36,127 คู่เบส และ 39,716 คู่เบส ตามลำดับ โดยเฟจทั้งสองดังกล่าวไม่พบ ORF ที่แสดงออกเป็นโปรตีน toxin, virulence factor และยีนต้านยาปฏิชีวนะ รวมถึงไม่พบกลุ่มยีนที่จำเป็นใน lysogenic cycle แสดงให้เห็นว่า เฟจทั้งสองตัวจัดเป็น virulent phage และสามารถนำไปใช้ควบคุมเชื้อ *P. mosselii* ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในนมได้อย่างปลอดภัย

คำสำคัญ : *Pseudomonas mosselii*, เอนไซม์โปรติเอสทนร้อน, ตัวควบคุมชีวภาพ, นม, ลำดับจีโนมทั้งหมด

Title	INHIBITION OF <i>PSEUDOMONAS</i> SPP. PRODUCING HEAT-RESISTANT PROTEASE IN MILK BY BACTERIOPHAGES
Author	RINRATREE WONGYOO
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2022
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Onanong Pringsulaka
Co Advisor	Associate Professor Dr. Achariya Rangsiruji

Phage-based biocontrol is an alternative method for preventing and controlling spoilage in dairy products. Milk spoilage is often caused by *Pseudomonas*, which are predominant in raw milk. These bacteria are psychrotrophic and can produce heat-resistant protease that degrades casein proteins, leading to spoilage in heat-treated milks. This study aims to isolate *Pseudomonas* strains from milk and examine their ability to produce heat-stable protease. The genes *aprX* and enzyme activity of the isolated strains were also investigated. The study showed that 14 *Pseudomonas* strains were capable of producing protease and possessed the *aprX* gene. All strains were used as hosts for phage isolation, resulting in three phages, namely Φ C106, Φ 21A, and Φ 1887, which could infect *P. mosselii* C24, *P. mosselii* N1, and *P. fluorescens* TISTR 1887, respectively. Transmission electron microscopy revealed that Φ C106 and Φ 21A belonged to the *Podoviridae* family, while Φ 1887 belonged to the *Myoviridae* family. Phages Φ C106 and Φ 21A had a broad host range against *Pseudomonas* strains. The optimal multiplicity of infection (MOI) of Φ C106 and Φ 21A was 10. The one-step growth curve analysis of both phages showed that Φ C106 and Φ 21A have a latent period of 20 minutes and burst sizes calculated to be 1,862 and 331 PFUs/infected cells, respectively. These phages are stable over a wide range of pH and temperature. *In vitro* lytic activity and proteolytic activity of phages Φ C106 and Φ 21A against *P. mosselii* C24 revealed both individual phages and phage cocktail were able to reduce the number of bacterial cells by 4-5 log CFU/ml and reduce the activity of protease by 0.01 unit. The complete genome of *P. mosselii* C24 comprises one circular chromosome with a length of 5,754,740 and encodes a variety of protease genes. In addition, phage Φ C106 and Φ 21A genomes consist of linear double-stranded with a length of 36,127 and 39,716 bp, respectively. Neither phage was found to have ORFs encoding toxin proteins, antibiotic-resistant genes (ARGs), virulence factors (VFs) of bacterial origin, or genes necessary for the lysogenic cycle, indicating that both phages are virulent phages and can control *P. mosselii* spoilage. This study indicated that the phages are efficient in controlling the prevalence of spoilage-causing *P. mosselii* strains in dairy and food-related environments.

Keyword : *Pseudomonas mosselii*, Heat-stable protease, biocontrol, milk, whole genome

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร. อรอนงค์ พริ้งสุลกะ ที่ปรึกษาหลัก และรองศาสตราจารย์ ดร. อัจฉริยา รังษิรุจิ ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษา และคำแนะนำ พร้อมทั้งตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ และได้ให้การสนับสนุน แก่ผู้วิจัยในทุกด้าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐฐิกา สุวรรณาศรัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริรักษ์ ศรวณียารักษ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขวัญนันท์ นันทวิสัย ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบเค้าโครงวิทยานิพนธ์ ให้คำปรึกษาและ ข้อเสนอแนะเพิ่มเติมสำหรับการแก้ไขและปรับปรุงวิทยานิพนธ์ รวมทั้งคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ใน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ช่วยประสิทธิ์ประสาทวิชาและ อำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. สิริฉัตร สุนทรธรรมาสัน ที่ได้ช่วยสอนเทคนิคการทำวิจัย การ วิเคราะห์ผลที่ได้ และช่วยแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นจากงานวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คมวิทย์ สุรชาติ ที่ได้ช่วยสอนและให้ คำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์ข้อมูลและการหาลำดับจีโนมทั้งหมดของแบคทีเรียและแบคทีเรีย โอเฟจ พร้อมทั้งช่วยตรวจทานแก้ไขผลการวิเคราะห์ที่ได้

ขอกราบขอบพระคุณคุณทัศนีย์ อติเทพ ที่ได้เสียสละเวลาในการวิเคราะห์ลักษณะ สันฐานวิทยาของเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พร้อมทั้งช่วยให้คำแนะนำผล การวิเคราะห์ที่ได้

ขอกราบขอบพระคุณครอบครัววงศ์อยู่ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัย ทำให้ผู้วิจัยไม่มีความกังวลในเรื่องปัญหาอื่น ๆ ในระหว่างการศึกษา

ขอบคุณเพื่อน ๆ และน้อง ๆ ที่เคยร่วมงาน ร่วมทุกข์ ร่วมสุข และให้คำปรึกษาในเรื่องต่าง ๆ

รินรตรี วงศ์อยู่

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ความสำคัญของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	5
1.นม (milk) และองค์ประกอบของนม.....	5
2. กระบวนการฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนในนม.....	6
2.1 กระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ (Pasteurization).....	6
2.2 กระบวนการสเตอริไลซ์ (Sterilization).....	7
2.3 กระบวนการยูเอชที (Ultra - high temperature (UHT) processing).....	7
3. การนำเสียในนม.....	8
4. การปนเปื้อนของแบคทีเรียในนมดิบ.....	8
4.1 <i>Pseudomonas</i> species.....	10

5. เอนไซม์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในนม	13
5.1 เอนไซม์โปรติเอสที่สร้างจากเชื้อ <i>Pseudomonas</i>	14
5.2 วิธีการควบคุมการเน่าเสียในนมจากเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย	18
5.3 การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส	19
6. แบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage).....	20
6.1 โครงสร้างของเฟจ.....	20
6.2 การจัดจำแนกเฟจ	21
6.3 วงชีวิตของเฟจ	27
6.4 กราฟการเจริญของเฟจ (one - step growth curve).....	30
6.5 การศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจ	31
6.6 การประยุกต์ใช้เฟจในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในนม	31
6.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการติดเชื้อของเฟจ.....	33
6.8 แนวทางความปลอดภัยในการประยุกต์ใช้เฟจ.....	37
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	38
เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	38
สารเคมี และ อาหารเลี้ยงเชื้อ	38
อุปกรณ์เพิ่มเติม	39
Molecular marker	40
สายพันธุ์อ้างอิง (Reference strains)	40
วิธีการทดลอง.....	40
1. การตัดแยกเชื้อ <i>Pseudomonas</i>	40
2. การจัดจำแนกเชื้อ <i>Pseudomonas</i>	41
2.1 การจัดจำแนกเชื้อโดย Biochemical test	41

2.2 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Pseudomonas</i>	41
2.3 การจำแนกสปีชีส์โดยอาศัยลำดับคู่เบสบริเวณ 16S rRNA gene.....	42
2.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการจัดกลุ่ม	44
3. การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสเบื้องต้น.....	44
4. การตรวจหายีน <i>aprX</i>	44
5. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส	45
6. การทดสอบการเจริญของเชื้อและกิจกรรมการย่อยโปรตีนที่เกิดขึ้นในอาหาร skim milk	46
7. การวิเคราะห์หีมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธี zymography	46
8. การคัดแยกเฟจ	47
9. การทำเฟจให้บริสุทธิ์.....	47
10. การเพิ่มจำนวนเฟจ.....	47
11. การตรวจสอบความสามารถของเฟจในการติดเชื้อ.....	48
12. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	48
13. การหาอัตราส่วนของเฟจต่อโฮสต์ที่เหมาะสมในการติดเชื้อ.....	48
14. การศึกษากราฟการเจริญของเฟจ.....	49
15. การศึกษาความเสถียรของเฟจ	50
16. การทดสอบการยับยั้งเชื้อ <i>Pseudomonas</i> ในระดับห้องปฏิบัติการ	50
17. การสกัดดีเอ็นเอของเฟจ.....	51
18. การหาลำดับจีโนมทั้งหมด	52
18.1 การหาลำดับจีโนมทั้งหมดของ <i>Pseudomonas</i>	52
18.2 การหาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจ	52
19. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเฟจ.....	53

20. การทดสอบทางสถิติ	53
บทที่ 4 ผลการทดลอง	54
1. การคัดแยกเชื้อ <i>Pseudomonas</i>	54
2. การจัดจำแนกสายพันธุ์ของ <i>Pseudomonas</i> ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุด	57
3. การตรวจสอบยีน <i>aprX</i>	58
4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด	60
5. การตรวจสอบระดับปริมาณเชื้อ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเอสที่ส่งผลให้เกิดการตกตะกอนในนม.....	60
6. การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธี zymography	62
7. การคัดแยกเฟจ.....	63
8. การตรวจสอบความสามารถของเฟจในการติดเชื้กับเชื้อสายพันธุ์ต่าง ๆ.....	64
9. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟจ	67
10. การหาอัตราส่วนของเฟจต่อโฮสต์ที่เหมาะสมในการติดเชื้อ	68
11. การศึกษากราฟการเจริญของเฟจ	69
12. การศึกษาความเสถียรของเฟจ.....	71
12.1 การศึกษาความเสถียรต่อ pH ของเฟจ	71
12.2 การศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิของเฟจ.....	71
13. การทดสอบการยับยั้งเชื้อ <i>Pseudomonas</i> ในระดับห้องปฏิบัติการ และการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส	75
14. การหาลำดับจีโนมทั้งหมด.....	83
14.1 การหาลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อ <i>Pseudomonas</i>	83
14.2 การหาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจ	86
15. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเฟจ	90

บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	91
บรรณานุกรม.....	100
ประวัติผู้เขียน.....	102
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	117
ภาคผนวก ข บัฟเฟอร์และสารเคมี	120
ภาคผนวก ค บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับการทำ zymography.....	123
ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐาน.....	127



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 รายงานการพบเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>Pseudomonas</i> ในผลิตภัณฑ์นมและผลที่เกิดขึ้น	17
ตาราง 2 การจัดจำแนกเฟจโดย International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV)..	25
ตาราง 3 รายงานผลของอุณหภูมิและ pH ต่อเฟจ	35
ตาราง 4 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ <i>Pseudomonas</i>	41
ตาราง 5 ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA gene	43
ตาราง 6 ขั้นตอนการทำ PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA gene	43
ตาราง 7 ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน <i>aprX</i>	44
ตาราง 8 ขั้นตอนการทำ PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน <i>aprX</i>	45
ตาราง 9 อัตราส่วนของค่า Multiplicity of infection (MOI) ที่ใช้ในการศึกษา	49
ตาราง 10 การจัดจำแนกเชื้อ <i>Pseudomonas</i> โดยอาศัยการติดสีแกรมลบ การทดสอบทางชีวเคมี และการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส.....	56
ตาราง 11 การสร้างเอนไซม์โปรติเอสในเชื้อ <i>Pseudomonas</i> สายพันธุ์อ้างอิง	57
ตาราง 12 การจำแนกเชื้อ <i>Pseudomonas</i> ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุด โดยอาศัย ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI	58
ตาราง 13 การตรวจสอบหาปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดการตกตะกอนในนม และค่ากิจกรรมของ เอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> 3 สายพันธุ์ ในอาหาร skim milk.....	61
ตาราง 14 การคัดแยกแบคทีเรียโอเฟจจากตัวอย่างน้ำคลองแสนแสบ	63
ตาราง 16 ความสามารถของเฟจในการติดเชื้อ <i>Pseudomonas</i> สายพันธุ์ต่าง ๆ	65
ตาราง 15 ขนาดของพลาแคและขนาดของเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ...	67
ตาราง 17 แสดงอัตราส่วนของเฟจต่อโฮสต์ที่เหมาะสมในการติดเชื้อ	69

ตาราง 18 การลดลงของเชื้อ P. mosselii C24 และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เมื่อมีการใช้เฟจ ΦC106 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้เฟจ	80
ตาราง 19 การลดลงของเชื้อ P. mosselii C24 และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เมื่อมีการใช้เฟจ Φ21A เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้เฟจ.....	81
ตาราง 20 การลดลงของเชื้อ P. mosselii C24 และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เมื่อมีการใช้เฟจผสม เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้เฟจผสม.....	82
ตาราง 21 ยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์โปรติเอสในลำดับจีโนมของเชื้อ P. mosselii C24.....	85
ตาราง 22 การวิเคราะห์ตำแหน่งยีนและระบุหน้าที่ของยีนของเฟจ ΦC106 โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในNCBI	88
ตาราง 23 การวิเคราะห์ตำแหน่งยีนและระบุหน้าที่ของยีนของเฟจ Φ21A โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI.....	89
ตาราง 24 สรุปผลการลดลงของเชื้อ P. mosselii และกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสโดยเฟจ ΦC106 และ Φ21A ในรูปแบบเดี่ยวและแบบผสม	96

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 โครงสร้างของ <i>aprX</i> operon ⁽⁵⁹⁾	15
ภาพประกอบ 2 <i>AprX</i> protein ⁽⁵⁹⁾	16
ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของเฟจ ⁽⁸¹⁾	21
ภาพประกอบ 4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเฟจในแฟมิลีต่าง ๆ ⁽⁸²⁾	22
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของเฟจมีหาง (tailed phage) ในแฟมิลี <i>Myoviridae</i> , <i>Siphoviridae</i> และ <i>Podoviridae</i> ⁽⁸⁴⁾	26
ภาพประกอบ 6 วงชีวิตแบบไลติก ⁽⁹³⁾	28
ภาพประกอบ 7 วงชีวิตของไลโซเจนิกเฟจ ⁽⁹³⁾	29
ภาพประกอบ 8 กราฟการเจริญของเฟจ ⁽⁹⁷⁾	30
ภาพประกอบ 9 ปัจจัยที่มีผลต่อการติดเชื้อของเฟจ ⁽⁸⁴⁾	37
ภาพประกอบ 10 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>Pseudomonas</i> sp.	54
ภาพประกอบ 11 ลักษณะไซนัสจากการย่อย skim milk	55
ภาพประกอบ 12 การตรวจสอบยืนยัน <i>aprX</i> ที่สร้างจาก <i>Pseudomonas</i> สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สามารถ สร้างเอนไซม์โปรติเอส	59
ภาพประกอบ 13 การตรวจสอบยืนยัน <i>aprX</i> ที่สร้างจาก <i>Pseudomonas</i> สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สามารถ สร้างเอนไซม์โปรติเอส (ต่อ).....	59
ภาพประกอบ 14 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเชื้อ <i>Pseudomonas</i>	60
ภาพประกอบ 15 การตกตะกอนโปรตีนในอาหาร skim milk	61
ภาพประกอบ 16 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธี zymography	62
ภาพประกอบ 17 ตัวอย่างลักษณะพลาค	64
ภาพประกอบ 18 ลักษณะพลาคของเฟจ	67

ภาพประกอบ 19 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟจ.....	68
ภาพประกอบ 20 กราฟการเจริญของเฟจ.....	70
ภาพประกอบ 21 ความเสถียรต่อค่า pH ของเฟจ.....	72
ภาพประกอบ 22 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเฟจในอาหาร NB.....	73
ภาพประกอบ 23 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเฟจในอาหาร skim milk	74
ภาพประกอบ 24 กราฟการลดลงของเชื้อ <i>P. mosselii</i> C24 และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เมื่อมีการใช้เฟจ ΦC106 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้เฟจ.....	77
ภาพประกอบ 25 กราฟการลดลงของเชื้อ <i>P. mosselii</i> C24 และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เมื่อมีการใช้เฟจ Φ21A เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้เฟจ	78
ภาพประกอบ 26 การลดลงของเชื้อ <i>P. mosselii</i> C24 และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เมื่อมีการ ใช้เฟจผสม เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้เฟจผสม.....	79
ภาพประกอบ 27 แผนภาพจีโนมทั้งหมดของ <i>P. mosselii</i> C24.....	84
ภาพประกอบ 28 แผนภาพจีโนมทั้งหมดของเฟจ ΦC106 และ Φ21A.....	87
ภาพประกอบ 29 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเฟจ ΦC106 และ Φ21A	90
ภาพประกอบ 30 กราฟมาตรฐานจากอาหาร NB.....	127
ภาพประกอบ 31 กราฟมาตรฐานจากอาหาร skim milk	127

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

อุตสาหกรรมการผลิตนมโคถือเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ โดยในช่วงปี 2558 - 2562 ความต้องการบริโภคนมในตลาดโลกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น⁽¹⁾ สำหรับในประเทศไทย ในช่วงปีดังกล่าว จำนวนโคนมทั้งหมดของไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นร้อยละ 6.61 ต่อปี ประกอบกับภาครัฐมีนโยบายพัฒนาคุณภาพนมโค เน้นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต ส่งผลให้นมดิบมีปริมาณเพิ่มขึ้นและมีคุณภาพดีขึ้น รวมทั้งราคานมดิบอยู่ในเกณฑ์ดี⁽²⁾ จึงจูงใจให้เกษตรกรมีการพัฒนาการเลี้ยงโคนมและควบคุมคุณภาพนมให้เป็นไปตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 420) พ.ศ. 2563 ว่าด้วยเรื่อง วิธีการผลิต เครื่องมือที่ใช้ในการผลิต และการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์นมพร้อมบริโภคที่ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนด้วยวิธีพาสเจอร์ไรซ์ (Pasteurization) และวิธียูเอชที (Ultra - high temperature (UHT) processing)⁽³⁾ อย่างไรก็ตาม แม้ว่านมจะผ่านกระบวนการให้ความร้อนแล้ว แต่การเน่าเสียของผลิตภัณฑ์นมที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนแล้วยังสามารถเกิดขึ้นได้ เนื่องจากการปนเปื้อนเชื้อที่สร้างสปอร์ที่ทนความร้อนสูงและจากเอนไซม์ที่ทนร้อนที่ยังคงหลงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ โดยเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์โปรตีนเอสเทอร์ร้อนได้แก่ *Pseudomonas*⁽⁴⁾ ที่สามารถย่อยสลายเคซีนในนมทำให้เกิดรสขมและรสขม เกิดลักษณะเป็นเจล (gelation) มีกลิ่นผิดปกติ และทำให้อายุการเก็บสั้นลง เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ทนเย็น (psychrotrophic bacteria) สามารถเจริญในอุณหภูมิเย็นได้ โดยเอนไซม์โปรตีนเอสเทอร์ร้อนที่เชื้อสร้างขึ้นนั้นสามารถคงสภาพในอุณหภูมิในช่วงกว้าง และการให้ความร้อนในนมทั้งการพาสเจอร์ไรซ์ (63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที) และการใช้อุณหภูมิยูเอชที (ประมาณ 138 - 145 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 - 10 วินาที) ถึงแม้จะทำลายเชื้อ *Pseudomonas* ได้แต่ไม่เพียงพอในการทำลายเอนไซม์ดังกล่าว⁽⁵⁾

ในช่วงศตวรรษที่ 20 เป็นต้นมา การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีริโอเฟจหรือเฟจในการนำไปใช้เป็นตัวช่วยยับยั้ง ควบคุม หรือทำลายแบคทีเรียก่อโรคได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก⁽⁶⁾ การใช้เฟจ (phage therapy) ซึ่งเป็นไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในแบคทีเรียจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการควบคุมเชื้อ *Pseudomonas* ซึ่งพบว่าเฟจมีข้อได้เปรียบ⁽⁷⁾ คือ

1. เฟจมีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย
2. ไม่ส่งผลเสียหรือผลข้างเคียงมายังมนุษย์
3. ไม่ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม โดยจะติดเชื้อเฉพาะแบคทีเรียจำเพาะเท่านั้น
4. เฟจสามารถทนอยู่ในสภาวะที่หลากหลาย
5. ถึงแม้ว่าอาจเกิดเชื้อสายพันธุ์กลายที่ติดต่อการติดเชื้อด้วยเฟจ แต่สายพันธุ์กลายเหล่านั้นส่วนใหญ่กลับไปเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อเฟจหลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงทำให้ไม่เกิดปัญหาการติดของแบคทีเรียต่อเฟจ
6. การใช้ phage therapy เป็นวิธีควบคุมที่รวดเร็วและไม่แพง

การใช้เฟจในการกำจัดและป้องกันการติดเชื้อของแบคทีเรานั้น ได้ประสบความสำเร็จทั้งในการรักษาการติดเชื้อทั้งในคนและสัตว์⁽⁸⁾ อย่างไรก็ตาม การใช้เฟจในระดับอุตสาหกรรมยังมีน้อยมาก โดยเฉพาะการใช้เฟจในการควบคุมการเน่าเสียของเชื้อ *Pseudomonas* ในอาหารทั้ง ๆ ที่พบการเน่าเสียที่เกิดจาก *Pseudomonas* ในอาหารจำนวนมาก ซึ่งนอกจากเชื้อ *Pseudomonas* จะทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารและนมดิบเกิดการเน่าเสียแล้ว เชื้อกลุ่มนี้ยังสร้างเอนไซม์ที่ร้อนโดยเฉพาะเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งจะส่งผลเสียดังกล่าวข้างต้น ทั้งยังก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมนมและเศรษฐกิจตามมา ซึ่งการศึกษานี้จะคัดแยกเฟจที่สามารถทำลายเชื้อ *Pseudomonas* ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสที่ร้อน ศึกษาลักษณะของเฟจที่แยกจาก *Pseudomonas* ศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อ *Pseudomonas* ที่ใช้ในการแยกเฟจและเฟจที่แยกได้ ทดสอบการลดจำนวนเชื้อและลดการสร้างเอนไซม์ของเชื้อในระดับห้องปฏิบัติการโดยใช้เฟจแบบเดี่ยว (single phage) และแบบผสม (phage cocktail) โดยข้อมูลที่ได้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมนมและโรงงานแปรรูปผลิตภัณฑ์นมต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อแยกเชื้อ *Pseudomonas* spp. ที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสที่ร้อน ศึกษาการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสที่ร้อน (*aprX*) วัดกิจกรรมการย่อยโปรตีนของเอนไซม์โปรติเอสที่สร้างจากเชื้อ รวมทั้งศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดเพื่อตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ

2. เพื่อแยก คีซารูปปร่าง ความสามารถในการติดเชื้อใน *Pseudomonas* สายพันธุ์อื่น อัตราส่วนของเฟลจที่เหมาะสมในการติดเชื้อ กราฟการเจริญของเฟลจ และความเสถียรต่อ pH และ อุณหภูมิของเฟลจที่แยกได้

3. เพื่อศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟลจเพื่อศึกษาความปลอดภัยของเฟลจก่อนนำไปใช้

4. เพื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* spp. ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้ เฟลจแบบเดี่ยวและแบบผสมเพื่อลดจำนวนเชื้อและลดการสร้างเอนไซม์โปรติเอสที่เชื้อสร้างขึ้น

ความสำคัญของงานวิจัย

การใช้เฟลจในการควบคุมการติดเชื้อในคนและสัตว์ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก⁽⁹⁾ การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่มีข้อได้เปรียบหลายด้าน เช่น มาจากธรรมชาติ ราคาไม่แพง และไม่พบ ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะหรือผลข้างเคียงอื่น⁽¹⁰⁾ การนำเฟลจมาใช้ทางอุตสาหกรรมได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีการพบแบคทีเรียก่อโรคหรือแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียที่ทนต่อ สารที่ทำลายเชื้อรวมถึงพบแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้น ทำให้การทำลายเชื้อเป็นไปได้ยากขึ้น⁽¹¹⁾ ถึงแม้ว่าการศึกษาจำนวนมากเกี่ยวกับการนำเฟลจมาใช้ในการควบคุมเชื้อก่อโรค แต่ การใช้เฟลจในการควบคุมเชื้อ *P. mosselii* ที่แยกได้จากนมและสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสที่ทนร้อนยังไม่มีรายงานก่อนหน้านี้ ซึ่งหากแยกเฟลจที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ ดังกล่าวจะช่วยให้ สามารถควบคุมการเน่าเสียของอาหารที่เกิดจากเชื้อและเอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้นโดยไม่ต้องใช้ยา ปฏิชีวนะหรือสารเคมี และคาดว่าเฟลจที่แยกได้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมเชื้อ ดังกล่าวในอุตสาหกรรมนมและโรงงานแปรรูปผลิตภัณฑ์นมต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

แยกเชื้อ *Pseudomonas* spp. ที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสที่ทนร้อน และศึกษาการแสดงออก ของยีนที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสที่ทนร้อน (*aprX*) รวมทั้งตรวจวัดกิจกรรมการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ โปรติเอสที่ทนร้อนที่สร้างจากเชื้อ จากนั้นแยกเฟลจที่จำเพาะต่อเชื้อ *Pseudomonas* spp. จากแหล่ง น้ำ คัดเลือกเฟลจที่สามารถยับยั้งเชื้อได้กว้างไปศึกษารูปปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ ส่องผ่าน ศึกษาอัตราส่วนของเฟลจที่เหมาะสมในการติดเชื้อ กราฟการเจริญของเฟลจ ความเสถียร ของเฟลจต่อ pH และอุณหภูมิ รวมทั้งศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของ *Pseudomonas* ที่ใช้แยกเฟลจ และเฟลจโดยวิธี next generation sequencing และนำเฟลจที่คัดเลือกได้ไปทดสอบการยับยั้งเชื้อ

Pseudomonas ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้เฟจแบบเดี่ยวและแบบผสมเพื่อลดจำนวนเชื้อและลดการสร้างเอนไซม์โปรติเอสที่เชื้อสร้างขึ้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เฟจที่แยกได้จะสามารถนำไปเป็นข้อมูลหรือประยุกต์ใช้ในการลดจำนวนเชื้อ *Pseudomonas* และลดการสร้างเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อในอุตสาหกรรมนมและโรงงานแปรรูปผลิตภัณฑ์นมต่อไป



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

1. นม (milk) และองค์ประกอบของนม

นมหรือนมเป็นของเหลวที่หลั่งออกมาจากต่อมนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพศเมีย เพื่อเป็นแหล่งอาหารของทารกแรกเกิดของเผ่าพันธุ์ นมประกอบด้วยองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้⁽¹²⁾

1. โปรตีน (milk protein) นมมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบทั้งหมดร้อยละ 3.3 ประกอบด้วยโปรตีน 2 ประเภท ได้แก่ โปรตีนเคซีนและโปรตีนเวย์หรือซีรัม โดยมีสัดส่วนของโปรตีนเคซีนร้อยละ 82 และโปรตีนเวย์ ร้อยละ 18 ในส่วนของโปรตีนเคซีนประกอบด้วยเคซีนหลายชนิด ได้แก่ แอลฟาเคซีน (α -s1-, α -s2-casein) เบตาเคซีน (β -casein) และแคปปาเคซีน (κ -casein) โดยแต่ละชนิดมีลำดับกรดอะมิโนและคุณสมบัติในการทำงาน (functional properties) ที่แตกต่างกัน และโปรตีนเคซีนจะเสถียรต่อความร้อน ในส่วนของโปรตีนเวย์หรือซีรัมประกอบด้วย β -lactoglobulin และ α -lactalbumin เป็นหลักซึ่งมีสัดส่วนของ β -lactoglobulin ร้อยละ 50 และ α -lactalbumin ร้อยละ 20 นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบของ blood serum albumin, immunoglobulins, lactoferrin, transferrin โปรตีนขนาดเล็กและเอนไซม์ โดยโปรตีนเวย์จะไวต่อความร้อนมากกว่าโปรตีนเคซีน

2. ไขมัน (milk fat) นมประกอบด้วยไขมันทั้งหมดประมาณร้อยละ 3.4 ไขมันนมจะอยู่ในรูปของอนุภาคเม็ดไขมัน (fat globule) แขนงลอยในลักษณะอิมัลชัน (emulsion) โดยไขมันนมมีองค์ประกอบของกรดไขมันที่ซับซ้อนที่สุดของไขมันที่บริโภคได้ กรดไขมันหลักในไขมันนมเป็นกรดไขมันแบบโซ่ตรงชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) ที่มีคาร์บอน 4 ถึง 18 ตัว (4:0, 6:0, 8:0, 10:0, 12:0, 14:0, 16:0, 18:0) นอกจากนี้ยังพบกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 1 พันธะ (monounsaturated fatty acid) ที่มีคาร์บอน 16 และ 18 (16:1, 18:1) และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายพันธะ (polyunsaturated fatty acid) ที่มีคาร์บอน 18 (18:2, 18:3) กรดไขมันบางตัวพบได้ในปริมาณน้อย แต่มีส่วนทำให้ไขมันและเนยนมมีรสชาติที่เป็นเอกลักษณ์และเป็นที่ต้องการ เช่น C14:0 และ C16:0 β -hydroxy fatty acids ทำให้เกิดแลคโตนตามธรรมชาติเมื่อได้รับความร้อนซึ่งช่วยเพิ่มรสชาติของเนย

3. คาร์โบไฮเดรต นมประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตประมาณร้อยละ 4.9 โดยมีน้ำตาลแลคโตสมากที่สุด โดยน้ำตาลแลคโตสจะละลายอยู่ในชั้นของซีรัมของนม กระบวนการฆ่าเชื้อในนมด้วยวิธีพาสเจอร์ไรซ์จะไม่มีผลต่อน้ำตาลแลคโตส แต่กระบวนการฆ่าเชื้อในนมด้วยวิธียูเอชที อาจทำให้เกิดรสชาติและสีที่ไม่พึงประสงค์ เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล (browning reaction)

หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ระหว่างน้ำตาลแลคโตสกับโปรตีนในนม

4. วิตามิน นมประกอบด้วยวิตามินต่าง ๆ ทั้งวิตามินที่ละลายในน้ำ ได้แก่ thiamin (vitamin B1), riboflavin (vitamin B2), niacin (vitamin B3), pantothenic acid (vitamin B5), pyridoxine (vitamin B6), cobalamin (vitamin B12), vitamin C, folate และวิตามินที่ละลายในไขมัน ได้แก่ vitamin A, vitamin D, vitamin E และ vitamin K ปริมาณของวิตามินที่ละลายในไขมันในผลิตภัณฑ์นมจะแปรผันตามปริมาณไขมันของผลิตภัณฑ์ โดยผลิตภัณฑ์ที่มีการลดปริมาณไขมัน เช่น นมไขมันต่ำหรือนมขาดมันเนย ต้องมีการเสริมวิตามินเอจึงจะมีคุณค่าทางโภชนาการเทียบเท่ากับนมไขมันเต็ม

5. แร่ธาตุต่าง ๆ นมประกอบด้วยแร่ธาตุ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และสังกะสี โดยพบปริมาณแคลเซียมมากที่สุด รองลงมาเป็นฟอสฟอรัสและแมกนีเซียม นอกจากนี้ยังพบทองแดง เหล็ก แมงกานีส และโซเดียมในปริมาณต่ำ กระบวนการฆ่าเชื้อในนมด้วยวิธีพาสเจอร์ไรซ์จะไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณของแร่ธาตุในนม

2. กระบวนการฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนในนม

ผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มที่มีจำหน่ายในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ ได้แก่ นมพาสเจอร์ไรซ์ (pasteurized milk) นมสเตอริไรซ์ (sterilized milk) และนมยูเอชที (UHT milk) ซึ่งมีความแตกต่างกันตามกระบวนการผลิต นอกจากนี้ยังมีการแยกประเภทของนมพร้อมดื่มเป็นประเภทต่าง ๆ ได้แก่ นมดิบ (raw milk) นมสดหรือนมเต็มมันเนย (whole milk) นมพร่องมันเนย (semi-skimmed milk) และนมขาดมันเนย (skimmed milk) เป็นต้น⁽¹³⁾

2.1 กระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ (Pasteurization)

กระบวนการพาสเจอร์ไรซ์เป็นกระบวนการให้ความร้อนแก่นมดิบโดยใช้ความร้อนไม่เกิน 100 องศาเซลเซียส มีจุดประสงค์เพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรค จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุการเน่าเสีย และเอนไซม์ที่ไม่พึงประสงค์ เพื่อให้นมมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น กระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ทำได้ 2 แบบ ได้แก่ แบบใช้อุณหภูมิต่ำ ระยะเวลาสั้น (Low temperature long time; LTLT method) โดยมีการให้ความร้อนนมไม่ต่ำกว่า 63 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมินี้น้อยกว่า 30 นาที จากนั้นทำให้นมมีอุณหภูมิเย็นลงทันทีที่อุณหภูมिन้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 องศาเซลเซียส โดยกระบวนการให้ความร้อนชนิดนี้มีข้อเสียคือ ไม่สามารถใช้ในการฆ่าเชื้อในการผลิตที่มีตัวอย่างนมปริมาณมากได้ เนื่องจากการลดอุณหภูมิทันทีเป็นการสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสำหรับ

กระบวนการหล่อเย็น กระบวนการพาสเจอร์ไรซ์แบบที่ 2 คือ แบบใช้อุณหภูมิสูง ระยะเวลาสั้น (High temperature short time; HTST method) โดยมีการให้ความร้อนนมไม่ต่ำกว่า 72 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 15 วินาที หลังจากผ่านกระบวนการให้ความร้อนแล้ว จะทำให้นมเย็นลงทันที ที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 5 องศาเซลเซียส นมที่ได้จากกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ทั้งสองวิธีจะยังคงรักษาคุณค่าทางสารอาหารได้ใกล้เคียงกับนมดิบ กระบวนการพาสเจอร์ไรซ์เป็นกระบวนการให้ความร้อนที่ใช้ทั่วไปในนมประเภทต่าง ๆ ได้แก่ นมเต็มมันเนย นมพว่องมันเนย นมขาดมันเนย และนมที่ต้องการรักษาคุณค่าทางโภชนาการเป็นพิเศษ เช่น เครื่องดื่มนมผสมวิตามิน แร่ธาตุ และสารเพิ่มโภชนาการอื่น อย่างไรก็ตาม นมพาสเจอร์ไรซ์เป็นนมที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนไม่เกิน 100 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ยังคงมีสปอร์และเอนไซม์ทนความร้อนที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียในอาหารคงเหลืออยู่ เป็นเหตุให้ผลิตภัณฑ์หลังกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ต้องมีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิไม่เกิน 8 องศาเซลเซียส การเก็บรักษานมพาสเจอร์ไรซ์จึงต้องเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 8 องศาเซลเซียส และมีอายุการเก็บรักษาที่ 7 - 28 วัน⁽¹⁴⁾

2.2 กระบวนการสเตอริไลซ์ (Sterilization)

กระบวนการสเตอริไลซ์ เป็นกระบวนการฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์นมชนิดเหลวที่บรรจุในภาชนะที่ปิดสนิท ด้วยอุณหภูมิที่ไม่ต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาที่เหมาะสม ทั้งนี้จะต้องผ่านกรรมวิธีที่ทำให้นมเป็นเนื้อเดียวกันด้วย⁽¹⁵⁾ โดยนมดิบจะมีการบรรจุใส่บรรจุภัณฑ์ จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105 - 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 - 45 นาที ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า in bottle sterilization โดยหลังจากกระบวนการให้ความร้อน สามารถเก็บรักษานมได้ที่อุณหภูมิห้องได้⁽¹⁶⁾

2.3 กระบวนการยูเอชที (Ultra - high temperature (UHT) processing)

กระบวนการยูเอชทีเป็นกระบวนการให้ความร้อนสูงแก่นมดิบ สามารถทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค และจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียได้ทั้งหมด โดยมีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 133 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาไม่น้อยกว่า 1 วินาที⁽¹⁷⁾ หรือการให้ความร้อนที่ช่วงอุณหภูมิ 135 - 145 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 - 10 วินาที โดยผลิตภัณฑ์นมยูเอชทีสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องได้นานถึง 6 - 12 เดือน อย่างไรก็ตาม การใช้ความร้อนสูงจะส่งผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี ตลอดจนรสสัมผัสของผลิตภัณฑ์นม และแม้ว่าจะมีการใช้อุณหภูมิสูงในการทำลายจุลินทรีย์ในนมดิบ แต่ยังคงพบการเหลือรอดของเอนไซม์ทนความร้อน ซึ่งเป็นสาเหตุการเน่าเสียในนมยูเอชที

3. การเน่าเสียในนม

การเน่าเสียในนมเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมีในนม โดยทำให้เนื้อสัมผัส กลิ่น และรสชาติของนมเปลี่ยนแปลงไป โดยลักษณะการเน่าเสียที่แตกต่างกันขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ จุลินทรีย์ ชนิดของนม กระบวนการและเวลาในการให้ความร้อน รวมทั้งอุณหภูมิในการเก็บรักษา ก่อนและหลังกระบวนการให้ความร้อน สำหรับการเน่าเสียของนมจากเชื้อแบคทีเรียมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของแบคทีเรีย ความสามารถในการเจริญ และความสามารถในการสร้างเอนไซม์มาย่อยองค์ประกอบในนม เช่น เอนไซม์เลซิทีเนส (lecithinase) เอนไซม์ไลเปส (lipase) หรือเอนไซม์โปรติเอส (protease) โดยเอนไซม์บางชนิดอาจไม่ถูกทำลายในกระบวนการให้ความร้อน ทำให้เกิดการเน่าเสียของนมได้แม้จะผ่านกระบวนการให้ความร้อนมาแล้ว โดยหากมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน จะทำให้นมเกิดรสขม (bitter off - flavors) และรสบูด (rotten off - flavors) แตกต่างจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่ย่อยไขมัน (lipolytic activity) จะทำให้เกิดกลิ่นผลไม้เสีย (fruity off - flavors) กลิ่นกรด (acid off - flavors) และกลิ่นหืน (rancid off - flavors) นอกจากนี้ยังมีการสังเกตการเน่าเสียจากลักษณะที่ปรากฏ ได้แก่ การเกิดลิ่มนมหวาน (sweet curdling) การเกิดเจล (gelation) หรือการเกิดครีมบนผิวหน้าของนม (bitty cream) ซึ่งการเกิดลิ่มนมหวานเป็นการเน่าเสียจากการตกตะกอนของนมมักเกิดที่ pH ที่สูง ส่วนการเกิดเจลจะส่งผลให้นมสูญเสียความเหลว และเกิดขึ้นแบบไม่สามารถผันกลับได้ ในขณะที่การเกิดครีมบนผิวหน้าของนม เกิดจากการที่เลซิทีน (lecithin) ในนมถูกย่อยโดยเอนไซม์เลซิทีเนส (lecithinase) ส่งผลให้มีการปลดปล่อยกรดไขมันซึ่งเป็นสาเหตุของรสขม⁽¹⁸⁾

4. การปนเปื้อนของแบคทีเรียในนมดิบ

การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในนมเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย โดยพบว่านมดิบที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนในปริมาณสูงจะมีการเน่าเสียที่เร็วกว่านมดิบที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียต่ำ นอกจากนี้นมยูเอชทีที่มีปริมาณแบคทีเรียทนเย็นสูงจะมีระยะเวลาที่เกิดเจล (gelation time) ที่สั้นลง⁽¹⁹⁾ โดยการปนเปื้อนมักเกิดจากบุคคลที่ขาดสุขอนามัยที่ดี การจัดการที่ไม่เหมาะสม และจากสิ่งแวดล้อมภายในแหล่งผลิต ส่งผลให้นมดิบมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นสูง⁽²⁰⁾ การปนเปื้อนจากบุคคลเกิดจากสุขอนามัยที่ไม่เหมาะสมของผู้รีดนม เกิดได้ในฟาร์มขนาดเล็กที่มีการรีดนมด้วยมือ ประกอบกับกระบวนการที่ไม่ถูกสุขลักษณะ อย่างไรก็ตาม การใช้เครื่องรีดนมในฟาร์มขนาดใหญ่สามารถพบปัญหาการปนเปื้อนได้เช่นเดียวกัน โดยมีสาเหตุมาจากการทำความสะอาดเครื่องรีดนมที่ไม่เพียงพอ ทำให้แบคทีเรียสามารถหลบซ่อนภายในไบโอฟิล์ม (biofilm) ได้⁽²¹⁾ นอกจากนี้การใช้เครื่องรีดนมแบบไม่ฆ่าอุณหภูมิ อาจส่งผลให้แม่โคมีภาวะเต้านมอักเสบ (mastitis) ส่งผลให้

คุณภาพของนมดิบลดลง สำหรับการปนเปื้อนจากการจัดการที่ไม่เหมาะสม เกิดจากการให้ความร้อนที่ไม่เพียงพอในระหว่างกระบวนการ รวมถึงโรงงานผลิตนมหลายแห่งมีกระบวนการบรรจุนมในบรรจุภัณฑ์แบบไม่ปลอดเชื้อ ซึ่งมีโอกาสที่จุลินทรีย์จะปนเปื้อนเข้าไปในนมที่บริเวณต่าง ๆ

การเก็บรักษานมดิบที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า เป็นวิธีการรักษาคุณภาพนมดิบที่มีการใช้ทั่วโลก เนื่องจากสามารถลดการเจริญของแบคทีเรียที่เจริญในอุณหภูมิปกติ (mesophilic bacteria) และแบคทีเรียชอบร้อน (thermophilic bacteria) ในนมดิบได้ ช่วยให้สามารถเก็บรักษานมไว้ได้ถึง 5 วัน ก่อนกระบวนการให้ความร้อน⁽²²⁾ อย่างไรก็ตาม ที่อุณหภูมิเย็นดังกล่าวทำให้จุลินทรีย์ที่ทนเย็น (psychrotrophs) เจริญได้ แม้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวจะอยู่ในช่วง 20 – 30 องศาเซลเซียสก็ตาม⁽²³⁾ โดยแบคทีเรียทนเย็นเหล่านี้สามารถสังเคราะห์ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) และไขมัน ซึ่งเป็นการเพิ่มสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวภายในเซลล์เพื่อช่วยปกป้องเซลล์แบคทีเรียจากความเย็น⁽²⁰⁾ แบคทีเรียทนเย็นถือเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการระบุคุณภาพทางจุลชีววิทยาของนมดิบ โดยเมื่อระดับของแบคทีเรียทนเย็นสูงถึง 6 log CFU/mL จะส่งผลกระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์นมสุดท้าย⁽²⁴⁾ จากมาตรฐานของสหภาพยุโรป (The European Union (EU) standard) ระบุว่า นมดิบที่มีคุณภาพสูงควรมีจำนวนแบคทีเรียทนเย็นต่ำกว่า 4.22 log CFU/mL⁽²⁵⁾ โดยสัดส่วนของแบคทีเรียทนเย็นต่อแบคทีเรียทั้งหมดภายในนมดิบจะขึ้นกับการสุขาภิบาลการผลิต หากมีสุขาภิบาลในการผลิตที่ดีจะมีสัดส่วนของแบคทีเรียทนเย็น ร้อยละ 10 แต่หากนมมีสุขาภิบาลการผลิตที่ไม่ดี สัดส่วนแบคทีเรียทนเย็นอาจเพิ่มสูงขึ้นถึงร้อยละ 75 ของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในนมดิบ⁽²⁶⁾ นอกจากนี้กระบวนการเก็บรักษานมดิบหลังจากการรีดนม ยังมีผลต่อการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ทั้งนี้การเก็บรักษานมดิบที่อุณหภูมิต่ำให้เร็วที่สุดจะทำให้คุณภาพของนมดิบทางจุลชีววิทยาดีขึ้น โดยจากการศึกษาของ Griffiths และคณะ (1987)⁽²⁷⁾ ซึ่งเปรียบเทียบการเก็บนมดิบที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียสและ 6 องศาเซลเซียส พบว่านมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส มีคุณภาพของนมดิบทางจุลชีววิทยาดีกว่า และมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานกว่านมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียนอกจากการเก็บรักษานมดิบที่อุณหภูมิต่ำพอแล้ว ยังพบว่าอาจเกิดจากการลดอุณหภูมิในนมภายหลังการฆ่าเชื้อที่นานเกินไป จะทำให้มีแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เจริญ ส่งผลให้ค่า pH ลดลง และทำให้เกิดกลิ่นเหม็น (fouling) บริเวณ อุปกรณ์ให้ความร้อน (heat exchanger) หรือที่อุปกรณ์พ่นไอน้ำ (direct steam injectors)⁽²⁸⁾

แบคทีเรียทนเย็นที่ปนเปื้อนในนมดิบมีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ใน ส่วนของแบคทีเรียแกรมบวกที่พบได้ในนมดิบ ได้แก่ *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Staphylococcus* และ *Carnobacterium* ^(20, 23, 29) โดย *Bacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบมากในนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิ 8 - 10 องศาเซลเซียส ⁽²⁶⁾ เชื้อ *Bacillus* ร้อยละ 40 - 84 สามารถสร้างเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในนมทั้งเอนไซม์โปรติเอสและเลซิทีเนส ⁽³⁰⁾ โดยเซลล์ปกติ (vegetative cell) ของ *Bacillus* ที่มีจำนวนมากกว่า 6 log CFU/mL จะส่งผลให้เกิดลักษณะครีมบนผิวหน้าของนม ⁽³¹⁾ ซึ่งเกิดจากการสร้างเอนไซม์เลซิทีเนส ที่ทำลายเลซิทีนซึ่งห่อหุ้มส่วนของอนุภาคเม็ดไขมันในนม ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบอื่นจะไม่ทำให้เกิดลักษณะครีมบนผิวหน้าของนม สำหรับในส่วนของแบคทีเรียแกรมลบทนเย็นที่พบได้ ใน น ม ดิบ ได้แก่ *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Enterobacter* และ *Flavobacterium* โดยแบคทีเรียแกรมลบทนเย็นที่แยกได้ มากที่สุดในนมดิบ คือ *Pseudomonas* spp. ⁽³¹⁾

4.1 *Pseudomonas* species

4.1.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Pseudomonas*

Pseudomonas เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน ไม่สร้างสปอร์ มีเส้นผ่าน ศูนย์กลางประมาณ 0.5 - 1.0 ไมโครเมตร และความยาวประมาณ 1.5 - 5.0 ไมโครเมตร จัดอยู่ใน แฟมิลี *Pseudomonadaceae* สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ได้แก่ ดิน น้ำ พืช เนื้อเยื่อของสัตว์ และอาหาร เป็นต้น ⁽³²⁾ *Pseudomonas* มักทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารที่ได้จากพืชหรือสัตว์ โดยเฉพาะในนมดิบ ⁽³³⁾ บางสายพันธุ์ก่อโรคได้ในมนุษย์ สัตว์ หรือพืช สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ ปกติ และอุณหภูมิเย็น โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญจะสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส ⁽³³⁾ ไม่ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นกรด ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน (chemoorganotroph) ให้ผลบวกในการทดสอบการสร้างเอนไซม์ oxidase และ catalase

4.1.2 การปนเปื้อนของ *Pseudomonas* ในนมดิบ

Pseudomonas เป็นแบคทีเรียที่พบได้มากที่สุดในนมดิบ เนื่องจากเป็นแบคทีเรีย ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิเย็น ส่งผลให้สามารถเจริญในนมดิบที่มีการแช่เย็นได้ดีกว่าแบคทีเรีย อื่น โดยพบอย่างน้อยร้อยละ 50 ของแบคทีเรียในนมทั้งหมด ⁽³⁴⁾ และพบได้ร้อยละ 65 - 70 ของ แบคทีเรียทนเย็น ซึ่ง *P. fluorescens* เป็นสปีชีส์ที่พบได้มากที่สุดในนมดิบ ⁽³⁵⁾ จากการศึกษาของ Chambers และคณะ (2003) รายงานว่า *P. fluorescens* เป็นสปีชีส์ที่เด่นที่สุดของ *Pseudomonas* spp. ที่พบได้ในนม เช่นเดียวกับการศึกษาของ Dogan และคณะ (2003) ที่

สามารถแยก *P. fluorescens* ได้ร้อยละ 51 จาก *Pseudomonas* ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์นมโดยการ
ใช้ชุดตรวจ API20 NE อย่างไรก็ดีตาม *Pseudomonas* ไม่พบว่าเป็นเชื้อประจำถิ่นบริเวณด้านนม
 ดังนั้นการปนเปื้อนจึงเกิดหลังจากการรีดนมและสามารถเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรียอื่นแม้มี
 กระบวนการทำความสะอาดเย็นเพื่อเก็บรักษานมก็ตาม⁽²⁴⁾ *Pseudomonas* มีแนวโน้มในการเจริญในนม
 ดิบได้ดีกว่าแบคทีเรียอื่น เนื่องจากใช้สารอาหารง่าย และมีระยะเวลาการแบ่งเซลล์ที่สั้น (น้อยกว่า
 4 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 0 - 7 องศาเซลเซียส⁽³⁶⁾ จากรายงานของ Dogan และ Boor (2003)⁽³⁷⁾ พบว่า
 Pseudomonas สามารถแบ่งเซลล์จาก 1 เซลล์ไปเป็น 1.0×10^6 CFU/mL ภายใน 8 วัน ที่อุณหภูมิ
 4 องศาเซลเซียส โดยสปีชีส์ของเชื้อ *Pseudomonas* ที่พบได้ในนม มีการรายงานแตกต่างกันดังนี้

Sillankorva และคณะ (2008)⁽³⁸⁾ ได้คัดแยก *Pseudomonas* จากโรงงานผลิตนม
 ประเทศโปรตุเกสและสหรัฐอเมริกา โดยพบว่าสามารถพบ *Pseudomonas* ได้จากอุปกรณ์การรีด
 นม พื้น นมดิบ รวมถึงนมที่ผ่านการแปรรูปแล้ว โดยสปีชีส์ที่พบเป็นหลักจากแหล่งต่าง ๆ ดังกล่าว
 คือ *P. fluorescens* ส่วนสปีชีส์อื่นที่สามารถพบได้ในนมดิบ ได้แก่ *P. fulva*,
 P. putida และ *P. fragi*

Marchand และคณะ (2009)⁽²⁴⁾ ได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างนมดิบ
 ประเทศเบลเยียม จากผลการทดลองพบว่า *Pseudomonas* เป็นจิ้นส์ที่พบมากที่สุดในตัวอย่างนม
 ดิบ โดยพบร้อยละ 90.3 โดยสปีชีส์ที่พบมากที่สุด คือ *P. fragi* (ร้อยละ 33.9) รองลงมาคือ
 P. lundensis (ร้อยละ 19.4)

von Neubeck และคณะ (2015)⁽³⁹⁾ ได้คัดแยกเชื้อ *Pseudomonas* จากตัวอย่าง
 นมดิบในประเทศเยอรมันและสโลวาเกีย โดยสปีชีส์ที่พบมากที่สุด คือ *P. proteolytica* รองลงมา
 คือ *P. lundensis*

Caldera และคณะ (2016)⁽⁴⁰⁾ ได้คัดแยก *Pseudomonas* ได้ทั้งหมด 66 ไอโซ
 เลท โดยสปีชีส์ที่พบในนมดิบ ได้แก่ *P. fragi*, *P. gassardii*, *P. proteolytica*, *P. brenneri* และ
 P. rhodensiae ในขณะที่ *P. peli* พบในตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรซ์

Meng และคณะ (2017)⁽³⁵⁾ พบว่า สามารถแยกเชื้อ *Pseudomonas* ได้ทั้งหมด
 143 ไอโซเลท ซึ่งประกอบด้วย *Pseudomonas* ทั้งหมด 14 สปีชีส์ โดยสปีชีส์ที่พบมากที่สุด คือ
 P. fluorescens ลำดับที่สอง คือ *P. fragi* และลำดับที่สามคือ *P. psychrophila*

Zhang และคณะ (2019)⁽⁴¹⁾ ได้คัดแยก *Pseudomonas* จากตัวอย่างนมดิบ
 ประเทศนิวซีแลนด์ โดยพบทั้งหมด 9 สปีชีส์ สปีชีส์ที่พบมากที่สุด คือ *P. psychrophila* (ร้อยละ
 39.02) รองลงมาคือ *P. fluorescens* (ร้อยละ 37.53)

จะเห็นได้ว่า สปีชีส์ของเชื้อ *Pseudomonas* ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและสภาวะแวดล้อมของแต่ละพื้นที่ นอกจากนี้ลักษณะการเน่าเสียในนมที่เกิดจาก *Pseudomonas* spp. จะแตกต่างกันไปตามสปีชีส์อีกด้วย⁽⁴²⁾

P. mosselii ไม่มีการรายงานว่าพบในนมดิบมาก่อน โดย *P. mosselii* คัดแยกได้ครั้งแรกจากตัวอย่างทางการแพทย์ โดย Dabboussi และคณะ (2002)⁽⁴³⁾ ซึ่งจัดจำแนก *P. mosselii* เป็นสปีชีส์ใหม่ โดยการสร้างแผนภูมิเชิงวิวัฒนาการผ่านยีน 16S rDNA, oprF และ oprD ซึ่งเดิมจัดอยู่ในสปีชีส์ *P. putida* อย่างไรก็ตาม *P. mosselii* สามารถคัดแยกได้จากตัวอย่างดินเช่นเดียวกัน โดยมีรายงานดังนี้

Giani และคณะ (2012)⁽⁴⁴⁾ สามารถคัดแยก *P. mosselii* ได้จากตัวอย่างดินบริเวณรอบบรอกพีซ

Zhou และคณะ (2022)⁽⁴⁵⁾ สามารถแยก *P. mosselii* ที่สามารถสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ในการยับยั้งเชื้อราได้จากตัวอย่างดิน

ทั้งนี้การปนเปื้อนดินสู่นมดิบสามารถเกิดขึ้นได้จากการขาดสุขอนามัยที่เหมาะสมในฟาร์มโคนมดังที่ได้กล่าวไปข้างต้น ซึ่งอาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้สามารถพบ *P. mosselii* ได้จากตัวอย่างนมดิบ

5. เอนไซม์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในนม

นมดิบประกอบด้วยเอนไซม์ที่หลากหลาย ปัจจัยที่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ได้แก่ ค่า pH และอุณหภูมิ โดยแบคทีเรียสามารถสร้างได้ทั้งเอนไซม์ที่ส่งผลดี (desirable enzyme) ซึ่งทำให้เกิดรสชาติของชีส และเอนไซม์ที่ส่งผลเสีย (undesirable enzyme) ซึ่งกระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์นม⁽⁴⁶⁾ โดยเอนไซม์เหล่านี้สามารถพบได้ในนมดิบ และถูกจัดจำแนกเป็น 2 กลุ่มหลักได้แก่ เอนไซม์ที่มีอยู่เดิมในนม (indigenous enzyme) และเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย (bacterial enzyme)

1. เอนไซม์ที่มีอยู่เดิมในนม สามารถพบได้ในนมวัวมากกว่า 60 ชนิด⁽⁴⁷⁾ โดยเอนไซม์ที่สามารถพบได้ทั่วไป คือ พลาสมิน (plasmin) เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) คะตาเลส (catalase) และฟอสฟาเทส (phosphatase) โดยเอนไซม์ที่มีอยู่เดิมในนมนี้ มักเป็นเอนไซม์ที่ไม่ทนความร้อน (heat - labile enzyme) และไม่มีผลต่อคุณภาพของสารอาหารและรสสัมผัสของผลิตภัณฑ์นม ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้สามารถถูกทำลายได้โดยกระบวนการทำความร้อน ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ลิโปโปรตีน ไลเปส (lipoprotein lipase) และเอนไซม์ฟอสฟาเทส สามารถถูกทำลายอย่างสมบูรณ์โดยกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์⁽⁴⁸⁾ จากคุณสมบัติดังกล่าว จึงได้มีการใช้การตรวจพบเอนไซม์ฟอสฟาเทส มาบ่งชี้คุณภาพของนมที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ในโรงงานอุตสาหกรรมนม อย่างไรก็ตาม เอนไซม์บางชนิดที่มีอยู่เดิมในนมสามารถทนความร้อนได้ เป็นสาเหตุให้เกิดการเน่าเสียหรือเสื่อมสภาพของผลิตภัณฑ์นมได้ ตัวอย่างเช่น การย่อยโปรตีนที่เกิดจากเอนไซม์พลาสมินที่ทนความร้อน ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และค่า pH 7.5 ปัจจัยสำคัญที่แยกความแตกต่างระหว่างพลาสมินและเอนไซม์โปรติเอสที่สร้างจากแบคทีเรียคือ เอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียจะย่อยแคปไซเคซินได้ดีกว่าเบตาเคซินและแอลฟาเคซิน ในขณะที่พลาสมินสามารถย่อยเบตาเคซินและแอลฟาเคซินได้ดีกว่าแคปไซเคซิน⁽⁴⁹⁾

2. เอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย แบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสที่ทนความร้อน (heat - stable enzyme) ที่สามารถย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีนในนม เป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี การทำงาน และรสสัมผัสของนมและผลิตภัณฑ์นม การย่อยสลายโปรตีนในนมจะทำให้เกิดรสขม รสบูด เกิดลักษณะเป็นเจล และเกิดการเน่าเสียในนม⁽⁵⁰⁾ การปลดปล่อยเอนไซม์โปรติเอสในปริมาณสูง มักเกิดขึ้นในระยะ late log phase หรือ early stationary phase ของการเจริญของเชื้อ⁽³¹⁾ แบคทีเรียต่างชนิดกันสามารถสร้างชนิดของเอนไซม์โปรติเอสที่แตกต่างกัน และมีมวลโมเลกุลของเอนไซม์ที่แตกต่างกันด้วย เช่น *Pseudomonas* ส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้เพียงชนิดเดียว ซึ่งเป็น Zinc

metalloprotease ที่มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 47 - 50 กิโลดาลตัน มีช่วง pH ที่เหมาะสมเป็น 6.5 - 8.0⁽⁵¹⁾ ในขณะที่กลุ่ม *Bacillus* สามารถสร้างชนิดของโปรติเอสที่แตกต่างมากกว่า เช่น *Geobacillus stearothermophilus* สามารถสร้าง metalloprotease 2 ชนิดที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 67.6 และ 20 กิโลดาลตัน⁽⁵²⁾ เอนไซม์โปรติเอสส่วนใหญ่จากกลุ่มแบคทีเรียทนเย็น จะมีผลในการทำลายโปรตีนเคซีนมากกว่าโปรตีนเวย์⁽⁵¹⁾

เอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียหลายชนิด สามารถทนความร้อนและทำงานได้หลังจากกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์และยูเอชที เช่น เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากเชื้อ *Pseudomonas* ยังพบกิจกรรมของเอนไซม์ร้อยละ 55 - 65 หลังจากกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ และยังคงกิจกรรมของเอนไซม์ร้อยละ 20 - 40 หลังจากกระบวนการให้ความร้อนที่ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที⁽⁵³⁾ จากการศึกษาของ Adams และคณะ (1975)⁽⁵⁴⁾ พบว่า เอนไซม์โปรติเอสจาก *Pseudomonas* 10 สปีชีส์ที่แตกต่างกัน ยังคงสามารถทำงานได้หลังผ่านกระบวนการทำความร้อนที่ 149 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที และยังพบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่สร้างจาก *G. stearothermophilus* และ *B. licheniformis* ไม่มีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ หลังจากผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ที่ค่า pH เท่ากับ 7⁽⁵²⁾

5.1 เอนไซม์โปรติเอสที่สร้างจากเชื้อ *Pseudomonas*

การศึกษาลักษณะเอนไซม์โปรติเอสที่สร้างจาก *Pseudomonas* ครั้งแรก มีการรายงานโดย Liao และ McCallus (1998)⁽⁵⁵⁾ ซึ่งค้นพบกลุ่มยีนที่แปลรหัสเป็น extracellular caseinolytic metalloprotease ใน *P. fluorescens* และเรียกเอนไซม์นี้ว่า AprX โดย operon ของ *aprX* ประกอบด้วย ยีน *aprX* แปลรหัสเป็นโปรตีน AprX หรือเอนไซม์โปรติเอส ยีน *inh* แปลรหัสเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส (protease inhibitor) กลุ่มยีน *aprDEF* แปลรหัสเป็นโปรตีน type I secretion (ABC transporter) ที่เกี่ยวข้องกับการปลดปล่อย AprX⁽⁵⁶⁾ กลุ่มยีน *prtAB* แปลรหัสเป็น two auto - secreted serine - protease และยีน *lipA* แปลรหัสเป็นเอนไซม์ไลเปส (ภาพประกอบ 1)^(56, 57) โดยทั้ง AprX และ LipA สามารถทนความร้อนได้แม้จะผ่านความร้อนในกระบวนการยูเอชทีก็ตาม⁽⁵⁸⁾



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างของ *aprX* operon ⁽⁵⁹⁾

ยีนในส่วนของ operon นี้ อาจจะไม่พบในบางสายพันธุ์ของเชื้อ *Pseudomonas* ^(60, 61) ส่งผลให้สูญเสียความสามารถหรือมีความสามารถต่ำในการย่อยโปรตีนหรือไขมัน ^(55, 57) ในส่วนของนิวคลีโอไทด์ในยีน *aprX* พบว่า มีบริเวณอนุรักษ์สูงในสปีชีส์ของ *Pseudomonas* ที่แยกได้จากนมดิบ จึงทำให้สามารถใช้ยีน *aprX* ในการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอสในนมดิบได้ ⁽⁶²⁾ นอกจากนี้ศักยภาพในการย่อยโปรตีน อาจเกิดจากความแตกต่างของระดับการแสดงออกของ AprX ⁽⁶³⁾

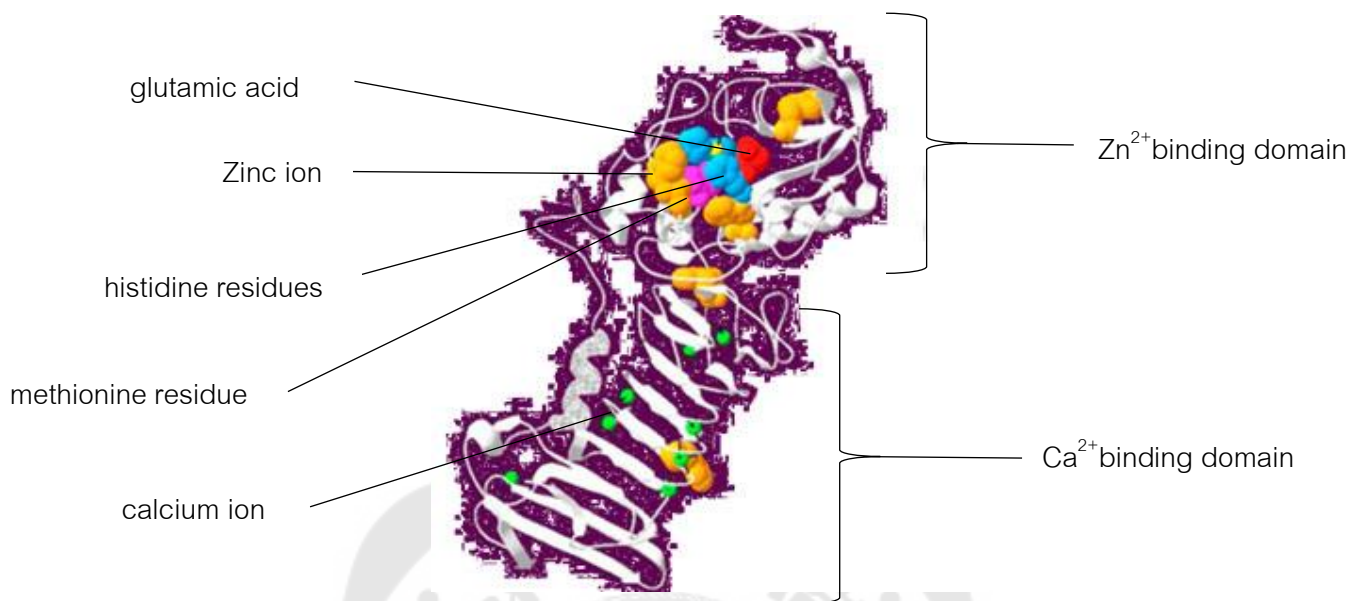
โครงสร้างระดับปฐมภูมิ (primary structure) ของโปรตีน AprX ประกอบด้วย

1. บริเวณที่ช่วยในการเร่งปฏิกิริยา (catalytic domain) หรือบริเวณจับ Zn^{2+} (Zn^{2+} binding domain) อยู่ที่ปลาย N - terminal โดยโดเมนนี้ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน xxxQTLTHEIGHx \times g Lx \times g LxHPx (ตัวอักษร x แสดง arbitrary amino acid) มีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยา โดย Zn^{2+} (สีเหลืองในภาพประกอบ 2) จะจับกับ histidine residues กรดกลูตามิก (glutamic acid) และ methionine residue (ภาพประกอบ 2)

2. บริเวณจับ Ca^{2+} (Ca^{2+} binding domain) อยู่ที่บริเวณปลาย C - terminal โดเมนนี้ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนซ้ำ ๆ คือ GG \times g xD motif ในบริเวณลำดับซ้ำ ๆ นี้ ส่วนของ Ca^{2+} จะประสานกับหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิเลตของแขนงข้างกรดแอสพาร์ติก (aspartic acid side chains) และหมู่ฟังก์ชันคาร์บอนิลของกรดอะมิโนไกลซีนที่อยู่ในโครงสร้างหลัก (glycine backbones) ⁽⁶⁴⁾ motif นี้เป็นลักษณะเฉพาะของการปลดปล่อยโปรตีนประเภท type I secretion ⁽⁴²⁾

3. กรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำปริมาณมาก

4. ไม่มีกรดอะมิโนซิสเตอีน แต่มีกรดอะมิโนไกลซีนปริมาณมาก ⁽⁶⁵⁾



ภาพประกอบ 2 AprX protein⁽⁵⁹⁾

จากการรายงานของ Kroll และ Klostermeyer (1984)⁽⁶⁶⁾ แสดงค่า D - value (decimal reduction time) หรือระยะเวลาที่สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ลงได้ 90 เปอร์เซ็นต์ ณ อุณหภูมิและสภาวะหนึ่ง ๆ ของ AprX ในนมเท่ากับ 124 วินาที ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ส่งผลให้เอนไซม์ยังคงทำงานได้แม้ผ่านกระบวนการยูเอชทีมาแล้ว AprX สามารถ refold ได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง เนื่องจากการมีโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) ที่ยืดหยุ่น และเมื่อมีส่วนประกอบแคลเซียมในสารละลายร่วมด้วยจะส่งผลให้เอนไซม์มีความเสถียรเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ยากที่จะกำจัดเอนไซม์นี้จากนมด้วยความร้อน^(63, 67) โดยปกติโปรตีน AprX จะแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ในช่วงอุณหภูมิกว้าง (0 - 55 องศาเซลเซียส) แต่จะมีช่วงที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 37 - 47 องศาเซลเซียส⁽⁶⁸⁾

ตาราง 1 รายงานการพบเอนไซม์โปรติเอสจาก *Pseudomonas* ในผลิตภัณฑ์นมและผลที่เกิดขึ้น

Strain types	ประเภทนม	สถานะที่เปลี่ยนแปลงไป	References
<i>P. fluorescens</i> AR11	นมยูเอชที	เกิดเจล (gelation)	Law et al. (1977) ⁽¹⁹⁾
NS	เนยแข็ง (fresh cheese)	เกิดเจลและเนื้อมีค	
NS	เนยนุ่ม (soft cheese)	ให้เนื้อสัมผัสที่ไม่ดี	Samaržija et al. (2012) ⁽⁶⁹⁾
<i>P. fluorescens</i> biotype B1 - B6	นมพาสเจอร์ไรซ์	-	Bedeltavana et al. (2010) ⁽⁷⁰⁾
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 702085, 701274 (Reference strains)	นมยูเอชทีขาดมันเนย	-	MLipano et al. (2018) ⁽⁷¹⁾
<i>P. fluorescens</i> BJ - 10	นมดิบ	เกิดเจล	Zhang and Lv (2014) ⁽⁷²⁾

5.2 วิธีการควบคุมการเน่าเสียในนมจากเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย

การลดผลกระทบที่ไม่พึงประสงค์จากเอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์ที่ร้อนอื่น ๆ ที่สร้างโดยจุลินทรีย์ทนเย็น สามารถทำได้ในทุกกระบวนการผลิตนม โดยมีการใช้ 3 วิธีหลัก ได้แก่ สุขอนามัย (hygiene) กระบวนการทำความเย็น (cooling) และการให้ความร้อนในนมดิบ (thermization) และเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการป้องกันเอนไซม์โปรติเอส ควรมีการใช้สามวิธีนี้ร่วมกัน หากมีกระบวนการใดที่ผิดพลาด กระบวนการอื่นอาจไม่เพียงพอที่จะลดปริมาณเอนไซม์โปรติเอสให้ต่ำได้เพียงพอในการป้องกันการเสื่อมของคุณภาพในนม

1. สุขอนามัย เมื่อปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นในนมสูงและมีการเก็บรักษานมในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม จะส่งผลให้มีการสร้างเอนไซม์โปรติเอสเป็นปริมาณมากในนม⁽⁴⁾ ดังนั้นการรักษานมให้มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทนเย็นให้ต่ำที่สุด จึงมีความสำคัญในการควบคุมการสร้างเอนไซม์โปรติเอส⁽¹⁹⁾ โดยการควบคุมคุณภาพนม จำเป็นต้องปฏิบัติตามหลักสุขอนามัยที่ดีทั้งในระดับฟาร์มและระดับอุตสาหกรรม เพื่อลดการปนเปื้อนทั้งก่อนและภายหลังการผลิต⁽⁷³⁾ นอกจากนี้ไบโอฟิล์มที่สร้างจากจุลินทรีย์ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีความเหนียวและยังเป็นบริเวณที่เป็นแหล่งกักเก็บแบคทีเรียเหล่านี้ สามารถปกป้องเชื้อจากสารฆ่าเชื้อต่าง ๆ รวมถึงช่วยให้มีการสร้างเอนไซม์ที่ร้อนจากแบคทีเรียทนเย็นได้ดีขึ้น⁽²¹⁾ ด้วยเหตุนี้นมดิบที่ไม่ปนเปื้อนจึงยังคงเกิดการเน่าเสียได้หลังกระบวนการให้ความร้อน ดังนั้นการทำความสะอาดและฆ่าเชื้ออุปกรณ์ทั้งหมดที่สัมผัสกับนมดิบจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อป้องกันการก่อตัวของไบโอฟิล์มที่เกิดขึ้น

2. กระบวนการทำความเย็น ถึงแม้ว่าจะมีกระบวนการให้ความร้อนในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียในนม แต่คุณภาพของผลิตภัณฑ์นมขั้นสุดท้ายอาจลดลงหากมีการสร้างเอนไซม์โปรติเอสเกิดขึ้นในนมดิบที่ไม่ได้เก็บหรือทำให้เย็นในสภาวะที่เหมาะสม การทำความเย็นเบื้องต้น (precooling) ให้เร็วที่สุดจึงมีความสำคัญมากเนื่องจากเมื่อนมออกจากเต้าจะมีอุณหภูมิประมาณ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เอื้อต่อการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์โปรติเอส ส่งผลให้เกิดการสร้างเอนไซม์ขึ้นนำไปสู่การย่อยโปรตีนในนมดิบ นอกจากการทำความเย็นเบื้องต้นแล้ว ควรมีการทำความเย็นอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่าหลังจากกระบวนการให้ความร้อน⁽²⁷⁾ อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีการใช้กระบวนการทำความเย็นที่เหมาะสมแล้วแต่อาจมีการสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ในขณะที่มีปริมาณแบคทีเรียที่ต่ำและในระยะแรกของการเจริญของแบคทีเรีย จากงานวิจัยของ Alves และคณะ (2018)⁽⁷⁴⁾ พบว่าอุณหภูมิตู้เย็นที่มักใช้ในการเก็บนมดิบไม่สามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์โปรติเอส ถ้ามีจำนวนแบคทีเรียทนเย็นเริ่มต้นสูงกว่า 3 log

CFU/mL ดังนั้นหากมีปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นสูง อาจจำเป็นต้องมีช่วงการเก็บที่สั้นลงเพื่อป้องกันการสร้างเอนไซม์โปรติเอส⁽²²⁾

3. การให้ความร้อนในนมดิบ บริษัทนมขนาดใหญ่มักต้องเก็บนมดิบในแทงก์ภายใต้สภาวะที่แช่เย็นเป็นเวลาหลายชั่วโมงหรือหลายวันก่อนที่จะมีการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน นมดิบจึงจำเป็นต้องผ่านกระบวนการให้ความร้อนเบื้องต้น เนื่องจากแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในที่เย็นส่วนใหญ่ไม่สามารถทนความร้อนได้⁽⁷⁴⁾

5.3 การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส

การสร้างเอนไซม์โปรติเอสสามารถตรวจสอบได้จากกิจกรรมการย่อยโปรตีน ซึ่งมีวิธีการตรวจสอบหลายแบบ ได้แก่ agar - based methods, electrophoresis, high - performance liquid chromatography (HPLC) , immunological methods, zymographic methods, spectrophotometric methods และ fluorometric methods⁽⁷⁵⁾ แต่วิธีที่นิยมใช้มากที่สุดมี 3 วิธีดังนี้

1. agar - based methods โดยใช้อาหาร calcium caseinate agar ซึ่งคิดค้นเป็นครั้งแรกโดย Frazier และ Rupp (1928)⁽⁷⁶⁾ วิธีการทำได้โดยนำเชื้อทดสอบมาลงในอาหารดังกล่าว หากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์โปรติเอสจะสามารถย่อย calcium caseinate ที่ทำให้อาหารมีลักษณะขาวขุ่น ไปเป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ (soluble components) ทำให้เกิดโซนใส (clear zone) รอบโคโลนีของเชื้อ⁽⁷⁶⁾ วิธีการนี้สามารถทำได้รวดเร็ว มีต้นทุนต่ำและง่าย เหมาะสำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยโปรตีนได้ในเบื้องต้น อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้ไม่สามารถใช้สำหรับการวิเคราะห์แบบวัดปริมาณได้ (quantitative analysis)

2. spectrophotometric methods วิธีนี้อาศัยหลักการคือ เมื่อซับสเตรต (substrate) ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โปรติเอสจะมีการสร้างผลิตภัณฑ์ที่มีสี ซึ่งสามารถตรวจความเข้มสีโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ได้ ตัวอย่างของซับสเตรตที่นิยมใช้ ได้แก่ azocasein ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่มีสี (chromogenic derivative) ของเคซีน ซึ่งมีการนำมาใช้เป็นครั้งแรกโดย Charney และ Tomarelli (1947)⁽⁷⁷⁾ โดยเอนไซม์โปรติเอสจะย่อยสลาย azocasein ส่งผลให้มีการปลดปล่อย azo dye ที่มีสีแดงสามารถละลายได้ใน trichloroacetic acid วัดความเข้มของสีแดงที่เกิดขึ้นที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร วิธีการนี้เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการวัดกิจกรรมการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ เนื่องจากสีแดงที่เกิดจากปฏิกิริยามีความเสถียร และสามารถใช้อัตราการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ในปริมาณที่ต่ำได้⁽³¹⁾

3. zymography เป็นวิธีในการวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยโปรตีน ซึ่งสามารถทำได้ง่าย และสามารถวัดปริมาณได้ วิธีการทำได้โดยผสมซบัสเตรต (เคซีน) ลงใน polyacrylamide gel จากนั้นหยอดเอนไซม์โปรตีนเอสลงบริเวณหลุม (well) ด้านบน นำไปแยกโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis)⁽⁷⁸⁾ ซบัสเตรตภายในเจลจะถูกย่อยโดยเอนไซม์โปรตีนที่มีมวลโมเลกุลแตกต่างกัน กิจกรรมการย่อยโปรตีนจะสามารถมองเห็นเป็นแถบใส (clear bands) บนบริเวณต่าง ๆ ของเจล ซึ่งแถบใสดังกล่าวจะไม่ถูกย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue⁽⁷⁹⁾ ข้อจำกัดของวิธีการนี้คือ การใช้สารเคมีที่มีความอันตรายและเป็นวิธีที่มีความไวต่ำในการตรวจสอบเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก⁽⁸⁰⁾

6. แบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage)

แบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) หรือโดยทั่วไปเรียกว่า เฟจ (phage) เป็นไวรัสที่บุกรุกเฉพาะเซลล์แบคทีเรีย เพิ่มจำนวนภายในเซลล์เหล่านั้น และทำให้แบคทีเรียตายด้วยการทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตกออก คำว่า แบคเทอริโอเฟจ ถูกบัญญัติขึ้นเป็นครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1917 โดย Félix d'Hérelle นักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศสเชื้อสายแคนาดา เพื่อใช้เรียกไวรัสที่เข้าติดเชื้อในแบคทีเรีย โดยอนุภาคเฟจพบแพร่หลายในทุกระบบนิเวศที่มีแบคทีเรียอยู่ (ประมาณ 10^{32} อนุภาค)

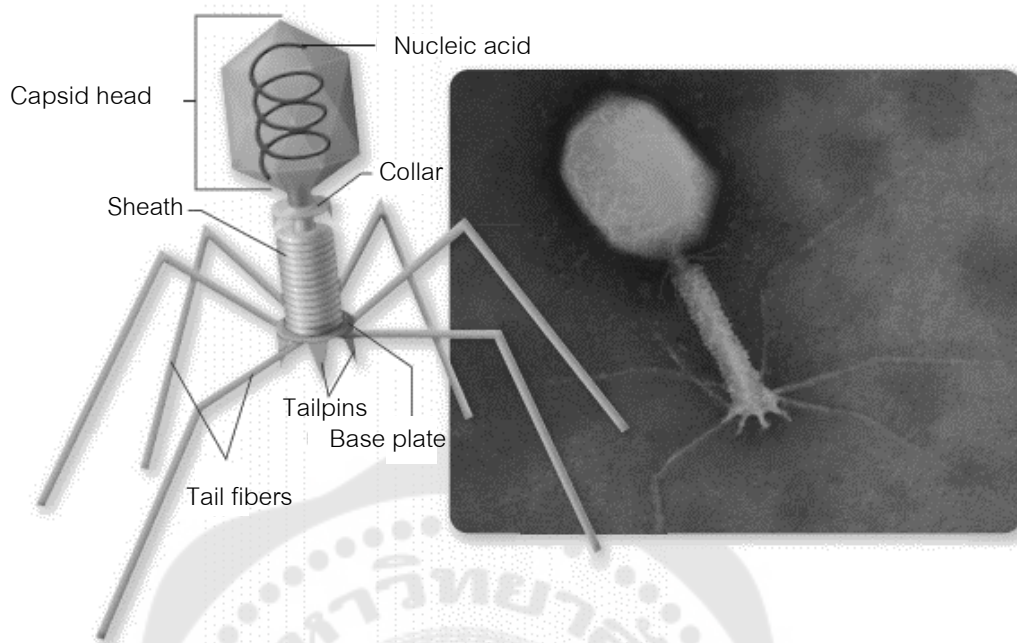
6.1 โครงสร้างของเฟจ

เฟจประกอบด้วยโครงสร้างหลัก 2 ส่วน คือ

1. สารพันธุกรรม (genome) หรือกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) อาจเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเออย่างใดอย่างหนึ่ง ทั้งนี้สารพันธุกรรมอาจมีรูปร่างเป็นเส้น (linear) เป็นวง (circular) หรือแบ่งเป็นหลายชิ้น (segmented)

2. แคพซิด (capsid) เป็นโปรตีนห่อหุ้มสารพันธุกรรมไว้ มักมีรูปร่างเป็นรูปหลายเหลี่ยม (polyhedral) ซึ่งประกอบขึ้นจากโปรตีนหน่วยย่อย เรียกว่า แคพโซเมอร์ (capsomer) ที่ยึดเกาะกันด้วยพันธะโคเวเลนต์ (ภาพประกอบ 3)

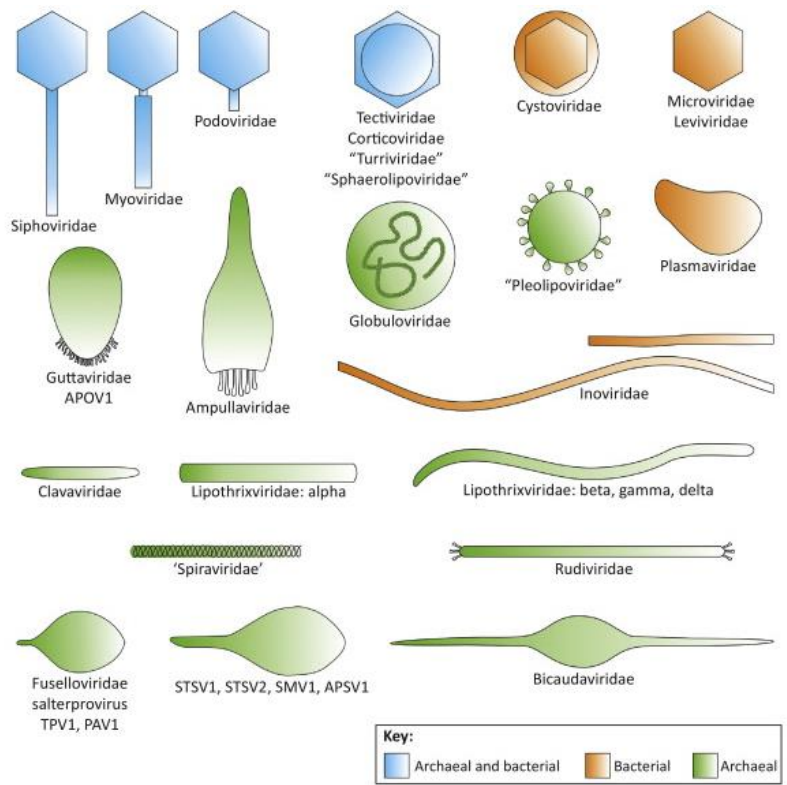
นอกจากนี้อาจพบองค์ประกอบอื่นในเฟจบางชนิด ได้แก่ เยื่อหุ้ม (envelope) เป็นชั้นของลิโปโปรตีน (lipoprotein) ที่หุ้มแคพซิดไว้ซึ่งส่วนประกอบนี้ได้มาจากเยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสต์ และโปรตีนประกอบ (protein apparatus) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างประกอบของอนุภาคเฟจที่นอกเหนือจากแคพซิด ได้แก่ หาง (tail fibers), central spike, baseplate เป็นต้น (ภาพประกอบ 3)



ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของเฟจ⁽⁸¹⁾

6.2 การจัดจำแนกเฟจ

การจัดจำแนกเฟจในปัจจุบันมีการจัดจำแนกให้เป็นระบบเดียวกัน โดยองค์กร International Committee for Taxonomy of Viruses หรือ ICTV โดยกำหนดรูปแบบการตั้งชื่อไวรัสซึ่งให้ใช้ภาษาละติน หรือภาษากรีกลงท้ายชื่อดังนี้ Order ลงท้ายเป็น -virales, Family ลงท้ายเป็น -viridae, Subfamily ลงท้ายเป็น -virinae และ Genus ลงท้ายเป็น -virus โดยแบ่งไวรัสทั้งหมดออกเป็น 59 Order 189 Family ซึ่งเฟจถูกจัดแบ่งเป็น 15 Order ซึ่งรวม Order ที่ยังไม่ได้ตั้งชื่อ 1 Order (unassigned) และ 49 Family (ภาพประกอบ 4 และตาราง 1) (ข้อมูล ณ วันที่ 18 พฤศจิกายน 2564)



ภาพประกอบ 4 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของเฟจในแฟมิลีต่างๆ⁽⁸²⁾

ตาราง 2 การจัดจำแนกพืชโดย International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV)

Order	Family	Morphology	Genome	Subfamilies	Genera
<i>Belfryvirales</i>	<i>Turnviridae</i>	Non - enveloped, icosahedral	Linear dsDNA		1
<i>Caudovirales</i>	<i>Ackermannviridae</i>	Non - enveloped, contractile tail	Linear dsDNA	2	7
	<i>Autographiviridae</i>	Non - enveloped, non - contractile tail	Linear dsDNA	9	70
	<i>Chaseviridae</i>		Linear dsDNA	2	
	<i>Demereciviridae</i>	Non - contractile tail	Linear dsDNA	3	4
	<i>Drexelviriidae</i>	Non - enveloped, non - contractile tail	Linear dsDNA	4	9
	<i>Guelinviridae</i>		Linear dsDNA	1	2
	<i>Herelleviridae</i>	Non - enveloped, contractile tail	Linear dsDNA	5	7
	<i>Myoviridae</i>	Non - enveloped, contractile tail	Linear dsDNA	8	153
	<i>Podoviridae</i>	Non - enveloped, non - contractile tail	Linear dsDNA	3	44
	<i>Rountreeviridae</i>		Linear dsDNA	2	2
	<i>Salasmaviridae</i>		Linear dsDNA	3	4
	<i>Schitoviridae</i>		Linear dsDNA	8	14
	<i>Siphoviridae</i>	Non - enveloped, non - contractile tail	Linear dsDNA	22	299
<i>Zobellviridae</i>		Linear dsDNA	1	6	

ตาราง 2 (ต่อ)

Order	Family	Morphology	Genome	Subfamilies	Genera
<i>Halopanivirales</i>	<i>Sphaerolipoviridae</i>	Non - enveloped, icosahedral	Linear dsDNA		1
	<i>Matshushitaviridae</i>	Enveloped, icosahedral	Linear dsDNA		1
	<i>Simuloviridae</i>	Enveloped, icosahedral	Linear dsDNA		1
<i>Haloruvirales</i>	<i>Pleolipoviridae</i>	Enveloped, pleomorphic	Circular dsDNA		3
<i>Kalamavirales</i>	<i>Tectiviridae</i>	Non - enveloped, icosahedral	Linear dsDNA		5
<i>Ligamenvirales</i>	<i>Lipothrixviridae</i>	Enveloped, rod - shaped	Linear dsDNA		4
	<i>Rudiviridae</i>	Non - enveloped, rod - shaped	Linear dsDNA		7
<i>Mindivirales</i>	<i>Cystoviridae</i>	Enveloped, spherical	Segmented dsDNA		1
<i>Norzivirales</i>	<i>Atkinsviridae</i>	Non - enveloped, icosahedral	Linear ssRNA		56
	<i>Duinviridae</i>	Non - enveloped, icosahedral	Linear ssRNA		6
	<i>Fiersviridae</i>	Non - enveloped, icosahedral	Linear ssRNA		185
	<i>Solspviridae</i>	Non - enveloped, icosahedral	Linear ssRNA		24
	<i>Microviridae</i>	Non - enveloped, icosahedral	Circular dsDNA	2	
<i>Primavirales</i>	<i>Tristromaviridae</i>	Enveloped, rod - shaped	Linear dsDNA		2
<i>Vinavirales</i>	<i>Corticoviridae</i>	Non - enveloped, icosahedral	Circular dsDNA		1
<i>Timlovirales</i>	<i>Blumeviridae</i>	Non - enveloped, icosahedral	Linear ssRNA		31
	<i>Steitzviridae</i>	Non - enveloped, icosahedral	Linear ssRNA		117

தரவு 2 (தொ)

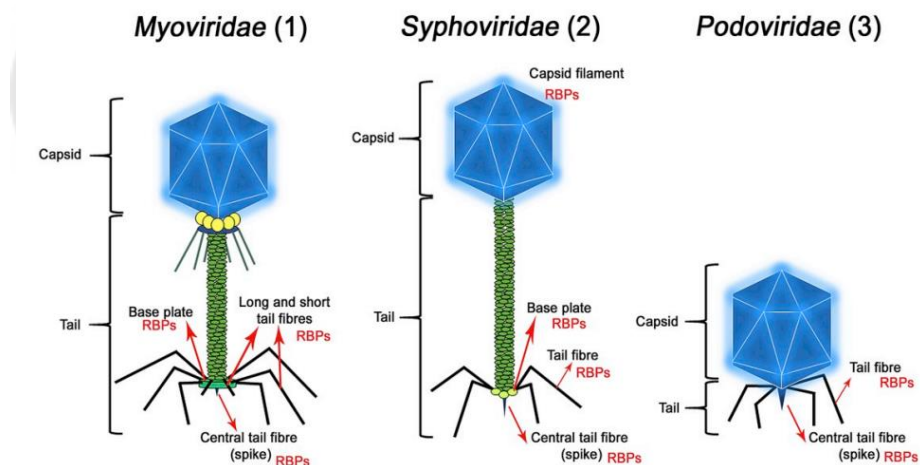
Order	Family	Morphology	Genome	Subfamilies	Genera
<i>Tubulvirales</i>	<i>Inoviridae</i>	Non - enveloped, filamentous	Circular dsDNA		21
	<i>Paulinoviridae</i>	Non - enveloped, filamentous	Circular dsDNA		2
	<i>Plectroviridae</i>	Non - enveloped, filamentous	Circular dsDNA		1
<i>Dumavirales</i>	<i>Picobirnaviridae</i>	Non - enveloped, icosahedral	Linear dsDNA		1
Unassigned	<i>Ampullaviridae</i>	Enveloped, bottle - shaped	Linear dsDNA		1
	<i>Autolykiviridae</i>	Non - enveloped, icosahedral	Linear dsDNA		2
	<i>Bicaudaviridae</i>	Non - enveloped, lemon - shaped	Circular dsDNA		1
	<i>Clavaviridae</i>	Non - enveloped, rod - shaped	Circular dsDNA		1
	<i>Finnlakeviridae</i>	Non - enveloped, icosahedral	Circular ssDNA		1
	<i>Fuselloviridae</i>	Non - enveloped, lemon - shaped	Circular dsDNA		2
	<i>Globuloviridae</i>	Enveloped, spherical	Linear dsDNA		1
	<i>Guttaviridae</i>	Non - enveloped, ovoid	Circular dsDNA		2
	<i>Halspiviridae</i>	Non - enveloped, lemon - shaped	Linear dsDNA		1
	<i>Plasmaviridae</i>	Enveloped, pleomorphic	Circular dsDNA		2
<i>Portogloboviridae</i>	<i>Portogloboviridae</i>	Enveloped, icosahedral	Circular dsDNA		1
	<i>Spiraviridae</i>	Non - enveloped, hollow cylindrical	Circular dsDNA		1
	<i>Thaspiviridae</i>	Nonenveloped, lemon - shaped	Linear dsDNA		1

จากการศึกษาเฟจโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนตั้งแต่ปี ค.ศ. 1959⁽⁸³⁾ พบว่าเฟจส่วนใหญ่จัดเป็นเฟจมีหาง โดยแฟมิลีที่มีการศึกษามากที่สุดมี 3 แฟมิลี คือ *Myoviridae*, *Siphoviridae* และ *Podoviridae* โดยแต่ละแฟมิลีมีลักษณะดังนี้ (ภาพประกอบ 5)

Myoviridae ส่วนหัวเป็นรูปร่างเหลี่ยมแบบสมมาตร (icosahedral symmetry) มีแคพซิดห่อหุ้มจีโนม ไม่มีเยื่อหุ้ม หางสามารถยืดหดได้ และมีชีท (sheath) หุ้มรอบหาง เฟจกลุ่มนี้พบร้อยละ 25.1 ของเฟจมีหางทั้งหมด

Siphoviridae ส่วนหัวเป็นรูปร่างเหลี่ยมแบบสมมาตร มีแคพซิดห่อหุ้มจีโนม ไม่มีเยื่อหุ้ม มีหางยาว แต่ไม่สามารถยืดหดได้ และไม่มีชีทหุ้มรอบหาง พบร้อยละ 60.8 ของเฟจมีหางทั้งหมด

Podoviridae ส่วนหัวเป็นรูปร่างเหลี่ยมแบบสมมาตร มีแคพซิดห่อหุ้มจีโนม ไม่มีเยื่อหุ้ม มีหางสั้น และไม่สามารถยืดหดได้ และไม่มีชีทหุ้มรอบหาง พบร้อยละ 14.1 ของเฟจมีหางทั้งหมด



ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของเฟจมีหาง (tailed phage) ในแฟมิลี *Myoviridae*, *Siphoviridae* และ *Podoviridae*⁽⁸⁴⁾

6.3 วงชีวิตของเฟจ

วงชีวิตของเฟจ แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ วงชีวิตแบบไลติก (lytic cycle) และวงชีวิตแบบไลโซเจนิค (lysogenic cycle)⁽⁸⁵⁾

6.3.1 วงชีวิตแบบไลติก (lytic cycle)

เฟจมีวงชีวิตเช่นนี้เรียกว่า ไลติกเฟจ (lytic phage) หรือไวรุเรนต์เฟจ (virulent phage) การเพิ่มจำนวนโดยใช้วงชีวิตนี้ ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน (ภาพประกอบ 6) ดังนี้

1. การเกาะติด (attachment หรือ adsorption) การเกาะติดของเฟจเริ่มจากการชนกันแบบสุ่มระหว่างเฟจและโฮสต์แบคทีเรียผ่านการเคลื่อนที่แบบบราวเนียน (Brownian motion)⁽⁸⁶⁾ จากนั้นจึงเกิดการยึดเกาะที่ไม่สามารถย้อนกลับได้ (irreversible binding) โดยอาศัยโปรตีนเกาะติดของเฟจ (receptor binding proteins; RBPs) จับกับรีเซพเตอร์ (receptor site) ของแบคทีเรีย⁽⁸⁷⁾ ส่งผลทำให้เกิดการเกาะติดแบบจำเพาะ⁽⁸⁸⁾ โดยจำนวนและตำแหน่งของ RBPs จะแตกต่างกันตามโครงสร้างของเฟจ (ภาพประกอบ 5) ตัวอย่างของ RBPs ได้แก่ tail fibers, central spike, baseplate และโครงสร้างแคพซิด^(88, 89) ในส่วนของตำแหน่งรีเซพเตอร์บนเซลล์แบคทีเรียอาจเป็นลิพโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) กรดไทโคอิก (teichoic acid) พอริน (porin) พิล (pili) หรือแฟลกเจลลา เป็นต้น⁽⁹⁰⁾ ซึ่งแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกหรือแกรมลบ รวมถึงอาจแตกต่างกันในระดับสปีชีส์และสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วย⁽⁹¹⁾ โดยการยึดเกาะของเฟจกับโฮสต์จะเกิดที่ตำแหน่งรีเซพเตอร์ที่จำเพาะ ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงเป็นขั้นตอนที่มีความจำเพาะสูง⁽⁹²⁾ ซึ่งเฟจส่วนใหญ่มีความสามารถในการติดเชื้อแบคทีเรียได้เพียงหนึ่งหรือสองสปีชีส์เท่านั้น

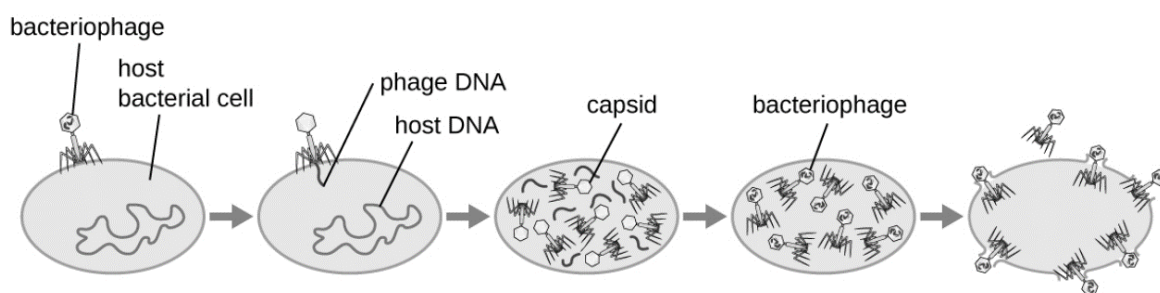
2. การส่งกรดนิวคลีอิกของเฟจเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย (penetration) ในขั้นตอนนี้เฟจจะปลดปล่อยเพียงกรดนิวคลีอิกผ่านผนังเซลล์เข้าสู่ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์แบคทีเรีย โดยที่ส่วนของแคพซิดและองค์ประกอบอื่นจะยังคงอยู่ภายนอกเซลล์แบคทีเรีย

3. การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโครงสร้างของเฟจ (biosynthesis) เมื่อกรดนิวคลีอิกของเฟจเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย การสังเคราะห์อาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอของแบคทีเรียจะหยุดลง จากนั้นจึงมีการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีนของเฟจ โดยอาศัยองค์ประกอบหรือเมแทบอลิซึมของโฮสต์ เริ่มจากการจำลองดีเอ็นเอของเฟจ จากนั้นดีเอ็นเอของเฟจจะถูกถอดรหัสเป็น mRNA ซึ่ง mRNA นี้จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนของเฟจต่อไป โดยการแปลรหัสในช่วงแรก (early mRNA) จะถูกแปลรหัสเป็นเอนไซม์และโปรตีนที่จำเป็นสำหรับการติดเชื้อในแบคทีเรีย ส่วน mRNA ที่ถูกสร้างขึ้นในช่วงหลัง (late mRNA) จะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนโครงสร้างของเฟจ ได้แก่

แคพซิด หาง รวมถึงเอนไซม์ที่จำเป็นในการแตกสลายเซลล์แบคทีเรียเพื่อปลดปล่อยอนุภาคเฟจรุ่นใหม่่ออกมา

4. การประกอบตัวของเฟจ (maturation หรือ assembly) ในขั้นตอนนี้โปรตีนโครงสร้างของเฟจจะเกิดการประกอบตัวเข้าด้วยกัน โดยส่วนของกรดนิวคลีอิกของเฟจที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจะถูกบรรจุเข้าสู่แคพซิด จากนั้นส่วนประกอบของแคพซิด ซีทห่อหุ้ม และหางจะถูกนำมาเชื่อมต่อกันและประกอบกันเป็นอนุภาคเฟจที่สมบูรณ์

5. การแตกสลายของแบคทีเรีย (lysis) ในขั้นตอนนี้ออนุภาคเฟจรุ่นใหม่จะถูกปลดปล่อยออกมาหลังจากเซลล์แบคทีเรียแตกสลายแล้ว ซึ่งเกิดจากการถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากเฟจ ได้แก่ เอนโดไลซิน (endolysin) และโฮลิน (holin)



ภาพประกอบ 6 วงชีวิตแบบไลติก⁽⁹³⁾

6.3.2 วงชีวิตแบบไลโซเจนิค (lysogenic cycle)

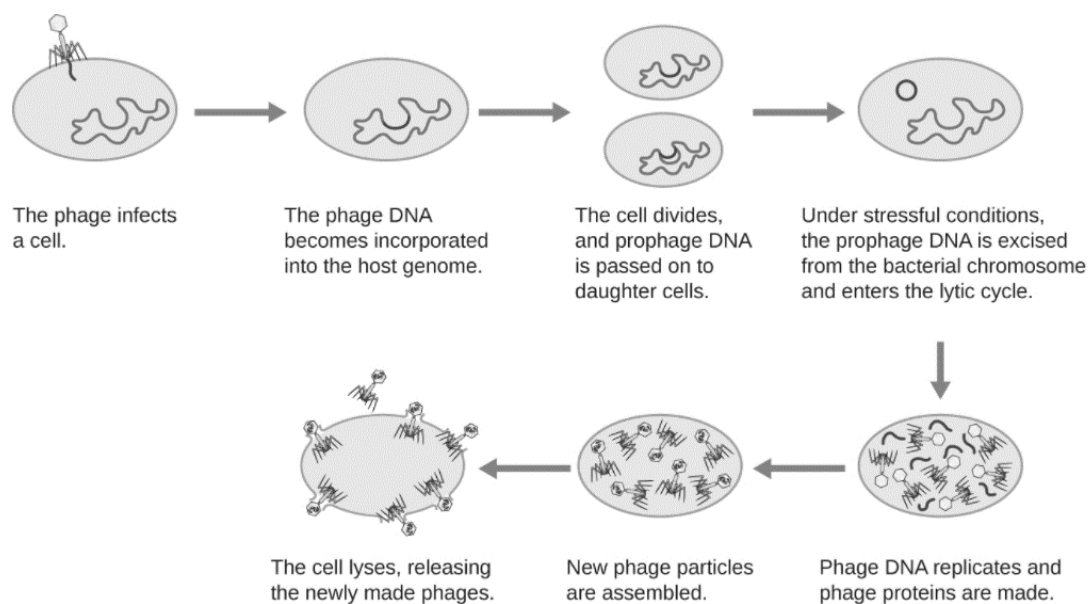
เฟจที่มีวงชีวิตแบบไลโซเจนิคนี้จะเรียกว่า ไลโซเจนิคเฟจ (lysogenic phage) หรือเทมเพอเรตเฟจ (temperate phage) (ภาพประกอบ 7) โดยวงชีวิตแบบไลโซเจนิค ประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้⁽⁸⁵⁾

1. การเกาะติด จะมีลักษณะเช่นเดียวกับวงชีวิตแบบไลติก
2. การส่งกรดนิวคลีอิกของเฟจเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย โดยเริ่มจากดีเอ็นเอของเฟจจะถูกส่งเข้าไปในไซโตพลาสซึมของแบคทีเรียในรูปสายตรงจากนั้นจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปวงแหวนปิด

3. การแทรกดีเอ็นเอของเฟจในโครโมโซมของโฮสต์ (integration) เมื่อดีเอ็นเอของเฟจเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย เฟจจะเริ่มจำลองดีเอ็นเอ ถอดรหัสและแปลรหัสได้เป็นโปรตีนยับยั้ง (repressor protein) ซึ่งทำหน้าที่ขัดขวางการทำงานของ RNA polymerase ส่งผลให้ไม่สามารถเกิดการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอและโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบต่าง ๆ ของเฟจได้ จากนั้น

เฟจจะแทรกดีเอ็นเอของเฟจเข้าสู่โครโมโซมของแบคทีเรีย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์อินทิเกรส (integrase enzyme) ซึ่งเฟจในตอนนี้จะถูกรเรียกว่า โปรเฟจ (prophage) โดยแบคทีเรียที่มีดีเอ็นเอของเฟจแทรกอยู่หรือมีโปรเฟจ จะเรียกแบคทีเรียนี้ว่า ไลโซเจน (lysogen) เมื่ออยู่ในระยะนี้ โปรเฟจจะถูกเพิ่มจำนวนไปพร้อม ๆ กับการจำลองดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ส่งผลให้แบคทีเรียเซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นมีโปรเฟจแฝงอยู่ จากการแทรกของโปรเฟจนี้อาจทำให้แบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลง phenotype ที่แตกต่างไปจากเดิม เช่น เกิดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ หรือเปลี่ยนจากสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค (non - pathogenic strain) ไปเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคได้ (virulent strain) ซึ่งปรากฏการณ์นี้เรียกว่า lysogenic conversion

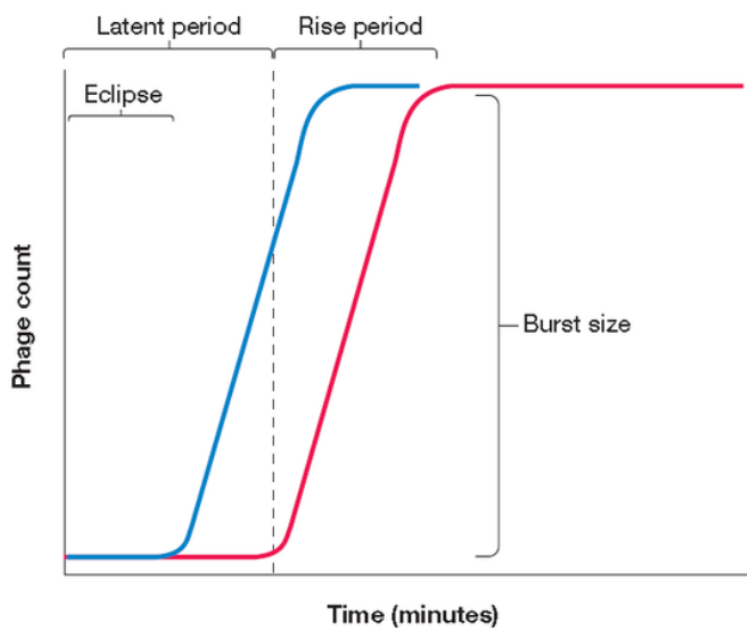
4. การชักนำสู่วงชีวิตแบบไลติก (induction) การชักนำเข้าสู่วงชีวิตแบบไลติก อาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น ดีเอ็นเอของแบคทีเรียได้รับความเสียหาย โปรเฟจจึงหลุดออกจากโครโมโซมของแบคทีเรียเข้าสู่วงชีวิตแบบไลติก รวมถึงอาจเกิดจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น แสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet) หรือสารเคมี เช่น มิโตมายซินซี (mitomycin C) ส่งผลให้โปรตีนยับยั้งถูกทำลาย และเหนี่ยวนำให้เฟจเข้าสู่วงชีวิตแบบไลติกได้⁽⁹⁴⁾



ภาพประกอบ 7 วงชีวิตของไลโซเจนิคเฟจ⁽⁹³⁾

6.4 กราฟการเจริญของเฟจ (one - step growth curve)

การศึกษากราฟการเจริญของเฟจเกิดขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1939 โดย Max Delbrück และ Emory Ellis นักชีวเคมีชาวอเมริกัน⁽⁹⁵⁾ โดยกราฟการเจริญของเฟจ เป็นการศึกษาการเจริญของเฟจอย่างต่อเนื่อง ทำให้ทราบถึง latent period ซึ่งหมายถึง ระยะเวลาตั้งแต่เฟจเริ่มเกาะติดจนถึงเวลาที่เฟจทำให้เซลล์แบคทีเรียเกิดการแตกครั้งแรก และ rise period หมายถึง ระยะเวลาที่เฟจทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกครั้งแรกเป็นต้นไป โดย burst size แสดงจำนวนอนุภาคของเฟจหลังจากเพิ่มจำนวนต่อโฮสต์ 1 เซลล์ คำนวณได้จากอัตราส่วนของจำนวนเฟจที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์แบคทีเรียในช่วงสุดท้ายของ latent period ต่อจำนวนเฟจที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์แบคทีเรียครั้งแรก⁽⁹⁶⁾ (ภาพประกอบ 8)



ภาพประกอบ 8 กราฟการเจริญของเฟจ⁽⁹⁷⁾

6.5 การศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจ

ในปัจจุบันการศึกษาลำดับจีโนมของเฟจ มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและจัดจำแนกคุณลักษณะ โดยอาศัยการจัดเรียงตัวของบริเวณยีนอนุรักษ์ (conserved genes) ลำดับนิวคลีโอไทด์และ ลำดับกรดอะมิโน^(98, 99) การหาลำดับเบสที่สมบูรณ์ของเฟจชุดแรกสำเร็จในปี ค.ศ.1977 โดยพบว่าเฟจ Φ X174 มีสารพันธุกรรมแบบ single stranded DNA (ssDNA) และมีขนาดเท่ากับ 5,386 คู่เบส⁽¹⁰⁰⁾ และการศึกษาลำดับเบสของเฟจที่มีสารพันธุกรรมแบบ double - stranded DNA (dsDNA) ที่สำเร็จตัวแรกคือ เฟจ lambda โดยพบว่ามีความยาวจีโนมเท่ากับ 48,502 คู่เบส⁽¹⁰¹⁾ ความก้าวหน้าในการศึกษาจีโนมเฟจสามารถบอกได้ว่าจีโนมของเฟจมีปฏิสัมพันธ์กันอย่างไร และจีโนมของเฟจมีปฏิสัมพันธ์ต่อจีโนมของโฮสต์ของเฟจนั้นอย่างไร นอกจากนี้เฟจมีกลไกการวิวัฒนาการอย่างไร นอกจากนี้จีโนมของเฟจถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมต่าง ๆ เช่น การนำจีโนมเฟจไปใช้เป็นดีเอ็นเอพาหะสำหรับการเพิ่มจำนวนยีน (gene cloning) ที่สนใจ^(102, 103) โดยการศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจ ทำให้ได้ข้อมูลความยาวของจีโนมเฟจ ลักษณะของจีโนมเฟจ (linear หรือ circular) ชนิดของสารพันธุกรรม (ssRNA, dsRNA, ssDNA หรือ dsDNA) สัดส่วนของคู่เบส guanine และ cytosine (GC content) โดยข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดของเฟจจะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมต่าง ๆ และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ช่วยทำให้ทราบข้อมูล ได้แก่ ตำแหน่ง open reading frames (ORFs) ข้อมูลโปรตีนที่ถอดรหัสได้ (protein encode) โดยการศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจมีความสำคัญอย่างมากต่อการนำเฟจไปประยุกต์ใช้ โดยมีกำหนดให้เป็นหนึ่งในคุณสมบัติของเฟจที่ควรตรวจสอบก่อนการนำเฟจไปใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ โดยผลการวิเคราะห์ลำดับจีโนมเฟจที่ต้องการทราบ คือ เฟจมีวงชีวิตแบบใด เนื่องจากเฟจที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ต้องเป็นไลติกเฟจ ซึ่งต้องไม่ปรากฏยีนที่เกี่ยวข้องกับวงชีวิตแบบไลโซเจนิค ได้แก่ integrase gene, repressor gene และ anti - repressor gene นอกจากนี้จีโนมเฟจต้องไม่ปรากฏยีนที่แปลรหัสให้สารพิษหรือไม่ปรากฏยีนดื้อยา

6.6 การประยุกต์ใช้เฟจในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในนม

เฟจมีบทบาททั้งในด้านที่ดีและไม่ดีในการผลิตนม โดยมุมมองก่อนหน้านี้พบว่า เฟจเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ลายหัวเชื้อในการหมักนมส่งผลให้นมหมักล้นเหลวและก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ⁽¹⁰⁴⁾ แต่ในปัจจุบันเฟจถูกนำมาใช้ในทางที่เป็นประโยชน์มากขึ้น โดยใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในการลดจำนวนเชื้อก่อโรคหรือแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียในผลิตภัณฑ์นม⁽¹⁰⁵⁾ โดยงานวิจัยที่ใช้เฟจในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียในนม มีดังนี้

Tanaka และคณะ (2018)⁽¹⁰⁶⁾ ได้ศึกษาความสามารถของเฟจ HU1 ในการควบคุม *P. lactis* YT4 ในอาหารเหลว 3 ประเภท ได้แก่ CM - LB broth นมขาดมันเนย และนมเต็มมันเนย ที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากผลการทดลองพบว่า เฟจ HU1 สามารถลด ปริมาณ *P. lactis* YT4 ลงประมาณ 3 log CFU/mL ในอาหารเหลวทั้ง 3 ชนิด ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 32 เมื่อเทียบกับชุดควบคุมหรือชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมเฟจ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเฟจสามารถนำมา ประยุกต์ใช้ในการลดจำนวนเชื้อในนมและผลิตภัณฑ์นมได้ ซึ่งช่วยในการรักษาคุณภาพของนมดิบ และผลิตภัณฑ์นม

Tahir และคณะ (2017)⁽¹⁰⁷⁾ ศึกษาความสามารถของเฟจ SA, SA2 และ SANF ใน การควบคุม *Staphylococcus aureus* RP โดยทำการทดสอบในนมพาสเจอร์ไรซ์ทางการค้า ที่ อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่า เฟจ SANF แสดงประสิทธิภาพสูงสุด ในการลดปริมาณ *S. aureus* RP ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยสามารถลดปริมาณเชื้อได้ ร้อยละ 96 อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพจะลดลงเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถ ลดปริมาณเชื้อได้เพียงร้อยละ 31 เช่นเดียวกับเฟจ SA ที่ประสิทธิภาพในการลดจำนวน *S. aureus* RP ลดลงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่เฟจ SA2 มีประสิทธิภาพในการลด *S. aureus* RP เพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากการศึกษาชิ้นนี้ชี้ให้เห็นว่าเฟจสามารถใช้เป็นตัวควบคุม ทางชีวภาพในนมได้

O'Flaherty และคณะ (2005)⁽¹⁰⁸⁾ ศึกษาความสามารถของเฟจ K ในการควบคุม *S. aureus* DPC5645 ซึ่งคือยาลปฏิชีวนะอิริโทรมัยซิน โดยทำการทดสอบในอาหารเหลว 8 ชนิด ได้แก่ Brain - heart infusion (BHI) broth, Heat treated (HT) milk, raw milk, Dry cow secretion (DCS), HT whey, whey, unhomogenized milk และ homogenized milk ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่า เฟจ K สามารถลดปริมาณ *S. aureus* DPC5645 ใน อาหารเหลว BHI, HT milk, HT whey และ whey ได้โดยลดปริมาณ *S. aureus* DPC5645 จนไม่ สามารถตรวจสอบได้ภายใน 2 หรือ 4 ชั่วโมงหลังจากการเติมเฟจ แต่เฟจ K ไม่สามารถลดปริมาณ *S. aureus* DPC5645 ได้ในอาหารเหลว raw milk, DCS, unhomogenized milk และลดจำนวน ได้น้อยในอาหาร homogenized milk จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเฟจ K แสดงประสิทธิภาพใน การควบคุมเชื้อแบคทีเรียได้ดีในอาหารที่ผ่านความร้อน ดังนั้นสิ่งที่ขัดขวางการเข้าติดเชื้อของเฟจ อาจเกิดจากอิมมูโนโกลบูลินที่ไม่ทนความร้อน (heat - labile immunoglobulins)

McLean และคณะ (2013)⁽¹⁰⁹⁾ ศึกษาความสามารถของเฟจรูปแบบผสม ได้แก่ EC6, EC9, EC11 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 9 log CFU/mL ในการควบคุม *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* O127: H6 และ *E. coli* O5:H - ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 log CFU/mL ในนมยูเอชทีและนมดิบที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิตู้เย็นที่ช่วงอุณหภูมิประมาณ 5 - 9 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่า เฟจผสมสามารถลดจำนวน *E. coli* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในนมยูเอชทีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ ภายใน 3 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิตู้เย็นภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่งการทดลองในนมยูเอชทีพบว่า ไม่มีการกลับมาเจริญซ้ำของ *E. coli* ทั้ง 3 สายพันธุ์ และจากผลการทดลองในนมดิบพบว่า เฟจผสมสามารถลดจำนวน *E. coli* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ภายใน 3 หรือ 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม พบว่า *E. coli* O5:H - กลับมาเจริญอีกครั้งหลังจาก 9 ชั่วโมง จากการทดลองชี้ให้เห็นว่า เฟจรูปแบบผสมมีประสิทธิภาพในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพทั้งในนมยูเอชทีและนมดิบ

6.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการติดเชื้อของเฟจ

การติดเชื้อของเฟจขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัย ดังนี้ (ภาพประกอบ 9)

1. อัตราส่วนของเฟจต่อโฮสต์ (phage - host ratio)

อัตราส่วนของจำนวนเฟจต่อจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปตามชนิดของเฟจและสายพันธุ์ของแบคทีเรีย⁽¹¹⁰⁾

2. เนื้อสัมผัสอาหาร (food matrix)

เนื้อสัมผัสอาหารที่ซับซ้อน มักจะรบกวนการเข้าเกาะติดของเฟจ⁽¹¹¹⁾ โครงสร้างทางเคมีกายภาพของเนื้อสัมผัสอาหารอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของเฟจ คืออาจทำให้เกิดการเข้าเกาะที่ไม่จำเพาะกับโมเลกุลของอาหาร เนื้อสัมผัสอาหารอาจขัดขวางการพบกันระหว่างเฟจและแบคทีเรีย หรือการมีสารยับยั้งเฟจอยู่ในอาหาร เช่น แอนติบอดีในนมดิบ เป็นต้น นอกจากนี้อาหารที่เป็นของเหลว เจล หรือของแข็ง รวมถึงองค์ประกอบภายในอาหาร เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ยังเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อการประยุกต์ใช้เฟจ⁽⁸⁴⁾ สำหรับในนมซึ่งมีสถานะเป็นของเหลวจะเอื้อต่อการกระจายของเฟจ ช่วยเพิ่มโอกาสที่เฟจจะสัมผัสกับแบคทีเรียเป้าหมายได้มากกว่าอาหารที่เป็นของแข็ง เช่น ชีส เนื่องจากอาหารที่เป็นของแข็งจะจำกัดการแพร่กระจายของเฟจไปยังเนื้อสัมผัสอาหารทั้งหมด⁽¹¹²⁾

3. สภาพแวดล้อม (environment)

สภาพแวดล้อมในที่นี้คือ ค่า pH และอุณหภูมิ โดยที่อุณหภูมิสูงและ pH ต่ำ จะส่งผลให้เฟจหยุดการทำงาน⁽¹¹³⁾ โดยปัจจัยด้านสภาพแวดล้อมนี้สามารถเปลี่ยนแปลงเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์นม ซึ่งอาจช่วยหรือขัดขวางกระบวนการเข้าเกาะติดระหว่างแบคทีเรียกับเฟจ⁽⁸⁴⁾ ทั้งนี้เฟจแต่ละตัวจะมีความเสถียรต่อ pH และอุณหภูมิแตกต่างกันดังตาราง 3

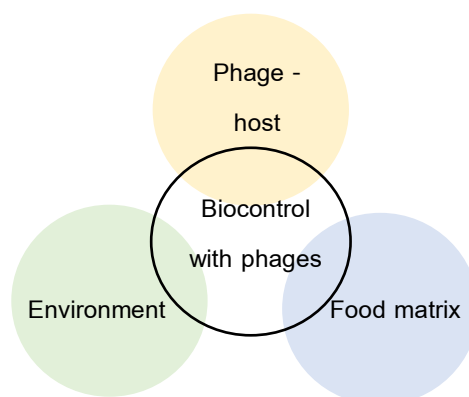


ตาราง 3 รายงานผลของอุณหภูมิและ pH ต่อเฟจ

Family	สารพันธุกรรมและโครงสร้างของเฟจ	สมาชิก	ผลของอุณหภูมิและ pH
Myoviridae	Linear dsDNA		การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze - drying) อาจทำให้เกิดอันตรายกับเฟจใน family นี้ ⁽¹¹⁴⁾
	Non - enveloped, contractile tail ประกอบด้วย Sheath และ central tube	T2	เฟจ T2 มีความเสถียรในช่วง pH เท่ากับ 5 - 9 และมีความเสถียรมากที่สุดในช่วง pH 5 - 6 ⁽¹¹⁵⁾
		T4	เฟจ T4 มีความเสถียรในช่วง pH เท่ากับ 6 - 7.4 และมีความเสถียรลดลงที่ค่า pH ต่ำกว่า 5 และ 9.2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสามารถทนการต้มที่ 65 เปรอร์เซ็นต์ หลังจากการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ⁽¹¹⁶⁾
		CP - 51	เฟจ CP - 51 ไวต่ออุณหภูมิต่ำ (น้อยกว่า 0°C) และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส มีค่า pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 5.6 ⁽¹¹⁷⁾
Siphoviridae	Linear dsDNA	λ	เฟจ λ มีความเสถียรในช่วงกว้างที่ pH 3 - 11 เมื่อไม่นาน 24 ชั่วโมง ที่ 19 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรที่ 4 องศาเซลเซียส โดยสามารถเก็บรักษาไว้ได้นานกว่า 6 เดือน ⁽¹¹⁸⁾
	Non - enveloped, long non - contractile tail	T1	เฟจ T1 ไวต่อค่า pH ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 3
		TSP4	เฟจ TSP4 สามารถทนกิจกรรมการติดเชื้อได้ที่อุณหภูมิสูง โดยมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสม เท่ากับ 65 องศาเซลเซียส ⁽¹¹⁹⁾

ตาราง 3 (ต่อ)

Family	สารพันธุกรรมและโครงสร้างของเฟจ	สมาชิก	ผลของอุณหภูมิและ pH
<i>Podoviridae</i>	Linear dsDNA Non - enveloped, short non - contractile tail	T3	เฟจ T3 มีความเสถียรที่ค่า pH ช่วง 5 – 9.2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสามารถอยู่รอดได้ 98 เปอร์เซ็นต์หลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ⁽¹¹⁶⁾
		T7	เฟจ T7 มีความไวที่ค่า pH ต่ำมากกว่า เฟจ T3 และมีความเสถียรมากกว่าที่สภาวะความเป็นคู่เบส เมื่อป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 0.5 – 2.0 องศาเซลเซียส ค่า pH เท่ากับ 6 – 8 เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเฟจ ⁽¹²⁰⁾
		28B	เฟจ 28B มีความเสถียรอย่างมาก (เป็นเวลา 6 เดือน) ในบัลลวาระที่มีค่า pH เท่ากับ 9 ⁽¹²¹⁾
<i>Microviridae</i>	Circular ssDNA Non - enveloped, isometric	ΦX174	ΦX174 สามารถรอดชีวิตได้ 80 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ⁽¹¹⁶⁾
<i>Corticoviridae</i>	Superhelical, circular dsDNA Non - enveloped, isometric, lipid layer in capsid	PM2	เฟจ PM2 มีความเสถียรที่ค่า pH เท่ากับ 6 – 8 และสูญเสียกิจกรรมการติดเชื้อที่ค่า pH เท่ากับ 5 หลังจาก 1 ชั่วโมง เมื่อป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ⁽¹²²⁾
<i>Tectiviridae</i>	Linear dsDNA Non - enveloped, isometric, inner lipoprotein vesicle	PRD1 AP50	เฟจ PRD1 มีความเสถียรที่ค่า pH ช่วง 5 – 8 ⁽¹²²⁾ และสามารถเก็บรักษาไว้ยาวนานหลายปีในอาหารเหลวที่ 4 องศาเซลเซียส และสามารถรอดชีวิตได้ที่ -80 องศาเซลเซียส ⁽¹²³⁾ การเก็บรักษาเฟจ AP50 ควรทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เนื่องจากเฟจดังกล่าวจะสูญเสียความสามารถในการติดเชื้อเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 และ 4 องศาเซลเซียส ⁽¹²³⁾



Biocontrol with phages = Phage + bacteria × [Physical structure of food + Food molecules] × Environmental conditions

↓ ↓ ↓ ↓

Multiplicity of infection Liquid matrices Carbohydrates, proteins pH
 Receptor localization Gel matrices Lipids, Bioactive molecules Temperature

ภาพประกอบ 9 ปัจจัยที่มีผลต่อการติดเชื้อของเฟจ⁽⁸⁴⁾

6.8 แนวทางความปลอดภัยในการประยุกต์ใช้เฟจ

จากรายงานของ Hagens และ Loessner (2010)⁽¹²⁴⁾ แสดงคุณสมบัติของเฟจที่ควรตรวจสอบก่อนการนำไปใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพสำหรับอาหารที่มีนมเป็นส่วนประกอบและอาหารอื่น ๆ ได้แก่

1. ต้องเป็นไลติคเฟจ เพื่อให้มั่นใจว่าจะไม่เกิดการแทรกตัวของดีเอ็นเอของเฟจในโครโมโซมของโฮสต์
2. ต้องมีความสามารถในการติดเชื้อในช่วงกว้าง (wide host range)
3. ทราบลำดับสารพันธุกรรมทั้งหมดของเฟจที่จะนำมาประยุกต์ใช้
4. เฟจที่ใช้ต้องไม่เป็นตัวถ่ายทอดสารพันธุกรรมของแบคทีเรีย
5. การเพิ่มจำนวนเฟจต้องไม่ใช้โฮสต์เป็นแบคทีเรียก่อโรค
6. เฟจต้องมีความเสถียรในระหว่างการเก็บและการประยุกต์ใช้
7. เฟจต้องไม่ส่งผลกระทบต่อผู้ได้รับถ้ามีการให้เฟจผ่านทางรับประทาน
8. เฟจต้องสามารถขยายระดับการผลิตได้สำหรับการผลิตทางการค้า

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

กระบอกฉีดยา (Syringe) (Nipro, Thailand)

กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Microscope) (Olympus Optical Co.Ltd, Japan)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope) (Jeol, USA)

เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaker) (Chemoscience, Thailand)

เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer) (Scientific Industries, Inc., USA)

เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Dry bath incubator)

เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation) (Bio - Rad, USA)

เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) (Merck, USA)

เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบไม่ควบคุมอุณหภูมิ (Microcentrifuge) (Witeg Labortechnik GmbH, Germany)

เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR thermal cycler) (Scilogex, USA)

เครื่องยูวี - วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV - visible spectrophotometer) (Shimadzu, Japan)

เครื่องวัด pH (pH meter) (Denver Instrument, USA)

เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) (Mupid, Japan)

ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส (Freezer) (Sanden intercool, Thailand)

ตู้อบเชื้อ (Incubator) (Gallenkamp, UK)

ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) (Science Tech, Canada)

ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot - air sterile oven) (Thermo Fisher Scientific, USA)

หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) (Tomy, Japan)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (Witeg Labortechnik GmbH, Germany)

สารเคมี และ อาหารเลี้ยงเชื้อ

Agar (Himedia, India)

Agarose (Invitrogen, New Zealand)
Ammonium persulfate (Bio - Rad, USA)
Azocasein (Sigma - Aldrich, USA)
Beef extract (Himedia, India)
Bromophenol blue (Bio - Rad, USA)
Cetrimide agar (TM Media, India)
Chloroform (RCI Labscan Limited, Thailand)
D (+) - glucose (Thermo Fisher Scientific, USA)
Ethanol (Merck, USA)
Ethidium bromide (Sigma Chemical, USA)
GelRed Loading Buffer (Biosharp, China)
Glycerol (Merck, USA)
Isopropanol (Merck, USA)
Peptone (Himedia, India)
Phenol (Amresco, USA)
Polyethylene glycol 8000 (Sigma Chemical, USA)
Skim milk (TM Media, India)
Sodium azide (Thermo Fisher Scientific, USA)
Sodium chloride (Thermo Fisher Scientific, USA)
Streptomyces griseus protease (Sigma - Aldrich, USA)
TE buffer (Bio Basic Inc., Canada)
Trichloroacetic acid (Thermo Fisher Scientific, USA)
Tris acetate EDTA (TAE) buffer
Tris base (Serva, Germany)

อุปกรณ์เพิ่มเติม

Cellulose acetate filter, pore size 0.45 μm (Sartorius, Germany)

Molecular marker

100 bp Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)
 ExcelBand™ All Blue Regular Range Protein Marker (SMOBIO, Taiwan)
 Generalar™ DNA ladder mix (Thermo Fisher Scientific, USA)
 Lambda DNA marker/*Hind*III (Thermo Fisher Scientific, USA)
 Loading dye (Thermo Fisher Scientific, USA)

สายพันธุ์อ้างอิง (Reference strains)

P. acidovorans TISTR 356
P. aeruginosa TISTR 2370
P. fluorescens TISTR 1887
P. fluorescens TISTR 2237
P. fluorescens TISTR 358
P. fluorescens TISTR 903
P. fluorescens TISTR 904
P. otitidis TISTR 2468
P. putida TISTR 1521

วิธีการทดลอง

1. การคัดแยกเชื้อ *Pseudomonas*

เจือจางนมดิบปริมาตร 25 มิลลิลิตรในอาหาร Nutrient broth (NB) ที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่า (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิต่ำ นำตัวอย่างที่บ่มแล้วมา spread บนอาหาร cetrimide agar (ภาคผนวก ก) และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากการบ่มจะคัดเลือกโคโลนีที่มีสีฟลูออเรสเซนต์ขนาดเล็ก กลม ขอบเรียบ โดยโคโลนีลักษณะดังกล่าวจะถูกทำให้บริสุทธิ์ และนำไปย้อมสีแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่าง คัดเลือกเชื้อที่ติดสีแกรมลบ รูปท่อน และไม่สร้างสปอร์ มาใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การจัดจำแนกเชื้อ *Pseudomonas*

2.1 การจัดจำแนกเชื้อโดย Biochemical test

นำเชื้อบริสุทธิ์ของไอโซเลทที่แยกได้ในข้อ 1 มาจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางชีวเคมี ได้แก่ การทดสอบปฏิกิริยา IMViC การทดสอบการผลิตเอนไซม์ gelatinase (Gelatin hydrolysis test) การทดสอบการผลิตเอนไซม์ catalase การทดสอบการผลิตเอนไซม์ oxidase การทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (Oxidative Fermentative (OF) test) และทำการจัดจำแนกเชื้อตามวิธีมาตรฐานในคู่มือ Bergey's manual of determinative bacteriology⁽¹²⁵⁾ และวิธีตามงานวิจัยของ Al-Saffar และคณะ (2019)⁽¹²⁶⁾ โดยไอโซเลทที่จัดเป็นเชื้อ *Pseudomonas* จะให้ผลแสดงดังตาราง 4

ตาราง 4 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Pseudomonas*

คุณสมบัติทางชีวเคมี	<i>Pseudomonas</i>
การทดสอบปฏิกิริยา IMViC	
- การทดสอบการสร้าง indole	-
- การทดสอบ methyl red	-
- การทดสอบ Voges - Proskauer	-
- การทดสอบการใช้น้ำ citrate	+
การทดสอบการผลิตเอนไซม์ gelatinase	+
การทดสอบการผลิตเอนไซม์ catalase	+
การทดสอบการผลิตเอนไซม์ oxidase	+
การทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน	+/-

2.2 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *Pseudomonas*

นำเชื้อบริสุทธิ์ของไอโซเลทที่คาดว่าเป็น *Pseudomonas* ที่ได้จากข้อ 2.1 มาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธีสกัดด้วยสารละลายฟีนอล - คลอโรฟอร์ม (phenol - chloroform method) ตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989)⁽¹²⁷⁾ โดยนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนมีค่าความขุ่นที่ OD₆₀₀ ประมาณ 1.0 - 1.2 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000×g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปละลายในสารละลาย lysis buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

และนำไปต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 5 - 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย sodium dodecyl sulfate (SDS) 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลาย phenol - chloroform (อัตราส่วน 1: 1) ให้เท่ากับสารละลายที่มีอยู่เดิม ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปกลับมาเบา ๆ ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว $10,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสชั้นบน (aqueous phase) ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจีใหม่ และทำซ้ำตามขั้นตอนข้างต้นจนกระทั่งไม่เห็นชั้นของโปรตีน (interface) จึงเติมสารละลายคลอโรฟอร์มปริมาตรเท่ากับปริมาตรที่มีอยู่เดิม และทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว $10,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย sodium acetate โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.3 M และเติมสารละลาย isopropanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิตร เก็บไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว $10,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นเติมสารละลาย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่เย็น ทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็ว $10,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นระเหยสารละลาย ethanol ออก ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE buffer (ภาคผนวก ข) นำดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้มาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

การตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำได้โดยใช้อะกาโรส (agarose) 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผสมกับสารละลาย TAE buffer (ภาคผนวก ข) หลอมให้เจลละลาย และเติมสีย้อมดีเอ็นเอ GelRed™ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสาร CoralLoad Concentrate (10X) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1X วิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ภายในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE (1X) จากนั้นตรวจสอบเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (gel - documentation)

2.3 การจำแนกสปีชีส์โดยอาศัยลำดับคู่เบสบริเวณ 16S rRNA gene

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการสกัดจากข้อ 2.2 มาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ในการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียโดยใช้ universal primer ที่มีลำดับคู่เบสดังนี้

Forward primer (27F): 5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'

Reverse primer (1429R): 5' - TACGGYTACCTTGTTACGACTT - 3'

โดยขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จะมีความยาวประมาณ 1,500 คู่เบส โดยมีปริมาตร ส่วนผสมของ PCR reaction ทั้งหมดเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ดังตาราง 5 หลังจากนั้นนำหลอดลงใน เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและกำหนดสภาวะการทำ PCR ดังตาราง 6 PCR product ที่ได้ จะถูกตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีการอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส เช่นเดียวกับข้อ 2.2 เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับ 1 kb ladder ดีเอ็นเอของไอโซเลทที่มีการปรากฏแถบตามขนาดที่ ต้องการ จะถูกนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเทียบเคียงข้อมูลพันธุกรรมที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ ในฐานข้อมูล NCBI เพื่อการระบุสปีชีส์

ตาราง 5 ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA gene

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
2X TopTaq Master Mix Kit (QIAGEN)	25	1X
Forward primer 10 μ M	1	0.2 μ M
Reverse primer 10 μ M	1	0.2 μ M
น้ำกลั่นสำหรับ PCR	8	-
ดีเอ็นเอแม่แบบ	15	\leq 250 นาโนกรัม
รวม	50	

หมายเหตุ 2X TopTaq Master Mix Kit ประกอบด้วย TopTaq DNA Polymerase, PCR buffer (MgCl₂ 3 μ M) และ dNTP 400 μ M

ตาราง 6 ขั้นตอนการทำ PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA gene

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	2 นาที	
Denaturation	94	45 วินาที	35 รอบ
Annealing	50	45 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	2 นาที	

2.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการจัดกลุ่ม

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA gene ที่ได้จากข้อ 2.3 จะถูกนำมาหาความสัมพันธ์และการจัดกลุ่ม โดยการสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor joining โดยโปรแกรม MEGA - X และทดสอบความเชื่อมั่นด้วยค่า bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ ทั้งนี้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *Pseudomonas* ที่แยกได้จากนมดิบ จะเปรียบเทียบกับ *Pseudomonas* สายพันธุ์อื่นที่มีรายงานการตรวจพบในนมดิบ และใช้ *P. aeruginosa* เป็น outgroup

3. การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสเบื้องต้น

ทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีนเคซีน หรือความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสเบื้องต้น ทำโดยขีดไอโซเลทของเชื้อ *Pseudomonas* ลงบนอาหาร skim milk agar (ภาคผนวก ก) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการย่อยโปรตีนเคซีนสังเกตจากการเกิดโซนใสรอบบริเวณที่มีการขีดเชื้อแบคทีเรียไว้⁽¹²⁸⁾

4. การตรวจหายีน *aprX*

การเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบในการทำ PCR ทำเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 2.2 เพื่อเพิ่มจำนวนยีนดีเอ็นเอของยีน *aprX* โดยใช้ primer ที่มีลำดับคู่เบสดังนี้⁽¹²⁹⁾

Forward primer (Pse_AprXF1): 5' - CAG ACCCTGACCCACGARATCGG - 3'

Reverse primer (Pre_AprXR1): 5' - TGAGGTTGATCTTCTGGTTCTGGG - 3'

โดยขนาดยีนดีเอ็นเอที่ได้ควรมีความยาว 450 คู่เบส โดยส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR แสดงดังตาราง 7 หลังจากนั้นนำหลอดลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและกำหนดขั้นตอนการทำ PCR ดังตาราง 8 ยีน PCR product ที่ได้จะถูกตรวจสอบด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 2.2 ไอโซเลทที่มีการปรากฏแถบแบนตามขนาดที่ต้องการ จะถูกจัดว่ามียีนสำหรับการสังเคราะห์เอนไซม์โปรติเอส (*aprX* gene)

ตาราง 7 ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน *aprX*

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
2X TopTaq Master Mix Kit (QIAGEN)	25	1X
Forward primer 10 μ M	1	0.2 μ M
Reverse primer 10 μ M	1	0.2 μ M
น้ำกลั่นสำหรับ PCR	18	-
ดีเอ็นเอแม่แบบ	5	≤ 250 นาโนกรัม
รวม	50	

ตาราง 8 ขั้นตอนการทำ PCR ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีน *aprX*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	5 นาที	35 รอบ
Denaturation	94	20 วินาที	
Annealing	60	30 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	7 นาที	

5. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสทำตามวิธีของ Zhang และ คณะ (2020)⁽¹³⁰⁾ โดยใช้ azocasein เป็นซับสเตรต วิธีการทำได้โดยเตรียม azocasein 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 และ sodium azide 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) การเตรียมตัวอย่างเพื่อนำมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทำได้โดยนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร มาผสมรวมกับสารละลาย azocasein ที่เตรียมข้างต้น ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดตัวอย่างที่มีการผสมกับ azocasein มา 0.4 มิลลิลิตร ผสมกับ trichloroacetic acid 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ $14,000 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ค่า OD_{400} โดยค่า OD_{400} ที่ได้จะนำมาเปรียบเทียบ

กับกราฟมาตรฐานที่สร้างจากกิจกรรมการย่อยโปรตีนของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Streptomyces griseus* (3.5 unit/mg) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่า OD₄₀₀ (ภาคผนวก ง) โดยกิจกรรมการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ 1 unit จะเท่ากับกิจกรรมการย่อยโปรตีนของเอนไซม์โปรติเอสที่สร้างจาก *S. griseus* 1 มิลลิกรัม

6. การทดสอบการเจริญของเชื้อและกิจกรรมการย่อยโปรตีนที่เกิดขึ้นในอาหาร skim milk

การตรวจสอบจำนวนเชื้อแบคทีเรียและค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีนในอาหารที่มี skim milk เป็นองค์ประกอบ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ก) ทำได้โดยนำเชื้อ *Pseudomonas* สายพันธุ์ที่มีการสร้างเอนไซม์โปรติเอสที่ปรับความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นให้เท่ากับ 10² CFU/mL มาเติมลงในอาหาร skim milk ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 16 และ 24 ชั่วโมง นำมาวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA (ภาคผนวก ก) และวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตามวิธีการในข้อ 2.5 โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ในทุกชุดการทดลอง

7. การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธี zymography

การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสที่สร้างจาก *Pseudomonas* ด้วยวิธี zymography ทำตามวิธีของ Marchand และคณะ (2009)⁽²⁴⁾ โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* ในอาหารเหลว NB จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 13,000×g เป็นเวลา 15 นาที โดยส่วนใส 1 ส่วนถูกนำมาเจือจางใน zymography sample buffer 2 ส่วน (ภาคผนวก ค) ดูดสารละลายดังกล่าว 25 ไมโครลิตร ใส่ลงในแท่นเจลที่เทส่วนของ stacking gel (ภาคผนวก ค) และ separating gel (ภาคผนวก ค) เรียบร้อยแล้ว โดยในส่วนของ separating gel จะเติม skim milk 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงไปเพื่อเป็นซับสเตรตให้กับเอนไซม์ ตรวจสอบขนาดของเอนไซม์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 150 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที หลังจากการทำอิเล็กโทรโฟเรซิสเสร็จเรียบร้อยแล้ว ให้แกะเจลออก นำไปล้างใน Triton X - 100 2.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปแช่ใน development buffer solution (ภาคผนวก ค) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปย้อมด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue (ภาคผนวก ค) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาล้างสีออกในสารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน (destaining solution) (ภาคผนวก ค) จนกว่าจะมีการปรากฏแถบของโปรตีน และตรวจสอบมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสโดยเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน

8. การคัดแยกเฟจ

ใส่เชื้อ *Pseudomonas* ที่แยกได้จากนมดิบ จำนวน 1 - 2 ลูบ ลงในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร NB ความเข้มข้น 2 เท่า 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 - 4 ชั่วโมง เติมห่วงอย่างน้ำหรือนมดิบปริมาตร 25 มิลลิลิตรลงไป บ่มต่อในเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสมารองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนที่กรองได้มาวิเคราะห์ขั้นต่อไปว่ามีเฟจอยู่หรือไม่โดยเทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น (double agar layer method)

วิธีการทำอาหารวุ้นสองชั้นทำได้โดยดูดส่วนที่ผ่านการกรองที่คาดว่าจะมีเฟจ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเชื้อ *Pseudomonas* ที่ใช้เป็นโฮสต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหาร Nutrient soft agar (ภาคผนวก ก) ที่หลอมเหลวแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเทส่วนผสมที่ได้ลงบนหน้าอาหาร NA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและสังเกตพลาไคที่เกิดขึ้น (plaque formation)⁽⁸⁵⁾

9. การทำเฟจให้บริสุทธิ์

ใช้ลูบชุดบริเวณพลาไคเดียวมาใส่ลงในอาหาร NB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และเติมเชื้อแขวนลอย *Pseudomonas* ที่ใช้เป็นโฮสต์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสมารองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำสารแขวนลอยเฟจไปตรวจสอบพลาไคโดยใช้เทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น และชุดบริเวณพลาไคเดียวที่เกิดขึ้นมาทำซ้ำเช่นเดิม ทำการทดลองเช่นนี้ทั้งหมด 3 ซ้ำ เพื่อให้ได้เฟจที่สร้างพลาไคที่มีขนาดสม่ำเสมอและมีความบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป⁽⁸⁵⁾

10. การเพิ่มจำนวนเฟจ

การเพิ่มจำนวนเฟจทำได้โดยเทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น ตามวิธีการทดลองในข้อ 8 หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนเกิดพลาไค ให้ใช้ชุดบนหน้าวุ้นที่มีพลาไคมาใส่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำอาหารเหลวที่ประกอบด้วยเฟจไปปั่นเหวี่ยงที่ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที

เพื่อแยกเศษเซลล์แบคทีเรียและหน้าวุ้นอาหารออก ดูดส่วนใสมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ส่วนของเหลวที่ผ่านการกรองจะถูกนำมาหาปริมาณของเฟจโดยการทำเทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น และนับจำนวนพลาไคที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ⁽⁸⁵⁾ รายงานปริมาณเฟจในหน่วย Plaque Forming Unit /mL (PFU/mL) ซึ่งคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\text{ค่าความสามารถในการเกิดพลาไค (PFU/mL)} = \frac{\text{จำนวนพลาไค}}{\text{ปริมาตรเฟจที่ใช้} \times \text{ที่ระดับความเจือจาง}}$$

จากนั้นเฟจที่ได้จะเก็บรักษาในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

11. การตรวจสอบความสามารถของเฟจในการติดเชื้อ

การตรวจสอบความสามารถของเฟจในการติดเชื้อแบคทีเรียทำได้โดยวิธีการ spot test โดยผสมสารแขวนลอยของเชื้อ *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่าง ๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในอาหาร Nutrient soft agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่หลอมเหลวแล้ว จากนั้นเททับลงบนหน้าอาหาร NA รอจนวุ้นแข็งตัว จึงหยดสารแขวนลอยของเฟจ ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงไป นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยตรวจสอบความสามารถของเฟจในการติดเชื้อแบคทีเรียจากการเกิดโซนใสบริเวณที่หยดสารแขวนลอยของเฟจลงไป ซึ่งแสดงว่าเฟจสามารถติดเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้⁽⁸⁵⁾

12. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟจทำได้โดยนำ copper grid วางลงบนพลาไคที่ได้เตรียมได้จากเทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น จากนั้นนำมาย้อมสี uranyl acetate ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซับให้แห้งแล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยาย 100,000x⁽⁸⁵⁾

13. การหาอัตราส่วนของเฟจต่อโฮสต์ที่เหมาะสมในการติดเชื้อ

การหาอัตราส่วนของเฟจต่อโฮสต์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อทำได้โดยการผสมสารแขวนลอยเฟจกับสารแขวนลอยของโฮสต์ให้ได้อัตราส่วนของปริมาณเฟจต่อปริมาณโฮสต์ (Multiplicity of infection; MOI) เท่ากับ 100, 10, 1, 0.1, 0.01 และ 0.001 PFU/CFU ดังตาราง 9 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000×g

เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร สารแขวนลอยเฟจที่ได้จากการกรอง จะถูกนำไปนับจำนวนพลาคที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น นำมาคำนวณให้อยู่ในรูปของ PFU/mL⁽⁸⁵⁾

ตาราง 9 อัตราส่วนของค่า Multiplicity of infection (MOI) ที่ใช้ในการศึกษา

MOI (PFU/CFU)	ปริมาณเฟจ (log PFU/mL)	ปริมาณโฮสต์ (log CFU/mL)
100	10	8
10	10	9
1	10	10
0.1	9	10
0.01	8	10
0.001	7	10

14. การศึกษากราฟการเจริญของเฟจ

การศึกษากราฟการเจริญของเฟจทำได้โดยเพาะเลี้ยง *Pseudomonas* ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 8 log CFU/mL มาบ่มร่วมกับเฟจในปริมาตรที่เท่ากัน ที่ความเข้มข้นเฟจเท่ากับ 7 log CFU/mL เพื่อให้มีค่า MOI เท่ากับ 0.1 จากนั้นบ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดการเข้าเกาะของเฟจกับโฮสต์ นำส่วนผสมดังกล่าวมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ล้างแผ่นกรองด้วยอาหาร NB 3 - 4 ครั้ง เพื่อกำจัดเฟจอิสระที่อาจเกาะอยู่บนกระดาษกรองออก ส่วนเซลล์แบคทีเรียที่มีการติดเชื้อด้วยเฟจจะติดอยู่บนแผ่นกรอง คีบแผ่นกรองดังกล่าวมาใส่ในอาหาร NB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก ๆ 5 นาทีเป็นเวลา 120 นาที นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000×g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาเจือจางเพื่อนับปริมาณเฟจด้วยเทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้น⁽⁸⁵⁾

15. การศึกษาความเสถียรของเฟจ

นำเฟจที่แยกได้มาศึกษาความเสถียรต่อ pH และอุณหภูมิ โดยความเสถียรต่อ pH ทำได้ โดยใช้อาหาร NB ที่มีการปรับ pH ให้เป็น 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 โดยใช้ 1 M HCl หรือ 1 M NaOH จากนั้นเติมเฟจที่ความเข้มข้น 9 - 10 log PFU/mL บ่มเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วนความเสถียรต่ออุณหภูมิทำได้โดยบ่มเฟจความเข้มข้น 9 - 10 log PFU/mL ในอาหาร NB และ skim milk ที่อุณหภูมิ 4, 10, 30, 35, 37, 45, 65, 75 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง และอุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ (63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที) ปริมาณเฟจที่คงเหลือจะนำมาตรวจสอบด้วยวิธี plaque assay

16. การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* ในระดับห้องปฏิบัติการ

ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* ในระดับห้องปฏิบัติการ จะทดสอบในอาหารเหลว NB และ skim milk โดยการทดลองจะจำลองตามระดับการปนเปื้อนของแบคทีเรียในนมดิบ ซึ่งแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกจะเป็นการจำลองสภาวะการปนเปื้อนของแบคทีเรียในปริมาณสูง โดยผสมสารแขวนลอย *Pseudomonas* ความเข้มข้น 8 log CFU/mL ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเหลว NB หรือ skim milk ปริมาตร 40 มิลลิลิตร กลุ่มที่สอง เป็นการจำลองการปนเปื้อนแบคทีเรียในปริมาณต่ำ โดยผสมสารแขวนลอย *Pseudomonas* ความเข้มข้น 4 log CFU/mL ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังจากการเติมสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย ทั้งสองกลุ่มการทดลองจะถูกเติมสารแขวนลอยเฟจความเข้มข้น 10 log PFU/mL ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สำหรับการทดลองโดยใช้เฟจแบบเดี่ยว ส่วนการทดลองโดยใช้เฟจแบบผสมจะใช้เฟจ 2 ตัว โดยเติมสารแขวนลอยเฟจแต่ละตัวที่ความเข้มข้น 10 log PFU/mL ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร โดยชุดควบคุมจะแบ่งเป็นชุดควบคุมแบคทีเรียและชุดควบคุมเฟจ โดยชุดควบคุมแบคทีเรียจะไม่มีเฟจ แต่จะเติมอาหารเหลว NB หรือ skim milk แทนสารแขวนลอยเฟจ ส่วนชุดการควบคุมเฟจจะไม่มีแบคทีเรีย แต่จะเติมอาหารเหลว NB หรือ skim milk แทนสารแขวนลอยแบคทีเรีย ชุดการทดลองและชุดควบคุมจะถูกบ่มที่อุณหภูมิ 4, 10 และ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 0, 8, 16, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงของการบ่ม นำมานับจำนวนแบคทีเรียโดยการ spread เชื้อบนอาหาร NA นับจำนวนเฟจด้วยเทคนิคการทำอาหารอุ่นสองชั้น และวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตามวิธีการทดลองในข้อ 5

17. การสกัดดีเอ็นเอของเฟจ

การสกัดดีเอ็นเอของเฟจจะใช้วิธีของ Sambrook และคณะ (1989)⁽¹²⁷⁾ โดยเตรียมเฟจให้ได้ปริมาณสูงตามวิธีในข้อ 10 นำสารแขวนลอยเฟจที่เตรียมได้ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่มาเติม DNase I และ RNase I ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม NaCl ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 M และเติม PEG 8000 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำการกวนผสมจนกว่า NaCl และ PEG 8000 จะละลายจนหมด นำสารแขวนลอยในขวดรูปชมพู่ไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อให้เกิดการตกตะกอนของอนุภาคเฟจ หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ $14,000 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บตะกอนอนุภาคเฟจที่รวมตัวอยู่กับ PEG 8000 นำตะกอนที่ได้มาละลายใน TE buffer pH 8.0 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นเติม NaCl ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 M และ sodium dodecyl sulfate (SDS) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมคลอโรฟอร์มลงไปในสารแขวนลอยเฟจในปริมาณที่เท่ากับสารแขวนลอยเฟจ นำไปปั่นเหวี่ยง $10,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วน aqueous phase ไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ จากนั้นเติมฟีนอล:คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol) ในอัตราส่วน 25: 24: 1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ในปริมาณที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายที่มีอยู่เดิมในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยส่วนของ aqueous phase ที่ได้จะถูกย้ายไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ ทำขั้นตอนที่มีการเติมฟีนอล:คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ ซ้ำจนกว่าจะมองไม่เห็นส่วนของโปรตีนบริเวณ interface ที่อยู่ระหว่าง organic phase กับ aqueous phase จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24: 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในปริมาณที่เท่ากับปริมาตรของสารละลายที่มีอยู่เดิมในหลอด และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นจะตกตะกอนดีเอ็นเอของเฟจโดยการเติม 3 M sodium acetate ในอัตราส่วน 0.1 มิลลิลิตร ต่อปริมาตรสารละลายเฟจ 1 มิลลิลิตร และ ethanol ร้อยละ 95 ที่แช่เย็น 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำดีเอ็นเอของเฟจมาปั่นเหวี่ยงที่ $14,000 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตะกอนดีเอ็นเอของเฟจมาล้างด้วย ethanol ร้อยละ 70 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ดูดส่วนใสทิ้ง และปล่อยให้ ethanol ระเหยจนหมด และละลายตะกอนดีเอ็นเอของเฟจด้วย TE buffer pH 8.0 ตรวจสอบดีเอ็นเอของเฟจด้วย

วิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีในข้อ 2.2 และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ /HindIII)

18. การหาลำดับจีโนมทั้งหมด

18.1 การหาลำดับจีโนมทั้งหมดของ *Pseudomonas*

นำดีเอ็นเอของ *Pseudomonas* ที่ได้จากข้อ 2.2 ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง BGISEQ 500 ที่สถาบัน Beijing Genomics Institute ประเทศจีน ข้อมูลลำดับเบสทั้งหมดที่ได้จะถูกนำมาตรวจสอบคุณภาพผ่านโปรแกรม FASTQC V 0.12.1⁽¹³¹⁾ วิเคราะห์หาลำดับจีโนมทั้งหมดและประกอบนิวคลีโอไทด์เป็น contig โดยโปรแกรม SPAdes V 3.12⁽¹³²⁾ จากนั้นวิเคราะห์หา open reading frames (ORFs) ด้วยโปรแกรม Prokka V 1.15⁽¹³³⁾ และระบุหน้าที่ของยีนโดยโปรแกรม BLASTp จากฐานข้อมูล NCBI การสร้างแผนภาพจีโนมทำโดย CG-view server⁽¹³⁴⁾ หลังจากวิเคราะห์ข้อมูล ลำดับจีโนมทั้งหมดของ *Pseudomonas* ที่ได้จะถูกส่งไปจัดเก็บในฐานข้อมูลของ NCBI นอกจากนี้ยังมีการวิเคราะห์หายีนต่าง ๆ ภายในจีโนมของ *Pseudomonas* ดังนี้

การวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนต้านยาปฏิชีวนะ จะใช้โปรแกรม comprehensive antibiotic resistance database (CARD)⁽¹³⁵⁾

การวิเคราะห์ยีนที่แสดงความรุนแรงของโรค (virulence factor) จะใช้โปรแกรม virulence factor database (VFDB)⁽¹³⁶⁾

การตรวจสอบการปรากฏของ prophage จะใช้โปรแกรม PHASTER⁽¹³⁷⁾

การตรวจสอบการปรากฏของพลาสมิด จะใช้โปรแกรม PlasmidFinder V 2.1⁽¹³⁸⁾

18.2 การหาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจ

นำดีเอ็นเอเฟจที่ได้จากข้อ 17 ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง BGISEQ 500 ที่สถาบัน Beijing Genomics Institute ประเทศจีน การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับจีโนมทั้งหมด การประกอบนิวคลีโอไทด์เป็น contig การวิเคราะห์บริเวณ open reading frames (ORFs) การระบุหน้าที่ของยีน การสร้างแผนภาพจีโนม การวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนต้านยาปฏิชีวนะ และการวิเคราะห์ยีนที่แสดงความรุนแรงของโรค จะใช้โปรแกรมเช่นเดียวกับข้อ 18.1 และลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจจะถูกส่งไปจัดเก็บในฐานข้อมูลของ NCBI นอกจากนี้ยังมีการวิเคราะห์หา tRNA gene โดยใช้โปรแกรม tRNAscan - SE⁽¹³⁹⁾ และการตรวจสอบว่าเป็น virulent phage หรือไม่ โดยใช้โปรแกรม PhageAI⁽¹⁴⁰⁾

19. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเฟจ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของเฟจบริเวณ terminase large subunit gene จะถูกนำมาหาความสัมพันธ์และการจัดกลุ่ม โดยการสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor joining โดยโปรแกรม MEGA - X และทดสอบความเชื่อมั่นด้วยค่า bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเฟจที่แยกได้จะนำมาเปรียบเทียบกับเฟจที่ติดเชื้อใน *Pseudomonas* สปีชีส์อื่นรวมทั้งเฟจที่ติดเชื้อในแบคทีเรียอื่นที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Pseudomonas*

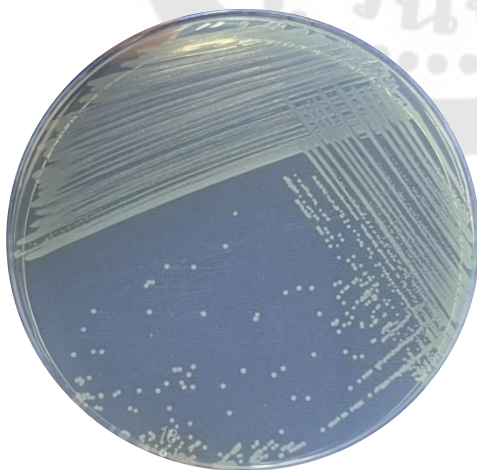
20. การทดสอบทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนในการทดลองตามวิธีข้อ 13, 15 และ 16 จะวิเคราะห์โดยใช้ One - Way ANOVA ซึ่งจัดกลุ่มและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Tukey's HSD (honestly significant different) test โดยพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 20

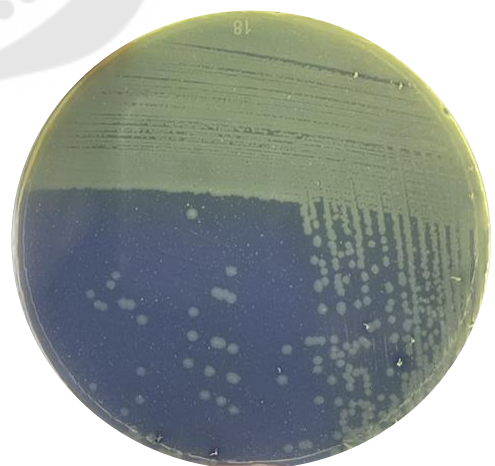
บทที่ 4 ผลการทดลอง

1. การคัดแยกเชื้อ *Pseudomonas*

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. จากตัวอย่างนมดิบและตัวอย่างน้ำ โดยนำโคโลนีที่เจริญบนอาหาร cetrimide agar มาทำให้บริสุทธิ์โดยการ cross streak พบว่า ได้เชื้อทั้งหมด 225 ไอโซเลท คัดเลือกเชื้อโดยอาศัยการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้น ได้แก่ รูปร่างท่อน ติดสีแกรมลบ โคโลนีขนาดเล็ก กลม ขอบเรียบที่มีสีฟลูออเรสเซนต์หรือสีใส (ภาพประกอบ 10) ให้ผลลบกับการทดสอบ indole ให้ผลบวกกับการทดสอบ oxidase และ catalase ให้ผลการทดสอบ O/F เป็น O^+/F^- พบว่าสามารถแยกเชื้อที่คาดว่าเป็น *Pseudomonas* sp. ได้ทั้งหมด 113 ไอโซเลท จากนั้นนำทุกไอโซเลทมาตรวจสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอสจากการย่อย skim milk บนอาหารแข็ง skim milk ซึ่งไอโซเลทที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสจะเกิดไฮนไฮรอปโคโลนีของเชื้อ (ภาพประกอบ 11) โดยพบว่า สามารถแยกเชื้อที่คาดว่าเป็น *Pseudomonas* sp. ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ทั้งหมด 78 ไอโซเลท แบ่งเป็นกลุ่มที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสในระดับมาก (+++) 14 ไอโซเลท กลุ่มที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสในระดับปานกลาง (++) จำนวน 17 ไอโซเลท และกลุ่มที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสในระดับต่ำ (+) จำนวน 47 ไอโซเลท จากนั้นเลือกกลุ่มที่ให้ผลการสร้างเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด (+++) 14 ไอโซเลท มาใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป (ตาราง 10)

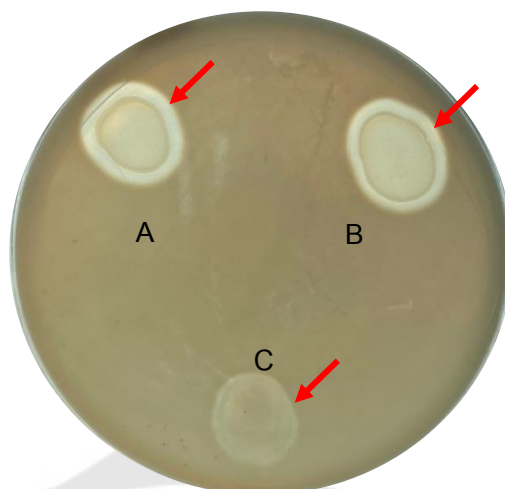


A



B

ภาพประกอบ 10 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Pseudomonas* sp.
(บนอาหาร NA (A) และอาหาร cetrimide agar (B))



ภาพประกอบ 11 ลักษณะโซนใสจากการย่อย skim milk

(ลักษณะโซนใส (ลูกศร) จากการย่อย skim milk ที่เกิดจากการสร้างเอนไซม์โปรตีนเอสบนอาหารแห้ง skim milk ของเชื้อ *P. mosselii* C24 (A), *P. mosselii* N1 (B) และ *P. fluorescens* TISTR 1887 (C))

ตาราง 10 การจำแนกเชื้อ *Pseudomonas* โดยอาศัยการทดสอบทางชีวเคมี และการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส

ไอโซเลท	แหล่งตัวอย่าง	การทดสอบทางชีวเคมี				gelatinase	catalase	oxidase	O/F	การสร้างเอนไซม์โปรติเอส
		การทดสอบแกรม	indole	Methyl red	Voges - Proskauer					
F1D1	นมดิบ	ลบ	-	-	-	+	+	+	O ⁺ /F ⁻	+++
F1D8	นมดิบ	ลบ	-	-	-	+	+	+	O ⁺ /F ⁻	+++
F4C2	นมดิบ	ลบ	-	-	-	-	+	+	O ⁺ /F ⁻	+++
F5A2	นมดิบ	ลบ	-	+	+	-	+	+	O ⁺ /F ⁻	+++
C19	นมดิบ	ลบ	-	-	-	+	+	+	O ⁺ /F ⁻	+++
C24	นมดิบ	ลบ	-	-	-	+	+	+	O ⁺ /F ⁻	+++
C93	นมดิบ	ลบ	-	-	-	+	+	+	O ⁺ /F ⁻	+++
N1	นมดิบ	ลบ	-	-	-	+	+	+	O ⁺ /F ⁻	+++
N4	นมดิบ	ลบ	-	-	-	+	+	+	O ⁺ /F ⁻	+++
PA	นมดิบ	ลบ	-	+	+	+	+	+	O ⁺ /F ⁻	+++
PF	นมดิบ	ลบ	-	-	-	-	+	+	O ⁺ /F ⁻	+++
PI01	นมดิบ	ลบ	-	-	-	+	+	+	O ⁺ /F ⁻	+++
PI02	นมดิบ	ลบ	-	-	-	+	+	+	O ⁺ /F ⁻	+++
PT01	นมดิบ	ลบ	-	+	-	-	+	+	O ⁺ /F ⁻	+++

* สัญลักษณ์ - คือ ให้ผลการทดสอบเป็นลบ และ + คือ ให้ผลการทดสอบเป็นบวก, O⁺/F⁻ คือ ให้ผลบวกในการใช้กลูโคสในสภาวะที่มีอากาศเท่านั้น (oxidative)

** สัญลักษณ์ +++ คือ เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสในอาหาร skim milk agar ในระดับมาก โดยดูจากความกว้างของบริเวณสีที่เกิดขึ้น

นอกจากนี้ได้ทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอสในเชื้อ *Pseudomonas* สายพันธุ์อ้างอิง โดยผลแสดงดังตาราง 11 ซึ่งพบว่า *P. fluorescens* TISTR 1887 สามารถสร้างเอนไซม์ในปริมาณสูง จึงใช้เชื้อนี้ในขั้นตอนการแยกเฟจต่อไป

ตาราง 11 การสร้างเอนไซม์โปรติเอสในเชื้อ *Pseudomonas* สายพันธุ์อ้างอิง

เชื้อ <i>Pseudomonas</i>	การสร้างเอนไซม์โปรติเอส*
<i>P. acidovorans</i> TISTR 356	-
<i>P. aeruginosa</i> TISTR 2370	++
<i>P. fluorescens</i> TISTR 1887	++
<i>P. fluorescens</i> TISTR 2237	++
<i>P. fluorescens</i> TISTR 358	+
<i>P. fluorescens</i> TISTR 903	-
<i>P. fluorescens</i> TISTR 904	-
<i>P. otitidis</i> TISTR 2468	+
<i>P. putida</i> TISTR 1521	++

* สัญลักษณ์แสดงความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ โดย - คือ ไม่สร้าง, + คือสร้างในระดับต่ำ, ++ คือสร้างในระดับปานกลาง และ +++ คือสร้างในระดับมาก โดยดูจากความกว้างของบริเวณใสที่เกิดขึ้น

2. การจัดจำแนกสายพันธุ์ของ *Pseudomonas* ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุด

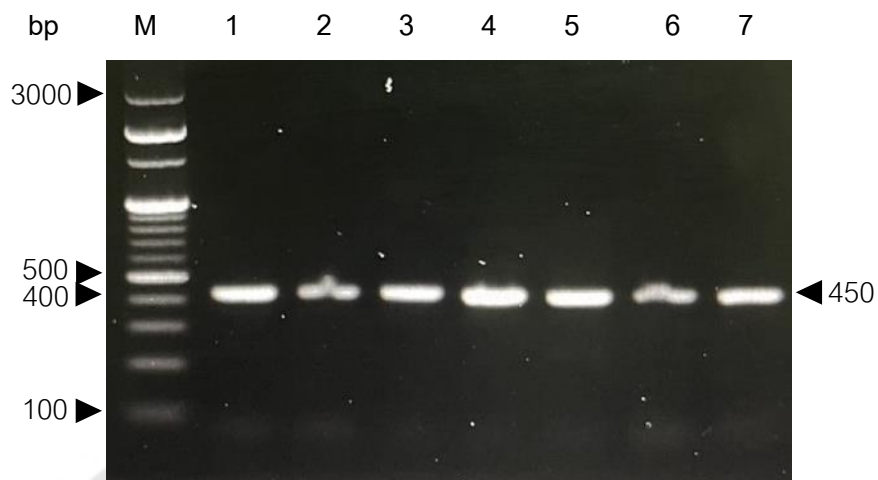
นำสายพันธุ์ของ *Pseudomonas* ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุด 14 ไอโซเลท มาจัดจำแนกในระดับสปีชีส์โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่า สามารถจัดจำแนกได้เป็น *P. mosselii* 8 สายพันธุ์, *P. fluorescens* 2 สายพันธุ์, *P. fragi* 1 สายพันธุ์, *P. taiwanensis* 1 สายพันธุ์ และ *P. aeruginosa* 1 สายพันธุ์ โดยมี 1 ไอโซเลทที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ (ตาราง 12)

ตาราง 12 การจำแนกเชื้อ *Pseudomonas* ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุด โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI

ไอโซเลท	ผลการจัดจำแนก	ผลการ BLAST	Accession number	Similarity (%)	ความยาวที่ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอ
F1D1	<i>P. mosselii</i>	<i>P. mosselii</i> strain IR7 - 11	MW686889.1	99.79	1,450/1,477
F1D8	<i>P. mosselii</i>	<i>P. mosselii</i> strain IR7 - 11	MW686889.1	99.86	1,465/1,477
F4C2	<i>P. mosselii</i>	<i>P. mosselii</i> strain R10	DQ073452.1	99.43	1,400/1,415
F5A2	<i>P. mosselii</i>	<i>P. mosselii</i>	JQ007722.1	99.93	1,410/1,424
C24	<i>P. mosselii</i>	<i>P. mosselii</i> strain yy161	MN177227.1	99.43	1,450/1,471
C19	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> strain EB276	MH127733.1	99.71	1,350/1,403
C93	<i>P. fragi</i>	<i>P. fragi</i> strain JX - 1	MT631986.1	98.11	1,390/1,440
PI01	<i>P. mosselii</i>	<i>P. mosselii</i> strain JP2 - 207	MT089928.1	97.83	1,440/1,514
PI02	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp. sw6	EF027000.1	94.26	1,280/1,317
N1	<i>P. mosselii</i>	<i>P. mosselii</i> strain JAOC4	OP164114.1	97.36	1,450/1,472
N4	<i>P. mosselii</i>	<i>P. mosselii</i> strain DSS002	OP580065.1	99.79	1,485/1,508
PT	<i>P. taiwanensis</i>	<i>P. taiwanensis</i> strain BF - S2	EU857417.1	99.36	1,400/1,417
PF	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fluorescens</i> strain xpq - 8	MK183008.1	99.00	1,410/1,462
PA	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> strain PJRS20	KJ999614.1	99.00	1,386/1,426

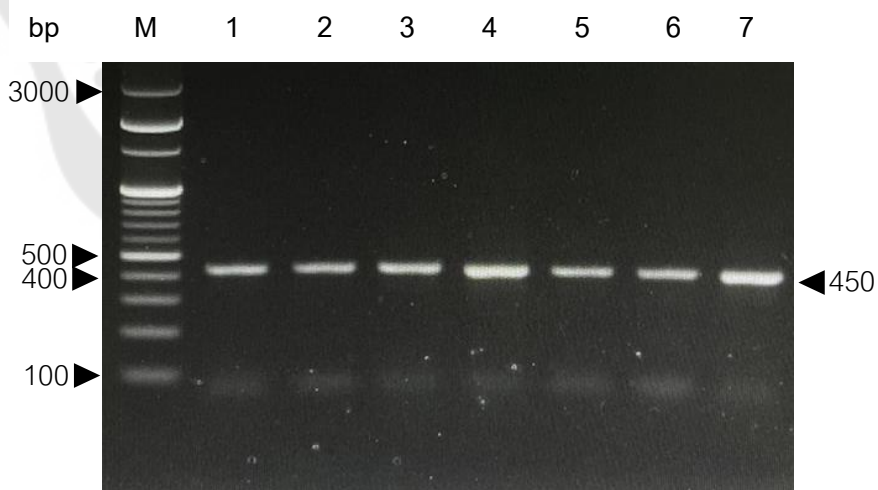
3. การตรวจสอบยีน *aprX*

นำ *Pseudomonas* ทั้ง 14 สายพันธุ์มาตรวจหายีน *aprX* เพื่อยืนยันว่าสายพันธุ์ทั้งหมดสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสกลุ่ม metalloproteinase พบว่า *Pseudomonas* ทั้ง 14 สายพันธุ์ตรวจพบยีนดังกล่าว โดยมี PCR product ขนาดเท่ากับ 450 คู่เบส (ภาพประกอบ 12 และ 13)



ภาพประกอบ 12 การตรวจสอบยีน *aprX* ที่สร้างจาก *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอส

(โดย lane M = 100 bp marker, lane 1 = *P. mosselii* C4, lane 2 = *P. fluorescens* C19, lane 3 = *P. fragi* C93, lane 4 = *P. mosselii* F1D1, lane 5 = *P. mosselii* F1D8, lane 6 = *P. mosselii* F4C2 และ lane 7 = *P. mosselii* F5A2)

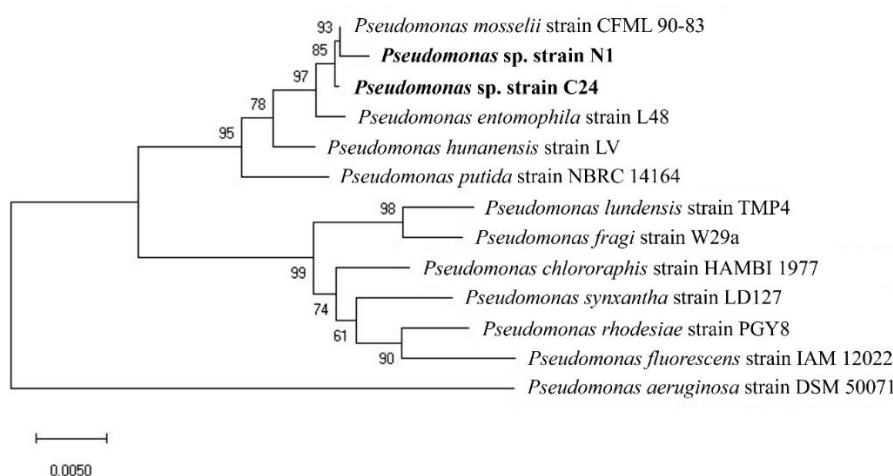


ภาพประกอบ 13 การตรวจสอบยีน *aprX* ที่สร้างจาก *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอส (ต่อ)

(โดย lane M = 100 bp marker, lane 1 = *P. mosselii* PI01, lane 2 = *Pseudomonas* sp. PI02, lane 3 = *P. mosselii* N1, lane 4 = *P. mosselii* N4, lane 5 = *P. taiwanensis* PT, lane 6 = *P. fluorescens* PF และ lane 7 = *P. aeruginosa* PA)

4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเชื้อ *Pseudomonas* ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด

นำเชื้อ *Pseudomonas* ที่มีการสร้างเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดบนอาหาร skim milk 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ C24 และ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ N1 (ภาพประกอบ 11) มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการจัดกลุ่ม โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA จากผลการวิเคราะห์พบว่า ทั้งสองสายพันธุ์มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *P. mosselii* (ภาพประกอบ 14)



ภาพประกอบ 14 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเชื้อ *Pseudomonas*

(แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเชื้อ *Pseudomonas* โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA gene วิเคราะห์โดยวิธีการ Neighbor - joining และทดสอบความเชื่อมั่นด้วยค่า bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยมี *P. aeruginosa* เป็น outgroup)

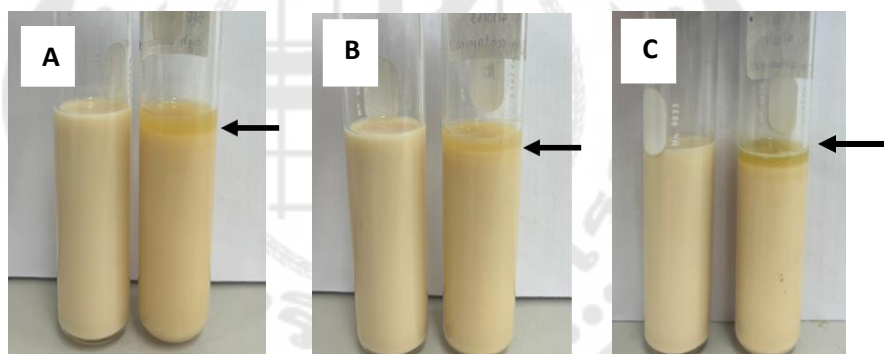
5. การตรวจสอบระดับปริมาณเชื้อ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเอสที่ส่งผลให้เกิดการตกตะกอนในนม

จากการตรวจสอบระดับปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดการตกตะกอนในนม โดยการเติมเชื้อ ลงในอาหาร skim milk พบว่า หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ปริมาณเชื้อ *P. mosselii* C24, *P. mosselii* N1 และ *P. fluorescens* TISTR 1887 จะเพิ่มขึ้นเป็น 9.48 ± 0.013 , 9.39 ± 0.064 และ 8.73 ± 0.057 log CFU/ mL และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 0.01110 ± 0.00016 , 0.0041 ± 0.00006 และ 0.0084 ± 0.00022 unit ตามลำดับ (ตาราง 13) โดยที่ปริมาณดังกล่าวสามารถทำให้เกิดการตกตะกอนในนมดังแสดงในภาพประกอบ 15

ตาราง 13 การตรวจสอบหาปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดการตกตะกอนในนม และค่ากิจกรรมของ เอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *Pseudomonas* 3 สายพันธุ์ ในอาหาร skim milk

สายพันธุ์ <i>Pseudomonas</i>	เวลา (ชั่วโมง)					
	0		16		24	
	จำนวน แบคทีเรีย (Log CFU/mL)	กิจกรรม เอนไซม์โปรตี เอส (unit)	จำนวน แบคทีเรีย (Log CFU/mL)	กิจกรรม เอนไซม์โปรตี เอส (unit)	จำนวน แบคทีเรีย (Log CFU/mL)	กิจกรรมเอนไซม์ โปรตีเอส (unit)
<i>P. mosselii</i> C24	1.77±0.268	0.00025± 0.00010	7.78±0.027	0.0038±0.00009	9.48±0.013	0.0111±0.00016
<i>P. mosselii</i> N1	1.74±0.241	0.00018± 0.00011	7.69±0.085	0.0039±0.00019	9.39±0.064	0.0041±0.00006
<i>P. fluorescens</i> TISTR 1887	1.97±0.070	0.00026±8.0789 7E - 05	5.83±0.031	0.0005±4.63131 E - 05	8.73±0.057	0.0084±0.00022

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลองสามซ้ำ

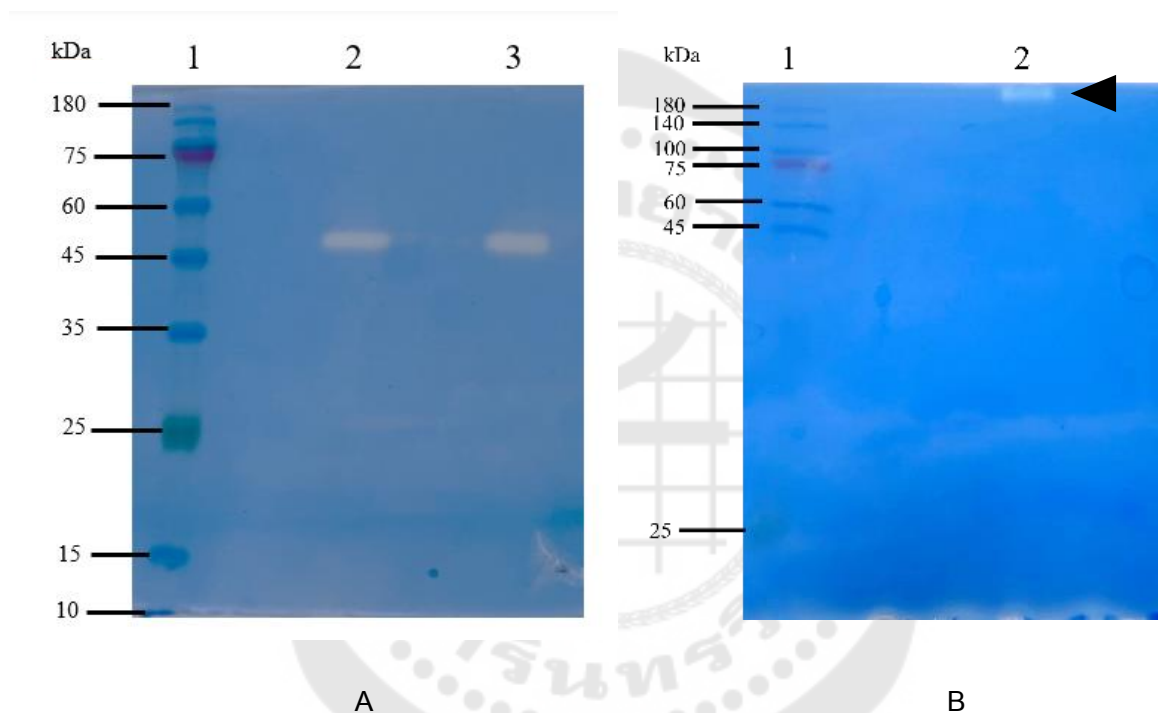


ภาพประกอบ 15 การตกตะกอนโปรตีนในอาหาร skim milk

(การตกตะกอนโปรตีนในอาหาร skim milk หลังจากการเติมเชื้อ *Pseudomonas* หลอดทางด้านซ้ายของทุกภาพแสดงหลอดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรีย หลอดทางด้านขวาของทุกภาพแสดงหลอดที่มีการเติมเชื้อ *P. mosselii* C24 (A), *P. mosselii* N1 (B) และ *P. fluorescens* TISTR 1887 (C) โดยลูกศรสีดำแสดงบริเวณที่เกิดการตกตะกอนโปรตีน)

6. การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีนด้วยวิธี zymography

การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีนที่สร้างจากเชื้อ *P. mosselii* C24, *P. mosselii* N1 และ *P. fluorescens* TISTR 1887 ด้วยวิธี zymography โดยใช้ skim milk เป็น substrate พบว่า เอนไซม์โปรตีนที่สร้างจาก *P. mosselii* C24, *P. mosselii* N1 มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 47 กิโลดาลตัน ส่วนเอนไซม์โปรตีนที่สร้างจาก *P. fluorescens* TISTR 1887 มีมวลโมเลกุลมากกว่า 180 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 16)



ภาพประกอบ 16 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีนด้วยวิธี zymography

(การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีนด้วยวิธี zymography โดย lane 1 แสดงขนาดโปรตีนมาตรฐาน, ภาพ A lane 2 และ lane 3 แสดงมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีนที่สร้างจาก *P. mosselii* C24 และ *P. mosselii* N1 ตามลำดับ, ภาพ B lane 2 แสดงมวลโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีนที่สร้างจาก *P. fluorescens* TISTR 1887 ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งของเอนไซม์โปรตีน)

7. การคัดแยกเฟจ

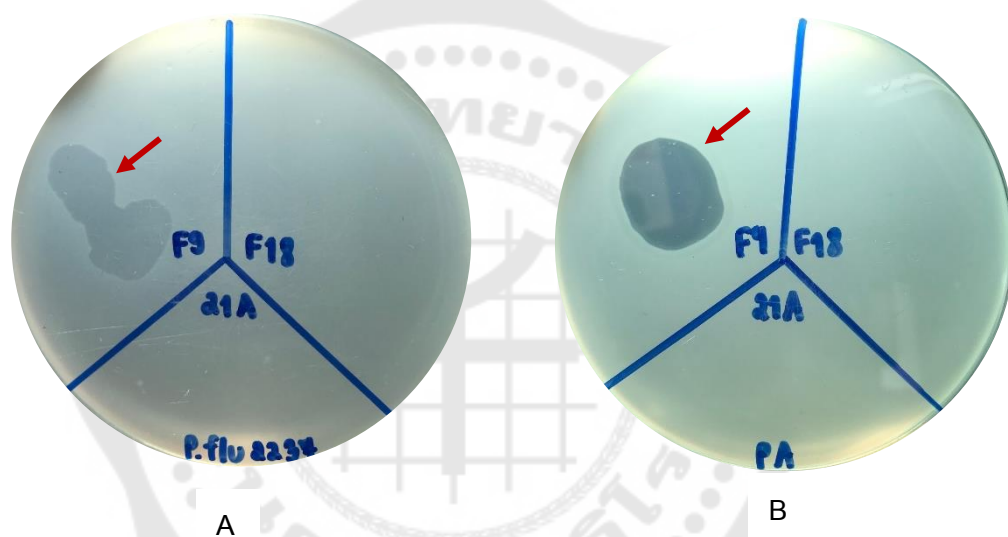
การคัดแยกเฟจที่มีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. จากตัวอย่างน้ำคลองแสนแสบ โดยใช้ *Pseudomonas* ที่แยกได้จากตาราง 10 เป็นโฮสต์ พบว่า สามารถแยกเฟจที่มีลักษณะพลาคไส ซึ่งแสดงถึงความเป็นไลติกเฟจ ได้ทั้งหมด 23 ตัว จากโฮสต์ 9 สายพันธุ์ (ตาราง 14) เฟจทุกตัวที่แยกได้จะถูกนำไปตรวจสอบความสามารถของเฟจในการติดเชื้อในขั้นตอนต่อไป

ตาราง 14 การคัดแยกแบคทีเรียโฮเฟจจากตัวอย่างน้ำคลองแสนแสบ

ลำดับ	ลักษณะพลาค	แบคทีเรียโฮเฟจ	โฮสต์ที่ใช้คัดแยก
1	พลาคไส	ΦPA	<i>P. aeruginosa</i> PA
2	พลาคไส	ΦPAa	<i>P. aeruginosa</i> PA
3	พลาคไส	ΦPAb	<i>P. aeruginosa</i> PA
4	พลาคไส	ΦPF	<i>P. fluorescens</i> PF
5	พลาคไส	ΦTa	<i>P. aeruginosa</i> PA
6	พลาคไส	ΦTb	<i>P. aeruginosa</i> PA
7	พลาคไส	ΦP2	<i>P. fluorescens</i> PF
8	พลาคไส	ΦaaA	<i>P. fluorescens</i> PF
9	พลาคไส	ΦaaB	<i>P. fluorescens</i> PF
10	พลาคไส	ΦPR	<i>P. fluorescens</i> PF
11	พลาคไส	ΦF9	<i>P. fluorescens</i> PF
12	พลาคไส	ΦF18	<i>P. fluorescens</i> PF
13	พลาคไส	ΦTIS1	<i>P. fluorescens</i> TISTR 1887
14	พลาคไส	Φ17	<i>P. mosselii</i> N4
15	พลาคไส	Φ19	<i>P. mosselii</i> N4
16	พลาคไส	Φ21A	<i>P. mosselii</i> N1
17	พลาคไส	Φ21B	<i>P. mosselii</i> N1
18	พลาคไส	Φ21C	<i>P. mosselii</i> N1
19	พลาคไส	Φ22	<i>P. taiwanensis</i> PT
20	พลาคไส	Φ24	<i>P. mosselii</i> PI01
21	พลาคไส	Φ25	<i>Pseudomonas</i> sp. PI02
22	พลาคไส	Φ27	<i>Pseudomonas</i> sp. PI02
23	พลาคไส	ΦC106	<i>P. mosselii</i> C24

8. การตรวจสอบความสามารถของเฟจในการติดเชื้กับเชื้อสายพันธุ์ต่าง ๆ

จากการทดสอบความสามารถของเฟจทั้ง 23 ตัว ในการติดเชื้กับ *Pseudomonas* ที่คัดแยกได้ 14 สายพันธุ์ และสายพันธุ์อ้างอิง 9 สายพันธุ์ (ตาราง 16) พบว่าเฟจ Φ C106 และ Φ 21A มีความสามารถในการติดเชื้ *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่าง ๆ ได้มากที่สุด โดยสามารถเข้าติดเชื้ได้ 8 สายพันธุ์ รองลงมาคือ เฟจ Φ TIS1 มีความสามารถในการติดเชื้ *Pseudomonas* ได้ 4 สายพันธุ์ โดยเฟจอื่นอีก 20 ตัว มีสามารถในการติดเชื้ *Pseudomonas* ได้อย่างน้อย 1 สายพันธุ์ แต่ไม่เกิน 3 สายพันธุ์ ดังนั้นเฟจทั้งสามตัว คือ Φ C106, Φ 21A และ Φ TIS1 จึงถูกคัดเลือกไปศึกษาในขั้นต่อนต่อไป



ภาพประกอบ 17 ตัวอย่างลักษณะพลาคว

(โซนยับยั้ง *Pseudomonas* โดยเฟจ (ลูกศร) ที่เกิดจากการทำลายเซลล์ *Pseudomonas* ได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดพลาควุ่น (A) และที่ทำลายเซลล์ *Pseudomonas* ได้สมบูรณ์ ทำให้เกิดพลาควใส (B))

ตาราง 15 ความสามารถของเฟจในการติดเชื้อ *Pseudomonas* สายพันธุ์ต่าง ๆ

		สายพันธุ์ของแบคทีเรีย												
	<i>P. aeruginosa</i> PA	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	<i>P. fluorescens</i> PF	+	-	-	+	0	0	-	-	-	-	-	+	+
	<i>P. taiwanensis</i> PT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. mosselii</i> N4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. mosselii</i> N1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	<i>Pseudomonas</i> sp. PI02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. mosselii</i> PI01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. fragi</i> C93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	<i>P. fluorescens</i> C19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. mosselii</i> C24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. mosselii</i> F5A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. mosselii</i> F4C2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. mosselii</i> F1D8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. mosselii</i> F1D1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. putida</i> TISTR 1521	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. otitidis</i> TISTR 2468	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. acidovorans</i> TISTR 356	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. fluorescens</i> TISTR 904	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. fluorescens</i> TISTR 903	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. fluorescens</i> TISTR1887	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	<i>P. fluorescens</i> TISTR 2237	0	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
	<i>P. fluorescens</i> TISTR 358	-	-	-	+	0	0	-	-	-	-	-	-	-
	<i>P. aeruginosa</i> TIST 2370	0	0	0	-	+	0	+	0	-	-	-	-	+
สายพันธุ์ของเฟจ	ΦPA	0	0	0	-	+	0	+	0	-	-	-	-	+
	ΦPAa	0	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ΦPAb	0	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ΦPF	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ΦTa	+	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ΦTb	+	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ΦP2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	ΦaaA	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	ΦaaB	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	ΦPR	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	ΦTIS1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

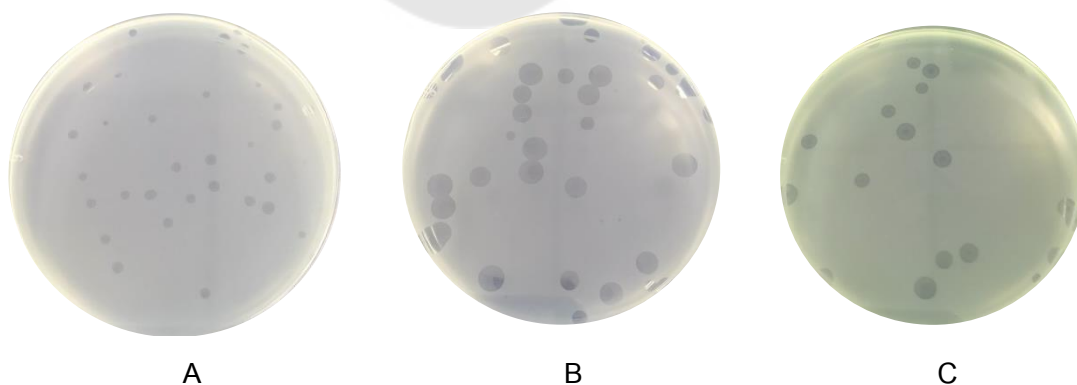
- คือ ไม่เกิดพลาค, 0 คือ เกิดพลาคขุ่น และ + คือ เกิดพลาคใส

9. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟจ

นำเฟจ Φ C106, Φ 21A และ Φ TIS1 ที่คัดเลือกได้มาตรวจสอบลักษณะ พลาศ พบว่าเฟจทั้ง 3 ตัว มีขนาดและลักษณะพลาศที่แตกต่างกัน (ตาราง 15, ภาพประกอบ 18) เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า เฟจ Φ C106 และ Φ 21A มีส่วนหัวเป็นรูปร่างเหลี่ยมแบบสมมาตร (icosahedral symmetry) ขนาด 51.67 ± 1.67 และ 48.57 ± 2.86 นาโนเมตร และมีหางสั้น โดยมีความยาวเท่ากับ 12.78 ± 2.22 และ 11.42 ± 0.57 นาโนเมตร ตามลำดับ จากรูปร่างของเฟจดังกล่าว สามารถจัดจำแนกเฟจอยู่ในแฟมิลี *Podoviridae* ในขณะที่เฟจ Φ TIS1 มีส่วนหัวเป็นรูปร่างเหลี่ยมแบบสมมาตรขนาด 69.24 ± 0.34 นาโนเมตร ส่วนหางยาว โดยมีความยาวเท่ากับ 122.20 ± 0.48 นาโนเมตร และมีซีทเป็นส่วนประกอบ จากรูปร่างของเฟจดังกล่าว สามารถจัดจำแนกเฟจอยู่ในแฟมิลี *Myoviridae* (ภาพประกอบ 19)

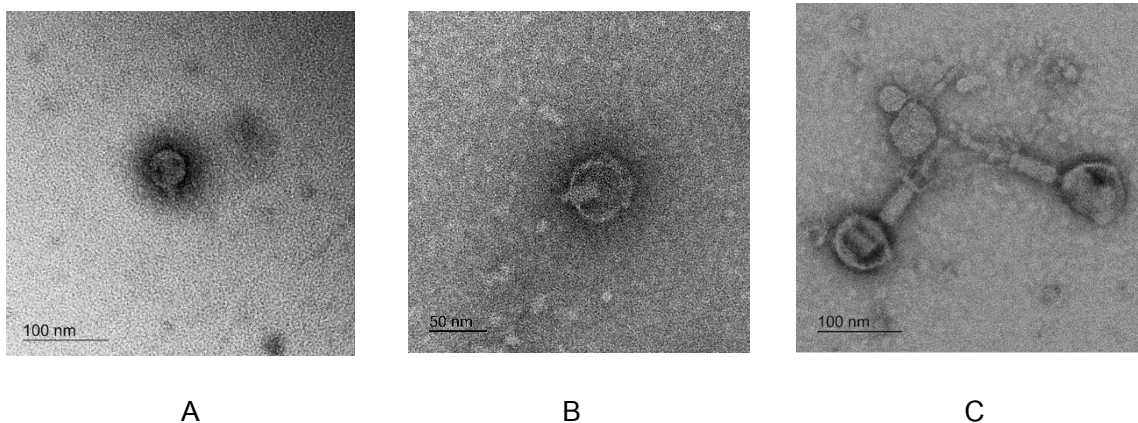
ตาราง 16 ขนาดของพลาศและขนาดของเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

เฟจ	ความยาว (นาโนเมตร)		ขนาดพลาศ (เซนติเมตร)
	เส้นผ่านศูนย์กลาง	หาง	
Φ C106	51.67 ± 1.67	12.78 ± 2.22	0.25 ± 0.053
Φ 21A	48.57 ± 2.86	11.42 ± 0.57	0.54 ± 0.093
Φ TIS1	69.24 ± 0.34	122.20 ± 0.48	0.47 ± 0.082



ภาพประกอบ 18 ลักษณะพลาศของเฟจ

(ลักษณะพลาศของเฟจ Φ C106 (A), Φ 21A (B) และ Φ TIS1 บนอาหาร NA)



ภาพประกอบ 19 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟจ

(ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟจ Φ C106 (A), Φ 21A (B) และ Φ TIS1 (C) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน โดย bar มีขนาดเท่ากับ 100 นาโนเมตร)

10. การหาอัตราส่วนของเฟจต่อโฮสต์ที่เหมาะสมในการติดเชื้อ

การหาอัตราส่วนของเฟจต่อโฮสต์ที่เหมาะสมในการติดเชื้อ หรือค่า MOI จะศึกษาในเฟจ Φ C106, Φ 21A และ Φ TIS1 โดยใช้โฮสต์เป็น *P. mosselii* C24, *P. mosselii* N1 และ *P. fluorescens* TISTR 1887 ตามลำดับ ซึ่งค่า MOI ที่เหมาะสมสามารถดูได้จากค่า MOI ที่เฟจสามารถเพิ่มจำนวนได้มากที่สุด ผลการทดลองพบว่า เฟจ Φ C106 และ Φ 21A มีค่า MOI ที่เหมาะสมเท่ากับ 10 ในขณะที่เฟจ Φ TIS1 มีค่า MOI ที่เหมาะสมเท่ากับ 100 (ตาราง 17)

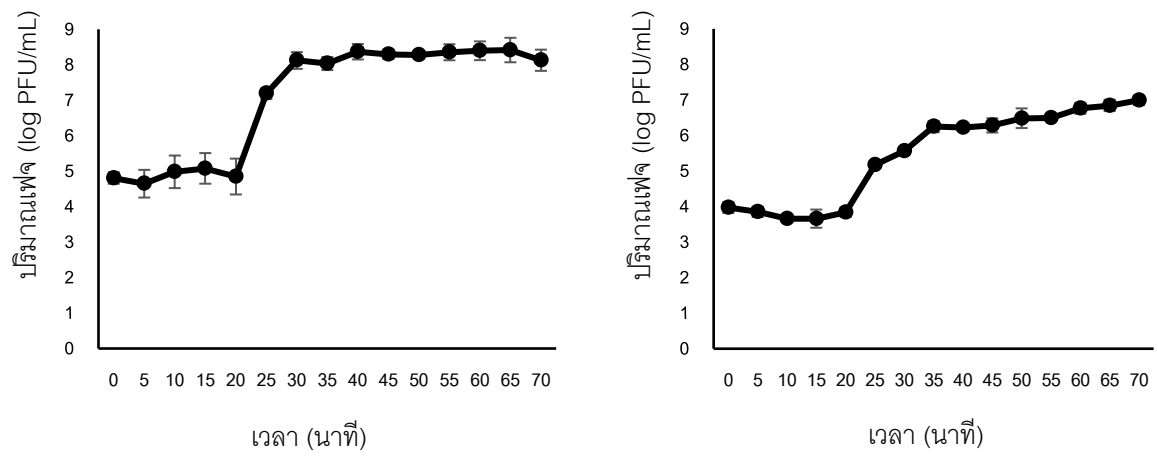
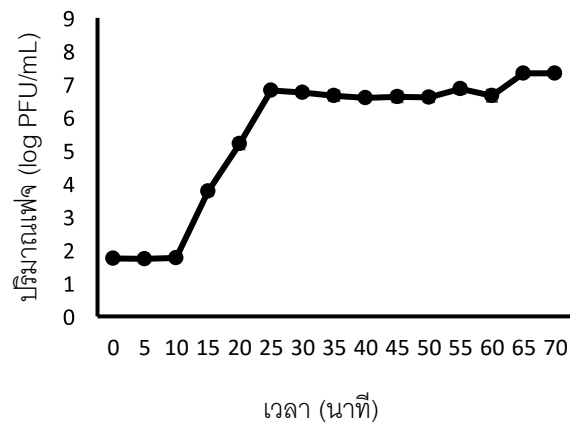
ตาราง 17 แสดงอัตราส่วนของเฟจต่อโฮสต์ที่เหมาะสมในการติดเชื้อ

ปริมาณแบคทีเรีย (log CFU/mL)	ปริมาณเฟจ (log PFU/mL)	MOI	ปริมาณเฟจหลังจากบ่มร่วมกับโฮสต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (log PFU/mL)		
			ΦC106	Φ21A	ΦTIS1
8	10	100	8.33±0.33 ^{abA}	8.06 ± 0.36 ^{bB}	8.68±0.23 ^{aA}
9	10	10	8.44±0.12 ^{bA}	9.86 ± 0.37 ^{aA}	8.60±0.06 ^{bA}
10	10	1	8.16±0.04 ^{aA}	7.95 ± 0.02 ^{bB}	7.30±0.28 ^{cB}
10	9	0.1	8.20±0.10 ^{aA}	7.17 ± 0.21 ^{bC}	6.17±0.10 ^{cC}
10	8	0.01	7.71±0.24 ^{aB}	6.70 ± 0.12 ^{bD}	6.65±0.66 ^{bBC}
10	7	0.001	7.22±0.08 ^{aC}	5.70 ± 0.06 ^{bE}	5.69±0.14 ^{bD}

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่แสดงความแตกต่างของผลการทดลองที่ค่า MOI ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบเฟจในตัวเดียวกัน (แนวคอลัมน์) ส่วนตัวอักษรพิมพ์เล็กแสดงความแตกต่างของผลการทดลองในเฟจแต่ละตัวที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า MOI เดียวกัน (แนวแถว) การทดสอบทางสถิติจะใช้ Tukey's test ที่ค่า $p \leq 0.05$

11. การศึกษากราฟการเจริญของเฟจ

การศึกษากราฟการเจริญของเฟจ ΦC106, Φ21A และ ΦTIS1 โดยใช้โฮสต์เป็น *P. mosselii* C24, *P. mosselii* N1 และ *P. fluorescens* TISTR 1887 พบว่า เฟจ ΦC106 และ Φ21A มี latent period เท่ากับ 20 นาที มี rise period เท่ากับ 10 และ 15 นาที และมี burst size เท่ากับ 1,862 และ 331 PFU/infected cell ตามลำดับ ในขณะที่เฟจ ΦTIS1 มี latent period เท่ากับ 10 นาที มี rise period เท่ากับ 15 นาที และมี burst size เท่ากับ 7,000 PFU/infected cell (ภาพประกอบ 20)

 Φ C106 Φ 21A Φ TIS1

ภาพประกอบ 20 กราฟการเจริญของเฟจ

(กราฟการเจริญของเฟจ Φ C106, Φ 21A และ Φ TIS1 โดยแต่ละช่วงเวลาแสดงค่าเฉลี่ย \pm SD ที่ได้มาจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ)

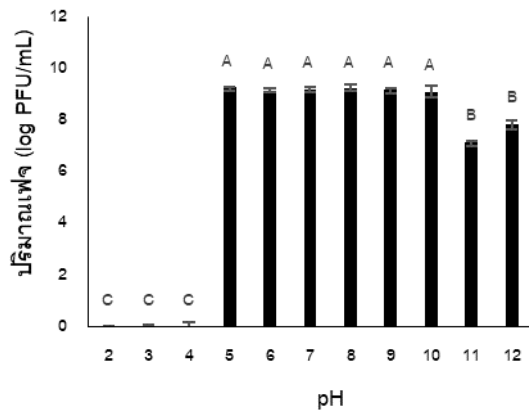
12. การศึกษาความเสถียรของเฟจ

12.1 การศึกษาความเสถียรต่อ pH ของเฟจ

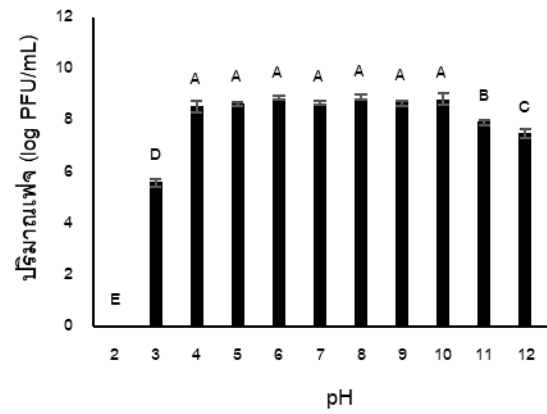
จากการศึกษาค่าความเสถียรของเฟจต่อ pH พบว่าเฟจ Φ C106 มีความเสถียรต่อ pH ในช่วง 5 - 10 และมีปริมาณเฟจลดลง 1 - 2 log PFU/mL ที่ pH 11 และ 12 แต่จะถูกยับยั้งโดยสมบูนที่ค่า pH ในช่วง 2 - 4 ในขณะที่เฟจ Φ 21A มีความเสถียรต่อค่า pH ในช่วง 4 - 10 และมีปริมาณลดลงเล็กน้อยที่ค่า pH 11 และ 12 และมีปริมาณเฟจลดลง 3 log PFU/mL ที่ค่า pH 3 แต่จะถูกยับยั้งโดยสมบูนที่ค่า pH 2 ส่วนเฟจ Φ TIS1 มีความเสถียรต่อค่า pH ในช่วง 4 - 12 และมีปริมาณลดลงเล็กน้อยที่ค่า pH 3 โดยยังสามารถวัดปริมาณเฟจได้ 6 log PFU/mL แต่จะถูกยับยั้งโดยสมบูนที่ pH 2 (ภาพประกอบ 21)

12.2 การศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิของเฟจ

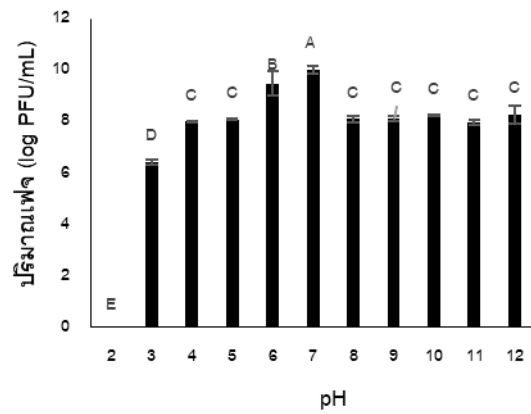
การศึกษาค่าความเสถียรต่ออุณหภูมิของเฟจ Φ C106, Φ 21A และ Φ TIS1 ทำการศึกษาในอาหาร NB และ skim milk พบว่า เฟจ Φ C106 จะมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4 - 45 องศาเซลเซียส แต่จะลดลงจนไม่สามารถวัดปริมาณได้ที่อุณหภูมิ 65, 75 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ ในอาหาร NB ส่วนในอาหาร skim milk เป็นเช่นเดียวกันกับในอาหาร NB ยกเว้นที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ที่ยังสามารถวัดปริมาณเฟจได้เล็กน้อยที่ 1 - 2 log PFU/mL ในส่วนของเฟจ Φ 21A และ Φ TIS1 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4 - 45 องศาเซลเซียส และมีปริมาณลดลง 4 - 5 log PFU/mL ที่อุณหภูมิ 65, 75 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ ทั้งนี้เฟจทั้ง 3 ตัว จะถูกยับยั้งโดยสมบูนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ทั้งในอาหาร NB และ skim milk (ภาพประกอบ 22 และ 23)



ΦC106



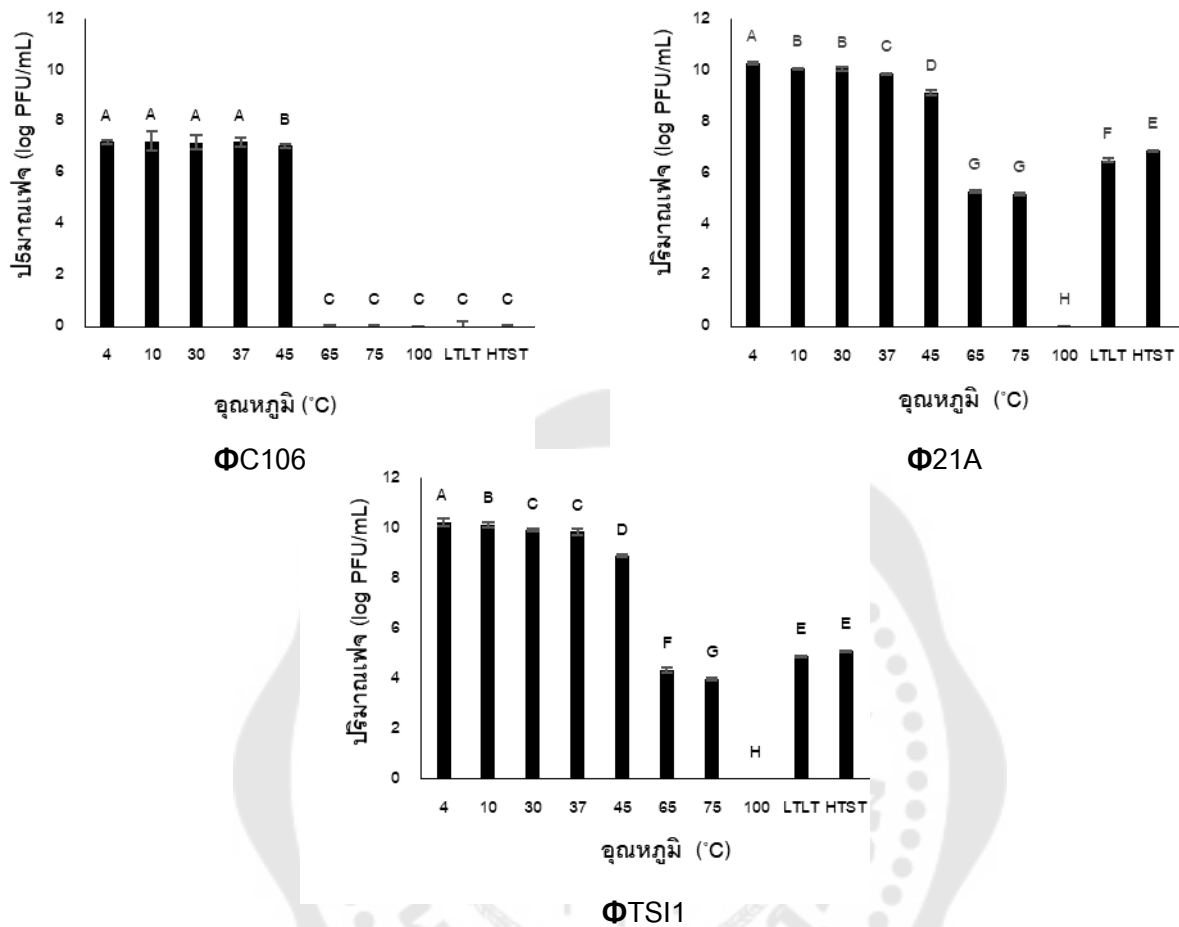
Φ21A



ΦTIS1

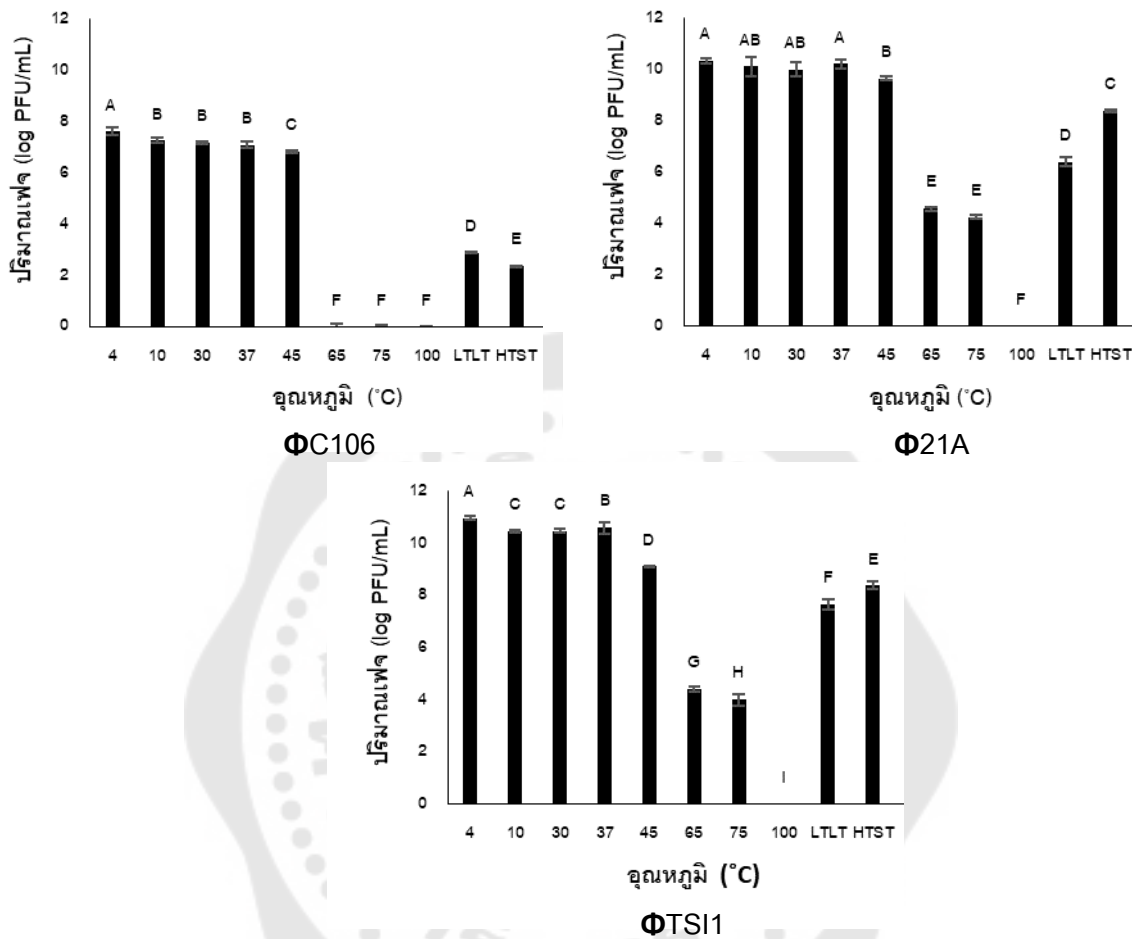
ภาพประกอบ 21 ความเสถียรต่อค่า pH ของเฟจ

(ความเสถียรต่อค่า pH ของเฟจ ΦC106, Φ21A และ ΦTIS1 ในอาหาร NB โดยแต่ละค่า pH แสดงในรูปค่าเฉลี่ย \pm SD ที่ได้มาจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ตัวอักษรที่ต่างกันบนกราฟ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$))



ภาพประกอบ 22 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเฟจในอาหาร NB

(ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเฟจ ΦC106, Φ21A และ ΦTIS1 ในอาหาร NB ที่มีการบ่มในอุณหภูมิ 4–100 องศาเซลเซียส นาน 1.5 ชั่วโมง และอุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ได้แก่ 63 องศาเซลเซียส 30 นาที (LTLT) และ 72 องศาเซลเซียส 15 วินาที (HTST) โดยแต่ละอุณหภูมิแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± SD ที่ได้มาจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ตัวอักษรที่ต่างกันบนกราฟแท่งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$))



ภาพประกอบ 23 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเฟจในอาหาร skim milk

(ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเฟจ ΦC106, Φ21A และ ΦTSI1 ในอาหาร skim milk ที่มีการบ่มในอุณหภูมิ 4–100 องศาเซลเซียส นาน 1.5 ชั่วโมง และอุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ ได้แก่ 63 องศาเซลเซียส 30 นาที (LTLT) และ 72 องศาเซลเซียส 15 วินาที (HTST) โดยแต่ละอุณหภูมิแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± SD ที่ได้มาจากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ตัวอักษรที่แตกต่างกันบนกราฟแท่งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$))

13. การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* ในระดับห้องปฏิบัติการ และการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

การยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้เฟจในระดับห้องปฏิบัติการ จะทดสอบในเชื้อ *P. mosselii* C24 โดยใช้เฟจ Φ C106 และ Φ 21A แบบเฟจเดี่ยวหรือเฟจผสม ดังนี้

รูปแบบเฟจเดี่ยว

ผลการยับยั้งเชื้อ *P. mosselii* C24 ด้วยเฟจ Φ C106 ที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อในปริมาณต่ำ (ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 4 log CFU/mL) พบว่า เฟจ Φ C106 สามารถลดปริมาณเชื้อได้มากที่สุดเท่ากับ 2.59 ± 0.11 และ 2.41 ± 0.06 log CFU/mL เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่เติมเฟจ หลังจากการบ่มเป็นเวลา 8 และ 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหาร NB และ skim milk ตามลำดับ โดยการลดลงของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส มีการลดลงสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.00882 ± 0.00138 unit และ 0.01539 ± 0.00182 unit ในอาหาร NB และ skim milk ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (ตาราง 18, ภาพประกอบ 24)

สำหรับการปนเปื้อนเชื้อในปริมาณสูง (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL) พบว่า เฟจ Φ C106 สามารถลดปริมาณเชื้อได้มากที่สุดเท่ากับ 4.55 ± 0.11 log CFU/mL เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่เติมเฟจ หลังจากการบ่มเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ในอาหาร NB ในขณะที่ในอาหาร skim milk ปริมาณเชื้อลดลงมากที่สุดเท่ากับ 3.24 ± 0.31 log CFU/mL หลังจากการบ่ม 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามการลดลงของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดยังคงพบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.00841 ± 0.00031 unit และ 0.01298 ± 0.00005 unit ในอาหาร NB และ skim milk ตามลำดับ (ตาราง 18, ภาพประกอบ 24)

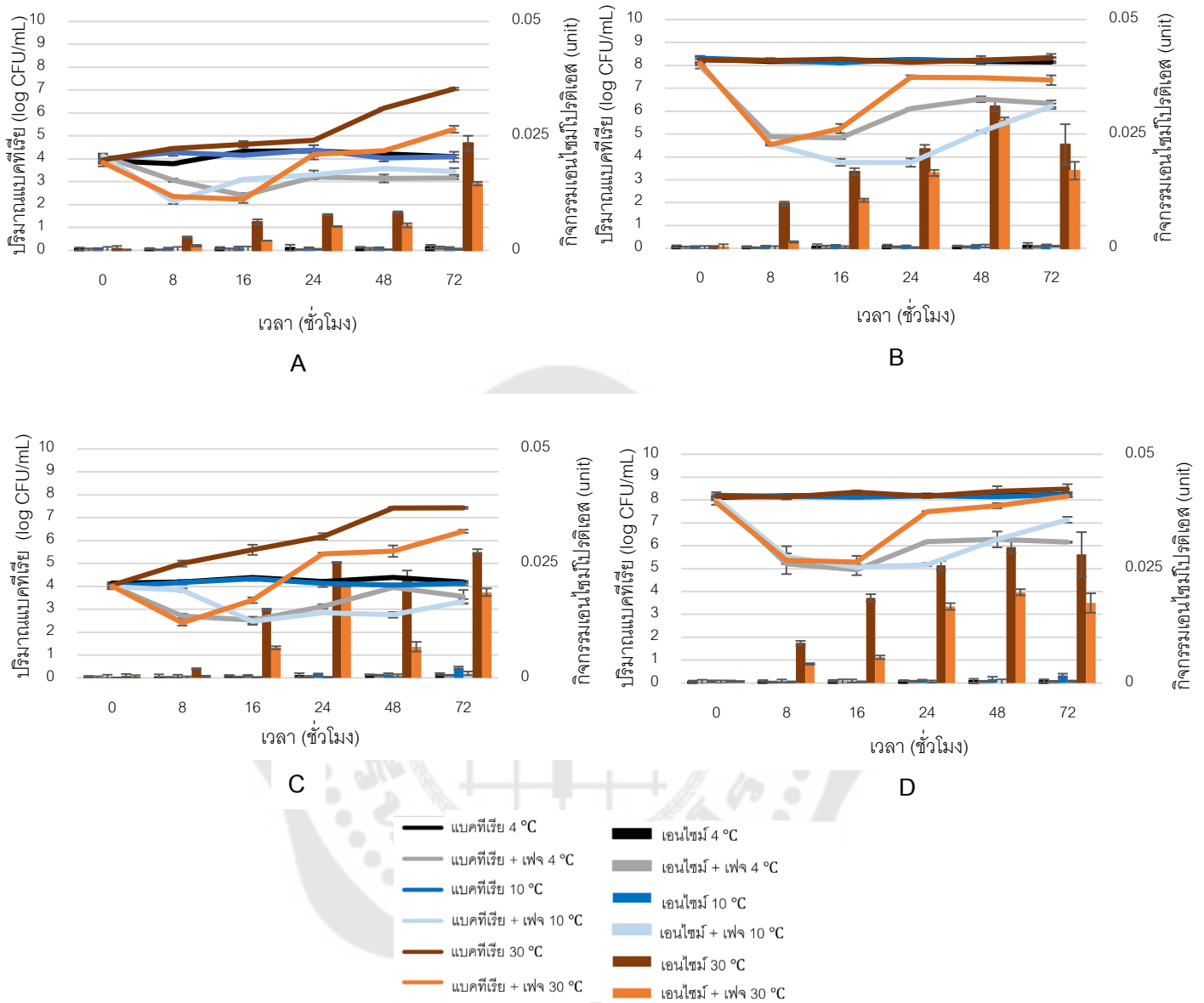
ผลการยับยั้งเชื้อ *P. mosselii* C24 ด้วยเฟจ Φ 21A ที่ระดับการปนเปื้อนเชื้อปริมาณต่ำ สามารถลดปริมาณเชื้อได้มากที่สุดเท่ากับ 2.70 ± 0.19 และ 2.78 ± 0.10 log CFU/mL เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่เติมเฟจ หลังจากการบ่มเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหาร NB และ skim milk ตามลำดับ โดยมีการลดลงของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 0.01247 ± 0.00020 และ 0.01008 ± 0.00060 unit หลังจากการบ่มเป็นเวลา 16 และ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหาร NB และ skim milk ตามลำดับ (ตาราง 19, ภาพประกอบ 25)

สำหรับการปนเปื้อนเชื้อในปริมาณสูง พบว่า เฟจ Φ 21A สามารถลดจำนวนเชื้อได้มากที่สุดเท่ากับ 4.05 ± 0.13 และ 4.92 ± 0.18 log CFU/mL เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่เติมเฟจ หลังจากการบ่มเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีการลดลงของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 0.01287 ± 0.00056 และ 0.01060 ± 0.00049 unit หลังจากการบ่มเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในอาหาร NB และ skim milk ตามลำดับ (ตาราง 19, ภาพประกอบ 25)

รูปแบบเฟจผสม

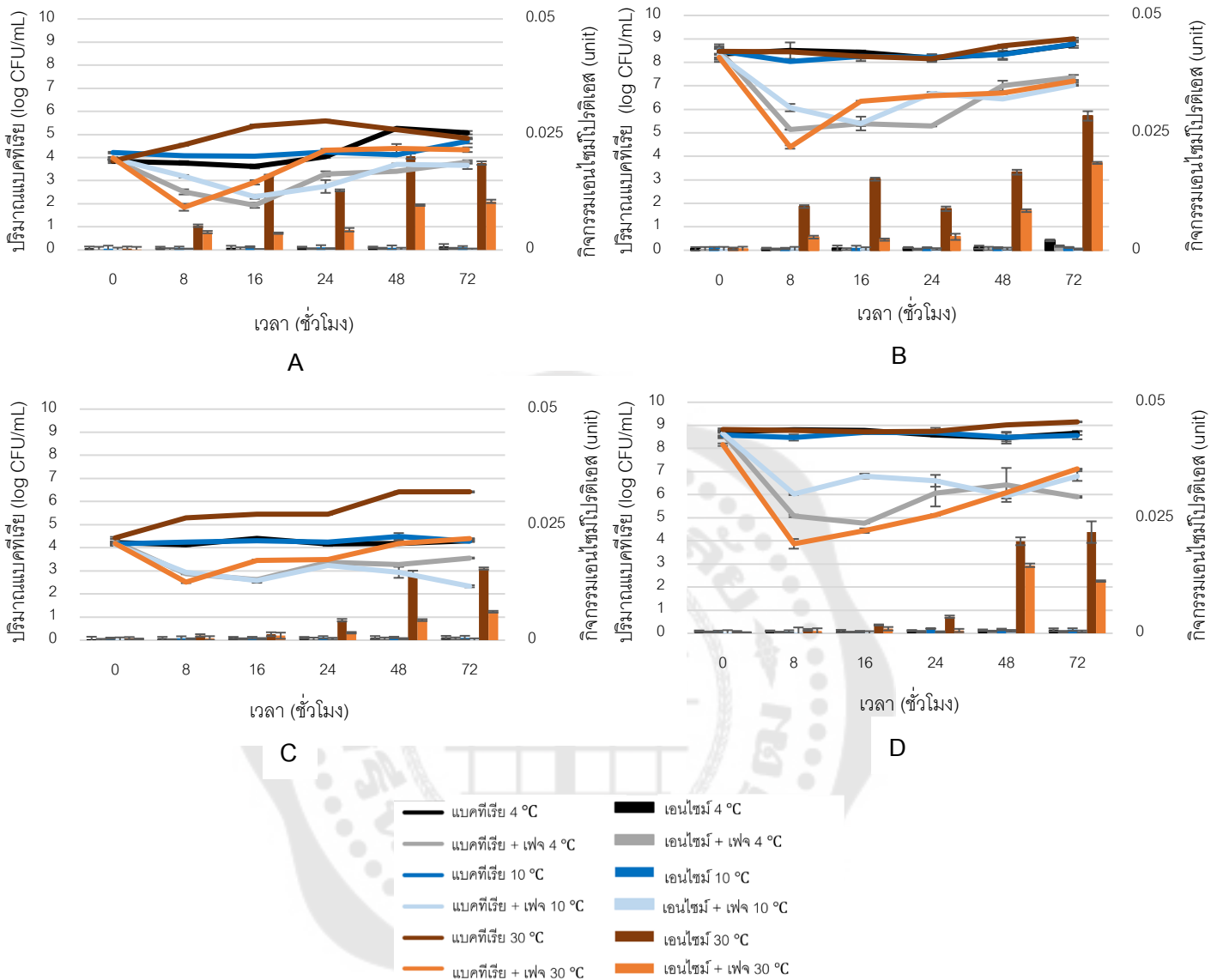
ผลการยับยั้งเชื้อ *P. mosselii* C24 เมื่อมีการใช้เฟจในรูปแบบผสมระหว่าง เฟจ Φ C106 และ Φ 21A ในการทดลองที่มีการปนเปื้อนเชื้อปริมาณต่ำ พบว่าจำนวนเชื้อและกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสลดลงมากที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยสามารถลดปริมาณเชื้อได้มากที่สุดเท่ากับ 3.15 ± 0.20 log CFU/mL เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่เติมเฟจ หลังจากการบ่มเป็นเวลา 8 ชั่วโมง และ 2.97 ± 0.13 log CFU/mL หลังจากการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และมีการลดลงของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 0.00992 ± 0.00073 และ 0.00814 ± 0.00147 หลังจากการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในอาหาร NB และ skim milk ตามลำดับ (ตาราง 20, ภาพประกอบ 26)

สำหรับการปนเปื้อนเชื้อในปริมาณสูง พบว่าเมื่อใช้เฟจในรูปแบบผสม สามารถลดจำนวนเชื้อได้มากที่สุดเท่ากับ 3.38 ± 0.13 และ 5.92 ± 0.16 log CFU/mL ในอาหาร NB และอาหาร skim milk ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่เติมเฟจ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากการบ่มเป็นเวลา 8 ชั่วโมง และมีการลดลงของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 0.01024 ± 0.00032 unit หลังจากการบ่มเป็นเวลา 16 ชั่วโมง และ 0.01255 ± 0.00145 unit หลังจากการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในอาหาร NB และ skim milk ตามลำดับ (ตาราง 20, ภาพประกอบ 26)



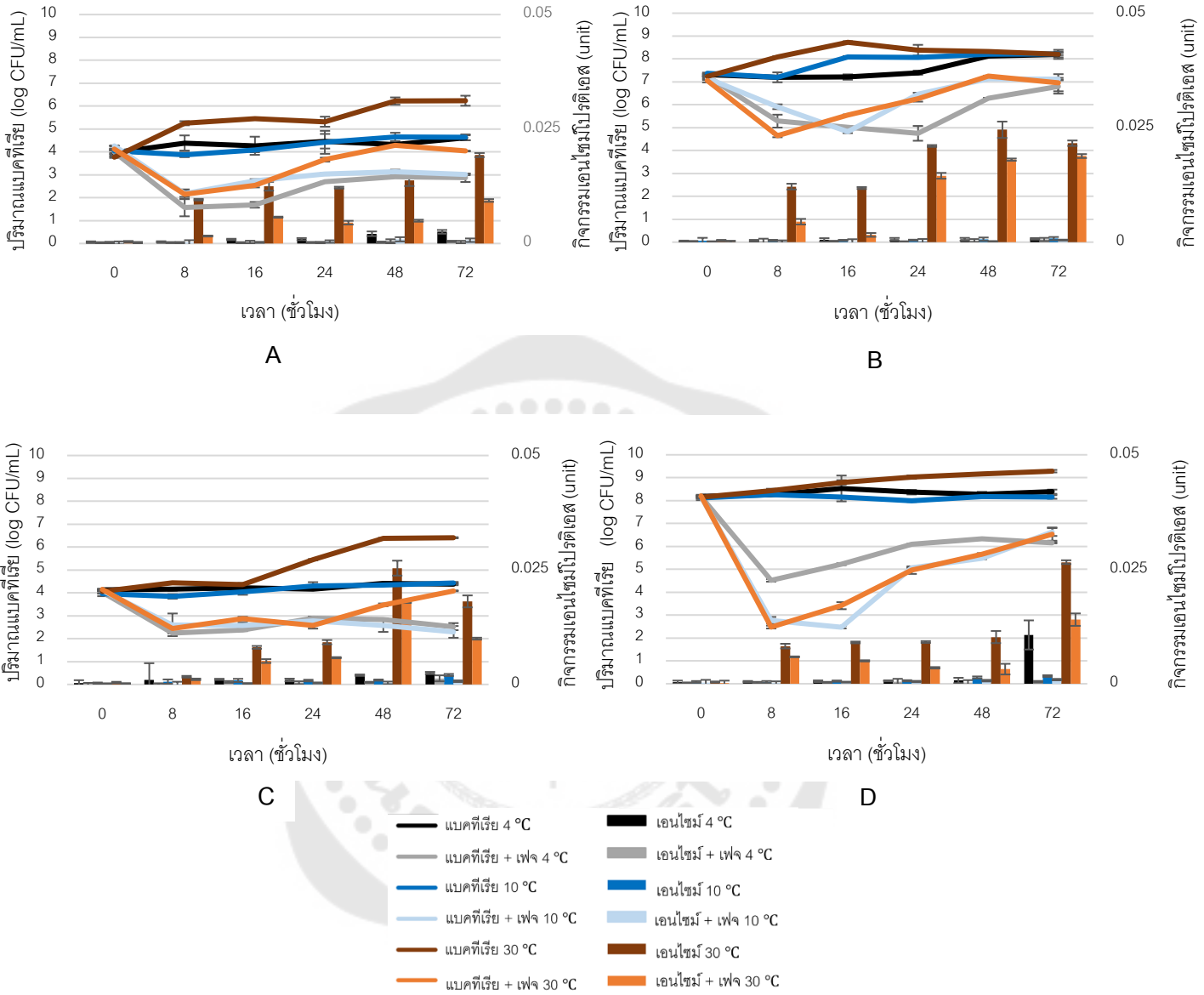
ภาพประกอบ 24 กราฟการลดลงของเชื้อ *P. mosselii* C24 และกิจกรรมของเอนไซม์ไลโปติเอส เมื่อมีการใช้เฟจ Φ C106 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้เฟจ

(การลดลงของเชื้อ *P. mosselii* C24 และกิจกรรมของเอนไซม์ไลโปติเอส เมื่อมีการใช้เฟจ Φ C106 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้เฟจ ในอาหาร NB (A, B) และอาหาร skim milk (C, D) ที่ระดับการปนเปื้อนต่ำ (A, C) และระดับการปนเปื้อนสูง (B, D))



ภาพประกอบ 25 กราฟการลดลงของเชื้อ *P. mosselii* C24 และกิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไมโปรตีนเมื่อมีการใช้เฟจ Φ21A เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้เฟจ

(การลดลงของเชื้อ *P. mosselii* C24 และกิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไมโปรตีน เมื่อมีการใช้เฟจ Φ21A เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้เฟจในอาหาร NB (A, B) และอาหาร skim milk (C, D) ที่ระดับการปนเปื้อนต่ำ (A, C) และระดับการปนเปื้อนสูง (B, D))



ภาพประกอบ 26 การลดลงของเชื้อ *P. mosselii* C24 และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เมื่อมีการใช้เฟจผสม เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้เฟจผสม

(การลดลงของเชื้อ *P. mosselii* C24 และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เมื่อมีการใช้เฟจผสม เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้เฟจผสมในอาหาร NB (A, B) และอาหาร skim milk (C, D) ที่ระดับการปนเปื้อนต่ำ (A, C) และระดับการปนเปื้อนสูง (B, D))

ตาราง 18 การลดลงของเชื้อ *P. mossaesii* C24 และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เมื่อมีการใช้ฟาจ DC106 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้ฟาจ
ระดับการปนเปื้อนเชื้อปริมาณสูง

อาหาร เวลา (ชม.)	4 °C				10 °C				30 °C				4 °C				10 °C				30 °C			
	จำนวน แบคทีเรีย ที่ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลด ลง (unit)	จำนวน แบคทีเรีย (log CFU/mL)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลด ลง (unit)	จำนวน แบคทีเรียที่ ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลด ลง (unit)	จำนวน แบคทีเรียที่ ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลด ลง (unit)	จำนวน แบคทีเรียที่ ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลด ลง (unit)	จำนวน แบคทีเรียที่ ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลด ลง (unit)	จำนวน แบคทีเรียที่ ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลด ลง (unit)	จำนวน แบคทีเรียที่ ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลด ลง (unit)	จำนวน แบคทีเรียที่ ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลด ลง (unit)	จำนวน แบคทีเรียที่ ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลด ลง (unit)	จำนวน แบคทีเรียที่ ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลด ลง (unit)		
NB	0	-0.20±0.09 ^c	0.0021±0.00007 ^a	0.00012±0.00002 ^a	0.11±0.32 ^{cd}	0.00030±0.00006 ^{cd}	0.29±0.21 ^{cd}	0.00032±0.00022 ^{ab}	0.24±0.04 ^{de}	0.00013±0.00006 ^{ab}	0.14±0.22 ^{bd}	0.00017±0.00006 ^{cd}	0	0.72±0.14 ^{bb}	0.00026±0.00009 ^a	0.00019±0.00007 ^a	2.11±0.06 ^{ab}	0.000187±0.00016 ^{cd}	3.28±0.14 ^{ab}	0.00023±0.00006 ^a	3.75±0.07 ^{bb}	0.00030±0.00010 ^a	3.67±0.11 ^{ab}	0.000841±0.00031 ^{ab}
	8	1.92±0.21 ^{ab}	0.0040±0.00014 ^a	0.00028±0.00010 ^a	2.41±0.16 ^{ab}	0.00411±0.00054 ^{ab}	3.35±0.14 ^{ab}	0.00013±0.00006 ^a	4.55±0.11 ^{ab}	0.00023±0.00006 ^a	3.03±0.14 ^{bb}	0.00628±0.00111 ^{abc}	16	1.15±0.71 ^{ab}	0.0042±0.00009 ^{ab}	0.00036±0.00009 ^a	0.62±0.20 ^{bc}	0.00263±0.0002 ^{abc}	2.13±0.05 ^{bb}	4.49±0.20 ^{ab}	0.00037±0.00006 ^{ab}	0.65±0.13 ^{cd}	0.00521±0.00128 ^{abc}	
	24	1.08±0.02 ^{ab}	0.0008±0.00014 ^a	0.00039±0.00018 ^{ab}	1.86±0.03 ^b	0.00283±0.00041 ^{abc}	1.64±0.21 ^{bc}	0.00017±0.00006 ^a	3.09±0.12 ^c	0.00013±0.00006 ^a	0.78±0.20 ^c	0.000311±0.00083 ^{cd}	48	0.94±0.13 ^{bb}	0.00017±0.00006 ^a	0.00028±0.00008 ^{ab}	1.76±0.09 ^{bb}	0.00882±0.00138 ^{ab}	1.82±0.21 ^{abc}	0.00017±0.00012 ^{ab}	2.13±0.13 ^{bb}	0.00023±0.00012 ^a	0.97±0.33 ^{bc}	0.00571±0.00488 ^{ab}
	72	0.13±0.07 ^{de}	0.00017±0.00003 ^a	0.00015±0.00003 ^{bc}	0.05±0.14 ^{cd}	0.00016±0.00003 ^{ab}	0.03±0.10 ^{bc}	0.00010±0.00000 ^{ab}	0.11±0.10 ^{cd}	0.00013±0.00005 ^{bc}	0.28±0.26 ^{bb}	0.00011±0.00001 ^{cd}	Skim	1.49±0.13 ^{ab}	0.00033±0.00022 ^a	0.00025±0.00011 ^{abc}	2.59±0.11 ^{ab}	0.00165±0.00015 ^{bb}	2.96±0.01 ^{ab}	0.00029±0.00009 ^{ab}	2.63±0.20 ^{ab}	0.00016±0.00003 ^{bc}	2.76±0.61 ^{ab}	0.00459±0.00060 ^{bc}
	8	1.86±0.15 ^{ab}	0.00037±0.00008 ^a	0.00038±0.00005 ^{abc}	1.86±0.15 ^{ab}	0.00032±0.00020 ^{ab}	3.24±0.31 ^{ab}	0.00024±0.00009 ^a	3.06±0.09 ^{ab}	0.00016±0.00005 ^{bc}	3.05±0.12 ^{ab}	0.01298±0.00005 ^{ab}	16	1.09±0.11 ^{ab}	0.00038±0.00012 ^{ab}	0.00065±0.0001 ^{ab}	0.76±0.19 ^{bc}	0.00013±0.00004 ^a	3.00±0.16 ^{ab}	0.00027±0.00014 ^{bc}	0.65±0.08 ^{bb}	0.00897±0.00017 ^{ab}		
	24	0.43±0.04 ^{de}	0.00014±0.00004 ^a	0.00028±0.00011 ^{abc}	1.89±0.26 ^{bb}	0.01559±0.00182 ^{ab}	1.88±0.15 ^{bb}	0.00013±0.00002 ^a	1.88±0.31 ^{bb}	0.00069±0.00017 ^{bb}	0.63±0.12 ^{bb}	0.00987±0.00039 ^{ab}	48	0.64±0.33 ^{cd}	0.00022±0.00004 ^a	0.00121±0.00024 ^{ab}	1.02±0.05 ^{cd}	0.000878±0.00743 ^{ab}	2.08±0.06 ^{bb}	1.10±0.21 ^{bc}	0.00126±0.00006 ^{ab}	0.31±0.24 ^{bb}	0.01062±0.00136 ^{ab}	
	72	0.64±0.33 ^{cd}	0.00022±0.00004 ^a	0.00121±0.00024 ^{ab}	1.02±0.05 ^{cd}	0.000878±0.00743 ^{ab}	2.08±0.06 ^{bb}	1.10±0.21 ^{bc}	0.00126±0.00006 ^{ab}	0.31±0.24 ^{bb}	0.01062±0.00136 ^{ab}													

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอย่างที่เพิ่มพูนขึ้นใหม่แสดงค่าความแตกต่างของผลการทดลองที่เวลาเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน
อย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิเดียวกัน (แนวกอกลมัน) ส่วนตัวอย่างที่เพิ่มพูนขึ้นใหม่ที่แตกต่างของผลการทดลองที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันมีนัยสำคัญ
ที่ช่วงเวลาเดียวกัน (แนวกว) การทดสอบทางสถิติจะใช้ Tukey's test ที่ค่า $p \leq 0.05$ บริเวณแถบสีเทาแสดงค่าการลดลงมากที่สุดในแต่ละสภาวะการ
ทดลอง

ตาราง 19 การลดลงของเชื้อ *P. mosseslii* C24 และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อมีการใช้เฟด Q21A เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้เฟด
ระดับการปนเปื้อนเชื้อปริมาณสูง

อาหาร (นม.)	4 °C			10 °C			30 °C			4 °C			10 °C			30 °C		
	จำนวน แบคทีเรีย ที่ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรมเอนไซม์ โปรติเอสที่ลดลง (unit)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลดลง (log CFU/mL)	จำนวน แบคทีเรีย ที่ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลดลง (unit)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลดลง (log CFU/mL)	จำนวน แบคทีเรียที่ ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลดลง (unit)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลดลง (log CFU/mL)	จำนวน แบคทีเรียที่ ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลดลง (unit)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลดลง (log CFU/mL)	จำนวน แบคทีเรีย ที่ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลดลง (unit)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลดลง (log CFU/mL)	จำนวน แบคทีเรีย ที่ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอสที่ลดลง (unit)	
NB	0	-0.07±0.11 ^{bd}	0.00018±0.00005 ^{bb}	0.26±0.09 ^c	0.00020±0.00008 ^{aa}	0.11±0.07 ^{bd}	0.00018±0.00005 ^{ee}	-0.16±0.34 ^c	0.00016±0.00006 ^{bb}	0.17±0.25 ^{bd}	0.00022±0.00003 ^{abbc}	0.00022±0.00003 ^{abbc}	0.17±0.25 ^{bd}	0.00016±0.00006 ^{bb}	0.00022±0.00003 ^{abbc}	0.00022±0.00003 ^{abbc}	0.00012±0.00003 ^{ee}	
	8	1.25±0.13 ^{bb}	0.00036±0.00014 ^{ab}	0.89±0.05 ^{cb}	0.00030±0.00003 ^{aa}	2.70±0.19 ^{ba}	0.00137±0.00026 ^{bd}	3.36±0.33 ^{ba}	0.00021±0.00004 ^{bb}	1.97±0.13 ^{bb}	0.00011±0.00003 ^{cc}	0.00011±0.00003 ^{cc}	1.97±0.13 ^{bb}	0.00021±0.00004 ^{bb}	0.00011±0.00003 ^{cc}	0.00011±0.00003 ^{cc}	4.05±0.13 ^{aa}	
	16	1.68±0.08 ^{aa}	0.00018±0.00005 ^{bb}	1.75±0.03 ^{ba}	0.00054±0.00015 ^{ba}	2.44±0.05 ^{aa}	0.01247±0.00020 ^{ba}	3.04±0.14 ^{aa}	0.00025±0.00001 ^{bb}	2.85±0.03 ^{ba}	0.00014±0.00003 ^{bbc}	0.00014±0.00003 ^{bbc}	2.85±0.03 ^{ba}	0.00025±0.00001 ^{bb}	0.00014±0.00003 ^{bbc}	0.00014±0.00003 ^{bbc}	1.91±0.13 ^{bbc}	
	24	0.75±0.18 ^{cc}	0.00042±0.00004 ^{ab}	1.50±0.22 ^{ba}	0.00037±0.00008 ^{aa}	1.27±0.06 ^{bb}	0.00852±0.00024 ^{cc}	2.90±0.17 ^{aa}	0.00035±0.00002 ^{bb}	1.54±0.07 ^{bc}	0.00031±0.00010 ^{ab}	0.00031±0.00010 ^{ab}	1.54±0.07 ^{bc}	0.00035±0.00002 ^{bb}	0.00031±0.00010 ^{ab}	0.00031±0.00010 ^{ab}	1.57±0.23 ^{bc}	
	48	1.86±0.06 ^{aa}	0.00025±0.00002 ^{bb}	0.42±0.03 ^{cc}	0.00029±0.00009 ^{ba}	0.81±0.18 ^{bc}	0.01059±0.00015 ^{bb}	1.35±0.41 ^{bb}	0.00033±0.00011 ^{bb}	1.87±0.20 ^{bbc}	0.00023±0.00002 ^{abbc}	0.00023±0.00002 ^{abbc}	1.87±0.20 ^{bbc}	0.00033±0.00011 ^{bb}	0.00023±0.00002 ^{abbc}	0.00023±0.00002 ^{abbc}	2.01±0.10 ^{bb}	
	72	1.27±0.15 ^{bb}	0.00052±0.00010 ^{ba}	0.97±0.02 ^{bb}	0.00047±0.00020 ^{aa}	0.49±0.06 ^{cc}	0.00828±0.00044 ^{cc}	1.36±0.03 ^{bb}	0.00123±0.00034 ^{ba}	1.74±0.08 ^{bbc}	0.00037±0.00007 ^{ba}	0.00037±0.00007 ^{ba}	1.74±0.08 ^{bbc}	0.00123±0.00034 ^{ba}	0.00037±0.00007 ^{ba}	0.00037±0.00007 ^{ba}	1.81±0.01 ^{bbc}	
Skim milk	0	-0.04±0.04 ^{bd}	0.00016±0.00005 ^{bb}	0.03±0.06 ^{de}	0.00022±0.00008 ^{aa}	0.25±0.04 ^{bd}	0.00015±0.00003 ^{cc}	0.10±0.07 ^{bd}	0.00021±0.00008 ^{aa}	-0.07±0.06 ^{cd}	0.00019±0.00003 ^{bb}	0.00019±0.00003 ^{bb}	-0.07±0.06 ^{cd}	0.00021±0.00008 ^{aa}	0.00019±0.00003 ^{bb}	0.00019±0.00003 ^{bb}	0.66±0.04 ^{ef}	
	8	1.26±0.10 ^{bb}	0.00035±0.00003 ^{ba}	1.31±0.06 ^{cc}	0.00014±0.00006 ^{aa}	2.78±0.10 ^{ba}	0.00057±0.00007 ^{cc}	4.02±0.09 ^{ba}	0.00031±0.00008 ^{aa}	2.45±0.18 ^{ab}	0.00026±0.00008 ^{ab}	0.00026±0.00008 ^{ab}	2.45±0.18 ^{ab}	0.00031±0.00008 ^{aa}	0.00026±0.00008 ^{ab}	0.00026±0.00008 ^{ab}	4.92±0.18 ^{aa}	
	16	1.79±0.10 ^{ba}	0.00024±0.00001 ^{bb}	1.73±0.08 ^{bb}	0.00023±0.00003 ^{aa}	2.00±0.01 ^{cc}	0.00032±0.00037 ^{cc}	2.53±0.56 ^{cc}	0.00026±0.00003 ^{aa}	1.89±0.02 ^{cbc}	0.00022±0.00006 ^{ab}	0.00022±0.00006 ^{ab}	1.89±0.02 ^{cbc}	0.00026±0.00003 ^{aa}	0.00022±0.00006 ^{ab}	0.00022±0.00006 ^{ab}	4.28±0.08 ^{bb}	
	24	0.79±0.19 ^{cc}	0.00024±0.00003 ^{bb}	1.02±0.03 ^{bd}	0.00031±0.00005 ^{ba}	1.97±0.04 ^{cc}	0.00271±0.00040 ^{bb}	2.04±0.85 ^{cc}	0.00024±0.00012 ^{ba}	2.08±0.22 ^{abcc}	0.00072±0.00033 ^{aa}	0.00072±0.00033 ^{aa}	2.08±0.22 ^{abcc}	0.00024±0.00012 ^{ba}	0.00072±0.00033 ^{aa}	0.00072±0.00033 ^{aa}	3.63±0.11 ^{ac}	
	48	0.92±0.06 ^{cc}	0.00026±0.00002 ^{ab}	1.55±0.10 ^{bb}	0.00026±0.00002 ^{aa}	2.24±0.03 ^{bb}	0.01008±0.00060 ^{ba}	2.04±0.85 ^{cc}	0.00022±0.00002 ^{aa}	2.54±0.27 ^{aa}	0.00030±0.00008 ^{ab}	0.00030±0.00008 ^{ab}	2.54±0.27 ^{aa}	0.00022±0.00002 ^{aa}	0.00030±0.00008 ^{ab}	0.00030±0.00008 ^{ab}	2.94±0.19 ^{bd}	
	72	0.76±0.08 ^{cc}	0.00026±0.00003 ^{ba}	1.94±0.05 ^{ba}	0.00044±0.00043 ^{aa}	2.02±0.01 ^{cc}	0.00935±0.00033 ^{aa}	2.77±0.08 ^{abcc}	0.00040±0.00007 ^{aa}	1.76±0.30 ^{bc}	0.00042±0.00003 ^{ab}	0.00042±0.00003 ^{ab}	1.76±0.30 ^{bc}	0.00040±0.00007 ^{aa}	0.00042±0.00003 ^{ab}	0.00042±0.00003 ^{ab}	2.04±0.01 ^{ef}	

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่แสดงความแตกต่างของผลการทดลองที่เวลาเก็บตัวอย่างที่ต่างกัน
อย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิเดียวกัน (แนวคอลัมน์) ส่วนตัวอักษรพิมพ์เล็กแสดงความแตกต่างของผลการทดลองที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
ที่ช่วงเวลาเดียวกัน (แนวแถว) การทดสอบทางสถิติจะใช้ Tukey's test ที่ค่า $p \leq 0.05$ บริเวณแถบสีเทาแสดงค่าการลดลงมากที่สุดในแต่ละสภาวะการ

ตาราง 20 การลดลงของเชื้อ *P. mosseslii* C24 และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เมื่อมีการใช้เฟดผสม เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใช้เฟดผสม

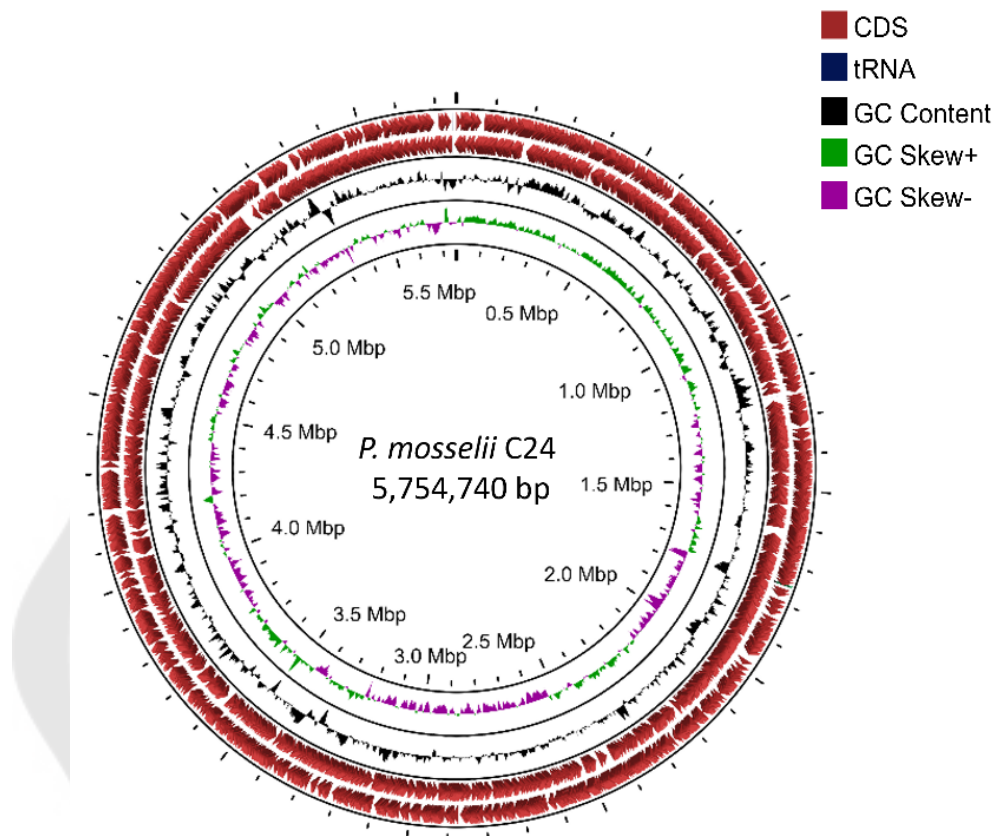
อาหาร	เวลา (ชม.)	ระดับการปนเปื้อนเชื้อปริมาณต่ำ						ระดับการปนเปื้อนเชื้อปริมาณสูง					
		4 °C		10 °C		30 °C		4 °C		10 °C		30 °C	
		จำนวนแบคทีเรียที่ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ลดลง (unit)	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ลดลง (unit)	จำนวนแบคทีเรียที่ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ลดลง (unit)	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ลดลง (unit)	จำนวนแบคทีเรียที่ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ลดลง (unit)	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ลดลง (log CFU/mL)	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ลดลง (unit)
NB	0	-0.05±0.13 ^{ab}	0.00020±0.00007 ^{ac}	-0.36±0.06 ^{cd}	0.00026±0.00006 ^c	0.07±0.13 ^{cd}	0.00011±0.00001 ^a	0.00017±0.00005 ^a	0.22±0.06 ^{cd}	0.00017±0.00005 ^a	0.20±0.11 ^{cd}	0.00026±0.00014 ^{cd}	
	8	2.81±0.60 ^{ab}	0.00016±0.00002 ^{bc}	1.62±0.06 ^{ab}	0.00023±0.00009 ^{bc}	3.15±0.20 ^{ab}	0.00795±0.00006 ^a	0.00015±0.00006 ^a	1.28±0.31 ^{abc}	0.00024±0.00009 ^a	3.38±0.13 ^{ab}	0.00766±0.00062 ^{ab}	
	16	2.61±0.50 ^{ab}	0.00072±0.00005 ^c	1.36±0.15 ^{ab}	0.00062±0.00021 ^{abc}	2.84±0.15 ^{ab}	0.00675±0.00092 ^b	0.00033±0.00005 ^a	3.27±0.10 ^{ab}	0.00025±0.00013 ^a	3.18±0.05 ^{ab}	0.01024±0.00032 ^{ab}	
	24	1.76±0.30 ^{bc}	0.00074±0.00026 ^{bc}	1.40±0.47 ^{ab}	0.0011±0.00007 ^{ab}	1.67±0.19 ^{cd}	0.00765±0.00037 ^{ab}	0.00055±0.00036 ^{ab}	1.61±0.09 ^{ab}	0.00016±0.00010 ^a	2.08±0.20 ^{bb}	0.00651±0.00063 ^{bb}	
	48	1.40±0.07 ^{cd}	0.00186±0.00056 ^{ab}	1.54±0.25 ^{ab}	0.00118±0.00009 ^{ab}	2.00±0.04 ^{abc}	0.00882±0.00135 ^{ab}	0.00031±0.00001 ^a	1.06±0.07 ^{cd}	0.00033±0.00007 ^a	1.09±0.06 ^{cd}	0.00653±0.00074 ^{bb}	
	72	1.70±0.19 ^{bc}	0.00208±0.00047 ^{ab}	1.60±0.16 ^{ab}	0.00182±0.00038 ^{ab}	2.14±0.16 ^{ab}	0.00992±0.00073 ^{ab}	0.00014±0.00006 ^a	1.10±0.07 ^{cd}	0.00033±0.00007 ^a	1.19±0.42 ^{cd}	0.00281±0.00036 ^c	
	0	0.08±0.09 ^{cd}	0.00022±0.00004 ^c	-0.15±0.14 ^{cd}	0.00019±0.00008 ^{cd}	-0.10±0.06 ^{cd}	0.00026±0.00003 ^{ab}	0.00016±0.00003 ^{ab}	0.01±0.10 ^{cd}	0.00018±0.00009 ^{ab}	0.00±0.12 ^{ef}	0.00024±0.00011 ^{cd}	
Skim milk	8	1.97±0.14 ^{ab}	0.00096±0.00012 ^{ab}	1.03±0.60 ^{bb}	0.00052±0.00009 ^{ab}	2.10±0.19 ^{ab}	0.00057±0.00017 ^{ab}	3.75±0.05 ^a	5.63±0.10 ^a	0.00020±0.00009 ^{bb}	5.92±0.16 ^{ab}	0.00235±0.00015 ^{cd}	
	16	1.87±0.03 ^{ab}	0.00056±0.00009 ^{bc}	1.55±0.28 ^{ab}	0.00073±0.00006 ^{ab}	1.49±0.12 ^{cd}	0.00299±0.00006 ^{ab}	3.31±0.57 ^{ab}	5.67±0.08 ^{ab}	0.00023±0.00010 ^{bb}	5.31±0.24 ^{ab}	0.00402±0.00008 ^{bc}	
	24	1.29±0.07 ^{cd}	0.00060±0.00035 ^{bc}	1.54±0.23 ^{ab}	0.00053±0.00007 ^{ab}	2.83±0.15 ^{ab}	0.00339±0.00056 ^{ab}	0.00014±0.00003 ^{ab}	2.94±0.04 ^{bb}	0.00017±0.00005 ^{bb}	4.16±0.16 ^{cd}	0.00563±0.00031 ^{abc}	
	48	1.61±0.07 ^{ab}	0.00155±0.00008 ^{ab}	1.65±0.27 ^{ab}	0.00060±0.00013 ^{ab}	2.97±0.13 ^{ab}	0.00748±0.00173 ^{ab}	0.00044±0.00005 ^{bb}	2.67±0.06 ^{bb}	0.00069±0.00010 ^a	3.56±0.13 ^{ab}	0.00701±0.00192 ^{bb}	
	72	1.83±0.08 ^{ab}	0.00116±0.00029 ^{ab}	2.12±0.16 ^{ab}	0.00136±0.00007 ^{ab}	2.34±0.01 ^{ab}	0.00814±0.00147 ^{ab}	0.01022±0.00345 ^{ab}	1.62±0.27 ^{cd}	0.00078±0.00016 ^{ab}	2.64±0.33 ^{de}	0.01255±0.00145 ^{ab}	

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD จากการทดลองสามซ้ำ ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่แสดงความแตกต่างของผลการทดลองที่เวลาเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน
 อย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิเดียวกัน (แนวคอลัมน์) ส่วนตัวอักษรพิมพ์เล็กแสดงความแตกต่างของผลการทดลองที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันมีนัยสำคัญ
 ที่ช่วงเวลาเดียวกัน (แนวแถว) การทดสอบทางสถิติจะใช้ Tukey's test ที่ $p \leq 0.05$ บริเวณแถบสีเทาแสดงค่าการลดลงมากที่สุดในแต่ละสภาวะการทดลอง

14. การหาลำดับจีโนมทั้งหมด

14.1 การหาลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อ *Pseudomonas*

การวิเคราะห์ลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อ *P. mosselii* C24 และการรวมนิวคลีโอไทด์สายสั้น (reads) เป็นนิวคลีโอไทด์สายยาว (contig) โดยใช้โปรแกรม SPAdes v.3.12 พบว่า เชื้อ *P. mosselii* C24 ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 5,754,740 คู่เบส และมี G+C content เท่ากับ 64.4 เปอร์เซ็นต์ ผลการวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนด้วยโปรแกรม Prokka v.1.12 และระบุหน้าที่ของยีนด้วย BLASTp เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI พบว่า จีโนมประกอบด้วย open reading frames (ORFs) 5,253 ORFs และพบยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์โปรตีนเอสซึ่งวิเคราะห์จากฐานข้อมูล UniProt ทั้งหมด 11 ยีน (ตาราง 21) การตรวจสอบยีนต้านยาปฏิชีวนะโดยโปรแกรม comprehensive antibiotic resistance database (CARD) พบว่า *P. mosselii* C24 มียีนที่ทำให้เกิดการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะคือ ยีน resistance - nodulation - cell division (RND) antibiotic efflux pumps ในการตรวจสอบ virulence factor ของเชื้อผ่าน virulence factor database (VFDB) พบว่า *P. mosselii* C24 ตรวจพบยีน *mbtH* - like และยีน *hsiC1/vipB* นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบ prophage โดยโปรแกรม PHASTER โดยพบว่ามี prophage บนจีโนมทั้งหมด 10 ตำแหน่ง และเมื่อตรวจสอบพลาสมิดด้วยโปรแกรม PlasmidFinder พบว่า ไม่พบพลาสมิด โดยแผนภาพจีโนมทั้งหมดของ *P. mosselii* C24 จัดทำโดย CG - view server (ภาพประกอบ 27) ข้อมูลจีโนมของ *P. mosselii* C24 ได้นำเข้าสู่ระบบฐานข้อมูล NCBI ภายใต้หมายเลข accession number JAPHNF000000000



ภาพประกอบ 27 แผนภาพจีโนมทั้งหมดของ *P. mosselii* C24

(แผนภาพจีโนมทั้งหมดของ *P. mosselii* C24 จากวงด้านนอกสู่วงด้านในแสดงตามลำดับดังนี้ วงที่ 1 คือ forward strand, วงที่ 2 คือ reverse strand, วงที่ 3 คือ GC content, วงที่ 4 คือ GC skew และวงที่ 5 คือ ตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยสีในแต่ละวงแสดงดังสัญลักษณ์ทางด้านขวาของภาพ)

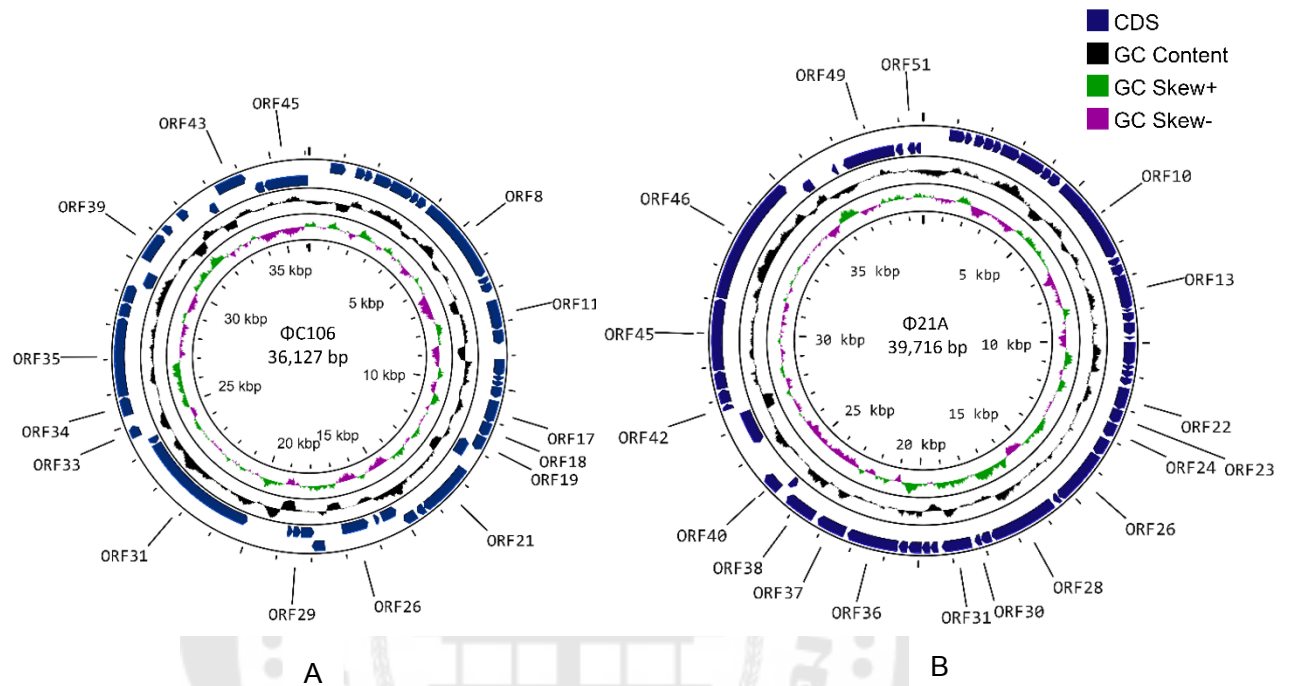
ตาราง 21 ยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์โปรติเอสในลำดับจีโนมของเชื้อ *P. mosselii* C24

ORF	ตำแหน่ง		สาย (strand)	หน้าที่ของยีน	ความยาว (คู่เบส)	UniProtKB
	เริ่ม	หยุด				
82	88,387	89,403	F	Putative protease SohB	1,017	P0AG14
1763	137,601	138,488	F	Protease HtpX	888	Q9PA93
1788	161,857	163,314	R	Metalloprotease AprA	1,458	A0A0C5CJR8
2015	203	1,363	R	Serine endoprotease DegS	1,161	P0AEE3
2035	21,544	24,543	F	Extracellular serine protease	3,000	P09489
2036	24,632	27,718	F	Extracellular serine protease	3,087	P09489
2601	275,612	276,958	R	Metalloprotease PmbA	1,347	P0AFK0
2603	277,667	279,106	R	Metalloprotease TldD	1,440	P0AGG8
2832	176,320	177,675	F	Putative zinc protease	1,356	P9WHT5
3148	210,039	210,581	F	Putative cysteine protease YraA	543	O06006
4223	76,121	76,936	R	Metalloprotease LoiP	816	P25894

F คือ Forward, R คือ Reverse

14.2 การหาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจ

การวิเคราะห์ลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจ Φ C106 และ Φ 21A พบว่า จีโนมของเฟจ Φ C106 และ Φ 21A เป็นดีเอ็นเอสายคู่ มีความยาว 36,127 คู่เบส และ 39,716 คู่เบส และมี G+C content เท่ากับ 56.83 และ 59.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพประกอบ 28) ผลจากการเปรียบเทียบจีโนมของเฟจกับฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับพันธุกรรมทุก node ของเฟจ Φ C106 มีความเหมือนกันมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์กับเฟจ UNO - SLW1 (accession number NC_047873.1) ซึ่งเป็นเฟจที่ติดเชื้อใน *Pseudomonas* นอกจากนี้ยังพบว่า มี 2 node ที่แสดงความเหมือนกันมากกว่า 78 เปอร์เซ็นต์ กับเฟจ PppW-4 ที่ติดเชื้อใน *Pseudomonas* เช่นเดียวกัน (accession number AB775549.1) ผลการวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนและระบุหน้าที่ของยีนโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI พบว่า จีโนมของเฟจ Φ C106 ประกอบด้วย ORF ทั้งหมด 45 ORFs แต่มีเพียง 15 ORFs ที่สามารถระบุหน้าที่ของยีนได้ (ตาราง 22) ส่วนเฟจ Φ 21A ประกอบด้วย ORF ทั้งหมด 52 ORFs โดยสามารถระบุหน้าที่ของยีนได้เพียง 18 ORFs (ตาราง 23) และเฟจทั้งสองตัวไม่พบ tRNA gene เมื่อวิเคราะห์ผ่านโปรแกรม tRNAscan-SE นอกจากนี้เฟจ Φ C106 และ Φ 21A ไม่พบ ORF ที่แสดงออกเป็นโปรตีน toxin, virulence factor และยีนต้านยาปฏิชีวนะ รวมถึงไม่พบกลุ่มยีนที่จำเป็นใน lysogenic cycle ของเฟจ ได้แก่ โปรตีน integrase, recombinase, repressor, anti-repressor protein และ excisionase และจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PhageAI แสดงให้เห็นว่าเฟจ Φ C106 และ Φ 21A ถูกจัดเป็น virulent phage ที่ระดับ 99.68 และ 99.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ข้อมูลจีโนมของเฟจ Φ C106 ได้นำเข้าสู่ระบบฐานข้อมูล NCBI ภายใต้หมายเลข accession number OQ079412, OQ079413, OQ079414, OQ079415 และ OQ079416 ส่วนเฟจ Φ 21A อยู่ภายใต้หมายเลข accession number OQ079410 และ OQ079411



ภาพประกอบ 28 แผนภาพจีโนมทั้งหมดของเฟจ Φ C106 และ Φ 21A

(แผนภาพจีโนมทั้งหมดของเฟจ Φ C106 และ Φ 21A จากวงด้านนอกสู่วงด้านในแสดงตามลำดับ ดังนี้ วงที่ 1 คือ forward strand, วงที่ 2 คือ reverse strand, วงที่ 3 คือ GC content, วงที่ 4 คือ GC skew และวงที่ 5 คือ ตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยสีในแต่ละวงแสดงดังสัญลักษณ์ทางด้านขวาของภาพ)

ตาราง 22 การวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนและระบุหน้าที่ของยีนของเฟจ Φ C106 โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI

ORF	ตำแหน่ง		สาย (Strand)	หน้าที่ของยีน	E - value	Identity (%)	GenBank ID
	เริ่ม	หยุด					
8	3,883	6,534	F	DNA - directed RNA polymerase	0	99.66	YP_009793697.1
11	7,315	8,223	F	DNA ligase	0	99.34	YP_009793700.1
17	10,378	11,067	F	Single - stranded DNA - binding protein gp2.5	1e - 150	99.56	YP_009793706.1
18	11,067	11,507	F	Endonuclease	1e - 73	99.18	YP_009793707.1
19	11,518	11,979	F	Lysin	5e - 97	88.24	YP_009793708.1
21	12,650	14,338	F	Primase/helicase protein	0	99.82	YP_009793710.1
26	433	1,329	R	Terminase large subunit	4e - 177	80.87	QNJ57260.1
29	2,662	2,919	R	DNA packaging protein A	3e - 42	100	YP_009793732.1
31	4,445	8,437	R	Protein inside capsid D	0	99.77	YP_009793729.1
33	203	571	F	Capsid and scaffold protein	3e - 80	100	YP_009793722.1
34	903	1,490	F	Tail fiber protein	3e - 142	100	YP_009793724.1
35	1,501	3,909	F	Tail fiber protein	0	99.88	YP_009793725.1
39	80	991	F	Exonuclease	0	100	YP_009793716.1
43	3,122	4,078	F	Capsid and scaffold protein	0	99.69	YP_009793721.1
45	376	1,821	R	DNA polymerase	0	100	YP_009793713.1

F คือ Forward, R คือ Reverse

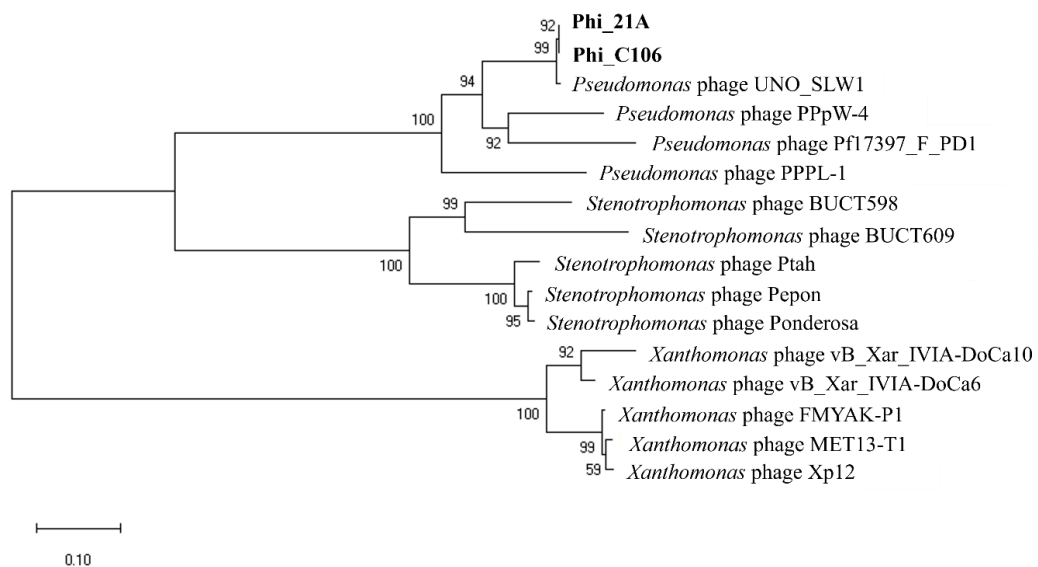
ตาราง 23 การวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนและระบุหน้าที่ของยีนของเฟจ Φ 21A โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI

ORF	ตำแหน่ง		สาย (Strand)	หน้าที่ของยีน	E - value	Identity (%)	GenBank ID
	เริ่ม	หยุด					
10	4,661	7,327	F	Putative RNA polymerase	0	77.90	YP_008873136.1
13	7,921	8,964	F	Putative DNA ligase	7e - 170	67.04	YP_008873139.1
22	11,380	12,063	F	Putative single - stand DNA - binding protein	6e - 118	85.90	YP_008873147.1
23	12,063	12,503	F	Putative endonuclease	2e - 80	86.99	YP_008873148.1
24	12,513	12,974	F	Putative lysozyme/amidase	1e - 89	81.05	UKL14709.1
26	13,608	15,338	F	Putative DNA primase/helicase	0	87.94	YP_008873151.1
28	15,607	17,736	F	Putative DNA polymerase	0	90.41	YP_008873153.1
30	18,069	18,278	F	HNS binding protein	1e - 39	92.75	YP_009793715.1
31	18,373	19,302	F	Putative exonuclease	0	84.04	YP_008873156.1
36	20,641	22,242	F	Putative head - tail connector protein	0	92.84	YP_008873161.1
37	22,317	23,240	F	Putative capsid assembly protein	7e - 117	65.35	YP_008873162.1
38	23,381	24,406	F	Putative major capsid protein	0	92.08	YP_008873163.1
40	24,742	25,329	F	Putative tail tubular protein A	2e - 120	90.77	YP_008873165.1
42	27,640	27,831	F	Putative tail tubular protein B	6e - 30	92.06	YP_008873166.1
45	28,879	31,077	F	Putative internal virion protein C	0	82.60	YP_008873169.1
46	31,092	35,090	F	Peptidoglycan lytic exotransglycosylase	0	76.13	UBU95736.1
49	527	2,290	R	Putative terminase, large subunit	0	92.60	YP_008873175.1
51	2,720	2,977	R	Putative terminase, small subunit	5e - 42	83.53	YP_008873173.1

F คือ Forward, R คือ Reverse

15. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเฟจ

ผลการวิเคราะห์และสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree ของเฟจ Φ C106 และ Φ 21A โดยใช้ยีน terminase large subunit พบว่า เฟจ Φ C106 และ Φ 21A มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Pseudomonas* phage UNO-SLW1 มากที่สุด โดยมีค่า bootstrap เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ จากแผนภูมิแสดงให้เห็นว่ายีน terminase large subunit สามารถใช้จำแนกเฟจในกลุ่ม *Pseudomonas* ออกจากเฟจในกลุ่มแบคทีเรียอื่นอย่างเห็นได้ชัด (ภาพประกอบ 29)



ภาพประกอบ 29 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเฟจ Φ C106 และ Φ 21A

(แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเฟจ Φ C106 และ Φ 21A โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน terminase large subunit วิเคราะห์โดยวิธีการ Neighbor-joining โดยทดสอบความเชื่อมั่นด้วยค่า bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ)

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้สามารถคัดแยกเชื้อ *Pseudomonas* จากตัวอย่างนมดิบในประเทศไทย ได้ทั้งหมด 225 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการสร้างเอนไซม์โปรติเอสบนอาหาร skim milk ผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกเชื้อที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสในปริมาณสูงได้จำนวน 14 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อทั้ง 14 ไอโซเลทมาจัดจำแนกในระดับสปีชีส์โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่าเป็น *P. mosselii* 8 สายพันธุ์, *P. fluorescens* 2 สายพันธุ์, *P. fragi* 1 สายพันธุ์, *P. taiwanensis* 1 สายพันธุ์ และ *P. aeruginosa* 1 สายพันธุ์ โดยมี 1 ไอโซเลทที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่สามารถแยกเชื้อกลุ่ม *Pseudomonas* อาทิ *P. fluorescens*, *P. fragi* และ *P. aeruginosa* ได้จากนมดิบ⁽³⁵⁾

Pseudomonas เป็นแบคทีเรียที่มักพบการปนเปื้อนในนมดิบ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิเย็น⁽³⁴⁾ โดยพบว่า *Pseudomonas* สามารถใช้สารอาหารโดยทั่วไปได้ง่าย และมีระยะเวลาการแบ่งเซลล์ที่สั้น (น้อยกว่า 4 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 0 - 7 องศาเซลเซียส⁽³⁶⁾ จากรายงานของ Dogan และ Boor (2003)⁽³⁷⁾ พบว่า *Pseudomonas* สามารถแบ่งเซลล์จาก 1 เซลล์ไปเป็น 1.0×10^6 CFU/mL ภายใน 8 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่งผลให้สามารถเจริญในนมดิบที่มีการแช่เย็นได้ดีกว่าแบคทีเรียอื่น

P. mosselii และ *P. taiwanensis* ยังไม่มีการรายงานว่าพบในนมดิบมาก่อน อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าสามารถพบเชื้อสองสายพันธุ์ดังกล่าวได้ในตัวอย่างดิน^(45, 141) ซึ่งการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียจากดินสู่นมดิบสามารถเกิดขึ้นได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากสุขอนามัยที่ไม่เหมาะสมของฟาร์มโคนม

เชื้อ *Pseudomonas* ทั้ง 14 สายพันธุ์จะถูกนำมาวิเคราะห์หายีน *aprX* ซึ่งแปลรหัสเป็นโปรตีน AprX หรือเอนไซม์โปรติเอส พบว่า *Pseudomonas* ทั้ง 14 สายพันธุ์ สามารถตรวจพบ ยีนดังกล่าว โดยในส่วนของนิวคลีโอไทด์ในยีน *aprX* พบว่า มีบริเวณอนุรักษ์สูงในสปีชีส์ของ *Pseudomonas* ที่แยกได้จากนมดิบ จึงทำให้สามารถใช้ยีน *aprX* ในการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอสในนมดิบได้⁽⁶²⁾ นอกจากนี้ศักยภาพในการย่อยโปรตีน อาจเกิดจากความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีน *aprX* อีกด้วย⁽⁶³⁾

เอนไซม์โปรติเอสที่สร้างจาก *P. mosselii* C4 และ *P. mosselii* N1 และ *P. fluorescens* TISTR 1887 ที่มีการสร้างเอนไซม์โปรติเอสมากที่สุดถูกนำมาวิเคราะห์หามวลโมเลกุลโดยวิธีการ zymography ที่อาศัย skim milk เป็นซับสเตรต ของเอนไซม์ โดยตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์เตรียมจากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียดังกล่าว ผลการทดลองพบว่า *P. mosselii* C4 และ *P. mosselii* N1 สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 47 กิโลดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าเอนไซม์โปรติเอสที่สร้างขึ้นที่มักสร้างจากเชื้อ *Pseudomonas* spp. และทำให้เกิดการเน่าเสียในนมดิบ คือเอนไซม์ AprX ซึ่งเป็นเอนไซม์โปรติเอสที่จัดอยู่ในกลุ่ม alkaline metalloprotease และอยู่แฟมิลี serralysin มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วงประมาณ 40–50 กิโลดาลตัน⁽¹⁴²⁾ อย่างไรก็ตาม เอนไซม์โปรติเอสที่สร้างจาก *P. fluorescens* TISTR 1887 มีมวลโมเลกุลมากกว่า 180 กิโลดาลตัน ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นเอนไซม์โปรติเอสในกลุ่มอื่น ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานถึงเอนไซม์โปรติเอสที่มีมวลโมเลกุลสูงดังกล่าวที่สร้างจากเชื้อ *Pseudomonas* spp. จึงไม่สามารถสรุปว่าเป็นเอนไซม์โปรติเอสในกลุ่มใด ดังนั้นผลการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาค้นคว้าครั้งแรกที่พบเอนไซม์โปรติเอสลักษณะดังกล่าว

การทดสอบการเจริญของเชื้อและกิจกรรมการย่อยโปรตีนที่เกิดขึ้นในอาหาร skim milk ทำการทดสอบใน *Pseudomonas* สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด ได้แก่ *P. mosselii* C24, *P. mosselii* N1 และสายพันธุ์อ้างอิง คือ *P. fluorescens* TISTR 1887 เพื่อระบุค่ากิจกรรมการรวมเอนไซม์ที่สามารถทำให้ skim milk เกิดการตกตะกอน และปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดกิจกรรมเอนไซม์ดังกล่าว ผลการศึกษพบว่า *P. mosselii* C24, *P. mosselii* N1 และ *P. fluorescens* TISTR 1887 ทำให้ skim milk เกิดการตกตะกอนที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 0.0111 ± 0.00016 , 0.0041 ± 0.00006 และ 0.0084 ± 0.00022 unit ที่ปริมาณเท่ากับ 9.48 ± 0.013 , 9.39 ± 0.064 และ 8.73 ± 0.057 log CFU/ mL ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Kumaresan และคณะ ในปี 2007⁽¹⁴³⁾ ที่รายงานว่า การย่อยสลายของโปรตีนในนมดิบจะเกิดขึ้นเมื่อจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงหมักมีความเข้มข้นสูงกว่า 6 log CFU/mL และถึงแม้ว่าจำนวนของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์จะมีปริมาณใกล้เคียงกันหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *P. mosselii* C24 สูงกว่าเชื้ออีก 2 สายพันธุ์ สอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ที่กล่าวว่า ความสามารถในการทำให้นมเน่าเสียของ *Pseudomonas* spp. นั้นแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และสภาวะที่ใช้ในการเจริญ^(42, 144)

เชื้อ *Pseudomonas* ทั้ง 14 สายพันธุ์ รวมทั้งสายพันธุ์อ้างอิง ได้แก่ *P. fluorescens* TISTR 1887 ที่มีการสร้างเอนไซม์โปรติเอสจะถูกนำมาใช้เป็นไฮสตรสำหรับแยกเฟจจากตัวอย่างน้ำ

โดยสามารถแยกเฟจที่ให้พลาไคไซหรือไลติคเฟจ ได้ทั้งหมด 23 ตัว จากนั้นเฟจทั้ง 23 ตัว จะถูกนำมาตรวจสอบความสามารถของเฟจในการติดเชื้อ (host range) กับ *Pseudomonas* ทั้ง 14 สายพันธุ์และสายพันธุ์อ้างอิง ผลการทดสอบพบว่าเฟจ Φ C106 และ Φ 21A มีความสามารถในการติดเชื้อ *Pseudomonas* สายพันธุ์อื่นมากที่สุด ซึ่งทั้งสองเฟจสามารถติดเชื้อได้ 8 สายพันธุ์ รองลงมาคือ Φ TSI1 สามารถเข้าติดเชื้อได้ 4 สายพันธุ์ ดังนั้นเฟจทั้งสามตัวจึงถูกนำไปศึกษาในการทดลองต่อไป ทั้งนี้เฟจสามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลายตามที่โฮสต์แบคทีเรียอยู่ โดยเฟจสามารถพบได้ในน้ำมากกว่าดิน เนื่องจากเฟจสามารถเข้าถึงแบคทีเรียที่แขวนลอยอยู่ในตัวกลางที่เป็นของเหลวได้ง่ายกว่า ในขณะที่ดินมีความซับซ้อนทางกายภาพและทางเคมีมากกว่า ซึ่งเป็นการขัดขวางการเคลื่อนที่ของเฟจ⁽¹⁴⁵⁾ อย่างไรก็ตามเฟจค่อนข้างมีความจำเพาะต่อโฮสต์แบคทีเรียสูง⁽¹⁴⁶⁾ ดังนั้น ตัวอย่างน้ำจึงถูกนำมาใช้ในการแยกเฟจกลุ่มต่าง ๆ ในการทดลองนี้

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเฟจ พบว่าเฟจ Φ C106, Φ 21A และ Φ TSI1 ให้พลาไคที่มีขนาดแตกต่างกัน คือ 0.25 ± 0.053 , 0.54 ± 0.093 และ 0.47 ± 0.082 มิลลิเมตร ตามลำดับ และจากการศึกษารูปร่างเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า Φ C106 และ Φ 21A จัดอยู่ในแฟมิลี *Podoviridae* โดยส่วนหัวเป็นรูปร่างเหลี่ยมแบบสมมาตร (icosahedral symmetry) ขนาด 51.67 ± 1.67 และ 48.57 ± 2.86 นาโนเมตร และมีหางสั้น โดยมีความยาวเท่ากับ 12.78 ± 2.22 และ 11.42 ± 0.57 นาโนเมตร ตามลำดับ จากรูปร่างของเฟจดังกล่าว สามารถจัดจำแนกเฟจอยู่ในแฟมิลี *Podoviridae* ในขณะที่เฟจ Φ TSI1 มีส่วนหัวเป็นรูปร่างเหลี่ยมแบบสมมาตรขนาด 69.24 ± 0.34 นาโนเมตร ส่วนหางยาว โดยมีความยาวเท่ากับ 122.20 ± 0.48 นาโนเมตร และมีซีทเป็นส่วนประกอบ จากรูปร่างของเฟจดังกล่าว สามารถจัดจำแนกเฟจอยู่ในแฟมิลี *Myoviridae* จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าร้อยละ 97 ของเฟจใน *Pseudomonas* จัดอยู่ในคลาส *Caudovirales* (เฟจมีหาง)⁽¹⁴⁷⁾ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเฟจที่มีหางยาว และไม่มีซีท จัดอยู่ในแฟมิลี *Siphoviridae* อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า เฟจที่ติดเชื้อใน *Pseudomonas* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุให้นมเน่าเสีย พบว่าจัดอยู่ในแฟมิลี *Podoviridae* และ *Myoviridae* เช่นเดียวกัน ได้แก่ เฟจ HU1 (เฟจของ *P. lactis*), เฟจ UFJF_PfSW6 และ UFJF_PfDIW6 (เฟจของ *P. fluorescens*) ซึ่งเฟจทั้งสามถูกจัดอยู่ในแฟมิลี *Podoviridae* รวมทั้งเฟจที่แยกได้จาก *P. plecoglossicida*, *P. putida* และ *P. fluorescens* พบว่าถูกจัดอยู่ในแฟมิลี *Myoviridae*⁽¹⁴⁸⁾

การศึกษาอัตราส่วนของเฟจต่อโฮสต์ (MOI) ที่เหมาะสมในการติดเชื้อของเฟจ Φ C106, Φ 21A และ Φ TS11 โดยใช้โฮสต์เป็น *P. mosselii* C24, *P. mosselii* N1 และ *P. fluorescens* TISTR 1887 ตามลำดับ พบว่าเฟจแต่ละตัวมี MOI ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนให้ได้ปริมาณสูงที่สุดแตกต่างกัน โดยเฟจ Φ C106 และ Φ 21A มี MOI ที่เหมาะสมเท่ากับ 10 ในขณะที่เฟจ Φ TS11 มีค่า MOI ที่เหมาะสมเท่ากับ 100 ผลการทดลองสอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ ที่กล่าวว่า อัตราส่วนของจำนวนเฟจต่อจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปตามชนิดของเฟจ และสายพันธุ์ของแบคทีเรีย⁽¹¹⁰⁾ นอกจากนี้ MOI ยังมีความสำคัญต่อกระบวนการยับยั้งการติดเชื้อแบคทีเรียด้วยเฟจ

จากการศึกษากราฟการเจริญของเฟจ พบว่าเฟจ Φ C106 และ Φ 21A มี latent period ที่เท่ากัน คือ 20 นาที มี rise period เท่ากับ 10 และ 15 นาที และมี burst size เท่ากับ 1,862 และ 331 PFU/infected cell ตามลำดับ ในขณะที่เฟจ Φ TS11 มี latent period เท่ากับ 10 นาที มี rise period เท่ากับ 15 นาที และมี burst size เท่ากับ 7,000 PFU/infected cell ทั้งนี้การนำเฟจไปใช้ในรูปแบบ phage therapy ควรคัดเลือกเฟจที่มี latent period ที่สั้น และมี burst size ที่มาก เนื่องจากแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเฟจได้อย่างรวดเร็ว และมีการผลิตเฟจออกมาจำนวนมากต่อการติดเชื้อแต่ละครั้ง ซึ่งเพิ่มโอกาสในการลดจำนวนแบคทีเรียเป้าหมายได้ดียิ่งขึ้น^(149, 150)

การศึกษาความเสถียรต่อค่า pH และอุณหภูมิถือเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของเฟจ โดยเฟจ Φ 21A และ Φ TS11 มีความเสถียรที่ค่า pH ตั้งแต่ 4 - 10 และมีปริมาณเฟจลดลงที่ค่า pH 3, 11 และ 12 ในขณะที่เฟจ Φ C106 มีความเสถียรที่ค่า pH ตั้งแต่ 5 - 10 และมีปริมาณลดลงที่ค่า pH 11 - 12 แต่สามารถถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ที่ค่า pH 2 - 4 สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่กล่าวว่า ความเป็นกรดส่งผลต่อโครงสร้างโปรตีนของเฟจ ได้แก่ หัวและหางของเฟจรวมทั้งอาจทำให้โครงสร้างของดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไปอีกด้วย⁽¹²³⁾

ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเฟจ ทำการศึกษาในอาหาร NB และ skim milk โดยศึกษาที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าเฟจ Φ C106, Φ 21A และ Φ TS11 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4 - 45 องศาเซลเซียส ทั้งในอาหาร NB และ skim milk เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ที่ 65, 75 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ พบว่าเฟจ Φ 21A และ Φ TS11 มีปริมาณลดลง ตั้งแต่ 2 - 6 log PFU/mL ทั้งในอาหาร NB และ skim milk ในขณะที่เฟจ Φ C106 ถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ในอาหาร NB ที่อุณหภูมิดังกล่าว แตกต่างกับผลการทดสอบในอาหาร skim milk ที่พบว่าเฟจ Φ C106 ยังคงอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ อย่างไรก็ตาม เฟจทั้งสาม

ตัวสามารถยับยั้งได้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ในกรณีที่ใช้เฟจ Φ C106 สามารถทนต่ออุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ได้นั้น สอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่า เฟจ UFJF_PfDIW6 และ UFJF_PfSW ที่ติดเชื้อใน *P. fluorescens* สามารถทนต่ออุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ได้⁽¹⁵⁰⁾ นอกจากนี้เฟจจะสามารถอยู่รอดได้ในอาหาร skim milk มากกว่าอาหาร NB เนื่องจากในอาหาร skim milk มีองค์ประกอบของโปรตีนเคซีน ซึ่งจะช่วยปกป้องเฟจจากความร้อนได้ สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่กล่าวว่ามีองค์ประกอบของโปรตีน จึงสามารถปกป้องเฟจจากความร้อนได้ แตกต่างจากอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือหรือไขมันสูงที่ไม่สามารถช่วยให้เฟจทนกับอุณหภูมิสูงได้⁽¹⁵¹⁾ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเฟจ Φ C106, Φ 21A และ Φ TS11 มีความเสถียรในช่วงกว้างทั้งอุณหภูมิและ pH ซึ่งเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ ในรูปแบบ phage therapy ที่สภาวะแวดล้อมต่าง ๆ⁽¹⁵²⁾

ผลการศึกษารายับยั้งเชื้อ *P. mosselii* C24 โดยเฟจ Φ C106 และ Φ 21A ในรูปแบบเดี่ยวและแบบผสม และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ในอาหาร NB และ skim milk ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง สรุปได้ดังตาราง 24 จากผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะพบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและกิจกรรมการสร้างเอนไซม์โปรติ-เอสที่สูงที่สุดรวมทั้งพบว่าเฟจสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและลดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิดังกล่าวเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามจำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นการลดจำนวนแบคทีเรียจึงส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสลดลงด้วย โดยกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้เฟจทั้งในรูปแบบเดี่ยวหรือรูปแบบผสม นอกจากนี้ในชุดทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมเฟจ และบ่มที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส พบว่าถึงแม้เชื้อแบคทีเรียจะมีการเพิ่มจำนวน แต่กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสกลับไม่เพิ่มสูงขึ้นตามจำนวนเชื้อแบคทีเรีย จึงส่งผลให้เมื่อใช้เฟจในการยับยั้งเชื้อมีการลดลงของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการทดลองที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ดังนั้นอุณหภูมิต่ำยังคงเป็นวิธีการที่แนะนำในการเก็บรักษานมดิบเพื่อลดจำนวนแบคทีเรียและลดการสร้างเอนไซม์โปรติเอสที่ร้อน สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่กล่าวไว้ที่อุณหภูมิต่ำส่งผลให้อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและการสร้างเอนไซม์ AprX ลดต่ำลงและถึงแม้ว่าจะมีการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวขึ้นมาแต่กิจกรรมของเอนไซม์ยังคงมีค่าต่ำ⁽¹⁵³⁾ ดังนั้น การทำความเข้าใจเบื้องต้นให้เร็วที่สุดจึงมีความสำคัญอย่างมากในการเก็บรักษานมดิบ

อย่างไรก็ตาม หลังจากบ่มเชื้อร่วมกับเฟจในระยะเวลาที่นานขึ้นจะเกิดการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่ติดต่อเฟจ ซึ่งควรส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสกลับมาเพิ่มสูงขึ้น แต่จาก

การศึกษาลบพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อบ่มเชื้อร่วมกับเพจยังคงน้อยกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมเพจลงไป (โดยเทียบจำนวนเชื้อในปริมาณที่เท่ากัน) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เพจมีแนวโน้มในการนำมาใช้ในการควบคุมการสร้างเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Pseudomonas* ในนมดิบ ทั้งนี้สมมติฐานดังกล่าวยังคงต้องได้รับการยืนยันในการศึกษาอื่นต่อไป

ตาราง 24 สรุปผลการทดลองของเชื้อ *P. mosselii* และกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสโดยเพจ ΦC106 และ Φ21A ในรูปแบบเดี่ยวและแบบผสม

เพจ	ระดับการปนเปื้อน	อาหาร	อุณหภูมิ	เวลา (ชม.)	จำนวนแบคทีเรียที่ลดลง		เวลา (ชม.)	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ลดลง (unit)
					อุณหภูมิ	(log CFU/mL)		
ΦC106	ต่ำ	NB	30°C	16	2.41 ± 0.06	30°C	72	0.00882 ± 0.00138
		Skim milk	30°C	8	2.59 ± 0.11	30°C	48	0.01539 ± 0.00182
	สูง	NB	10°C	16	4.55 ± 0.11	30°C	8	0.00841 ± 0.00031
		Skim milk	4°C	16	3.24 ± 0.31	30°C	16	0.01298 ± 0.00005
Φ21A	ต่ำ	NB	30°C	8	2.70 ± 0.19	30°C	16	0.01247 ± 0.00020
		Skim milk	30°C	8	2.78 ± 0.10	30°C	48	0.01008 ± 0.00060
	สูง	NB	30°C	8	4.05 ± 0.13	30°C	16	0.01287 ± 0.00056
		Skim milk	30°C	8	4.92 ± 0.18	30°C	72	0.01060 ± 0.00049
เพจผสม	ต่ำ	NB	30°C	8	3.15 ± 0.20	30°C	72	0.00992 ± 0.00073
		Skim milk	30°C	48	2.97 ± 0.13	30°C	72	0.00814 ± 0.00147
	สูง	NB	30°C	8	3.38 ± 0.13	30°C	16	0.01024 ± 0.00032
		Skim milk	30°C	8	5.92 ± 0.16	30°C	72	0.00145 ± 0.00145

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD

ในปัจจุบันยังคงมีการศึกษาไม่มากนักที่รายงานเกี่ยวกับการลดจำนวนของ *Pseudomonas* โดยใช้เพจในนมดิบ โดยจากการศึกษาของ Tanaka และคณะ (2018)⁽¹⁰⁶⁾ พบว่า เพจ HU1 สามารถลดจำนวนของ *P. lactis* ได้ทั้งในอาหาร skim milk และ whole milk และจากการศึกษาของ Hu และคณะ (2016)⁽¹⁵⁴⁾ รายงานว่าการใช้เพจในรูปแบบผสม ส่งผลในยับยั้ง *Pseudomonas* ได้ 2 log CFU/mL ในนมยูเอชทีที่เติมเชื้อ *Pseudomonas* ลงไป รวมทั้งจากการศึกษาของ do Nascimento และคณะ (2022)⁽¹⁵⁰⁾ ที่รายงานว่าไลติกเพจ 2 ตัว ได้แก่ เพจ UFJF_PfDIW6 และ UFJF_PfSW6 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. fluorescens* และกิจกรรม

การย่อยโปรตีนที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียในนมดิบได้ จากการศึกษาของผู้วิจัยนี้จึงช่วยสนับสนุนในการใช้เฟจไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมเชื้อ *Pseudomonas* ในนมดิบ ซึ่งไม่เพียงแต่จะสามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้เท่านั้น แต่ยังสามารถยับยั้งกิจกรรมการย่อยโปรตีนของเอนไซม์โปรติเอสในนมดิบได้อีกด้วย

จากการศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของเชื้อ *P. mosselii* C24 ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด และถูกเลือกนำมาใช้เป็นโฮสต์ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* ในระดับห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเฟจ ΦC106 และ Φ21A สามารถติดเชื้อในโฮสต์ดังกล่าวจึงสามารถนำไปพัฒนาการยับยั้งเชื้อโดยใช้เฟจในรูปแบบผสมได้ จากผลการวิเคราะห์ลำดับจีโนมทั้งหมดพบว่าเชื้อ *P. mosselii* C24 มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 5,754,740 คู่เบส และมี G+C content เท่ากับ 64.4 เปอร์เซ็นต์ จากการหาตำแหน่งและระบุหน้าที่ของยีนพบว่าประกอบด้วย ORF จำนวน 5,253 ORFs และพบยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์โปรติเอสทั้งหมด 11 ยีน โดยเชื้อ *P. mosselii* C24 มีการตรวจพบยีนต้านยาปฏิชีวนะคือ resistance - nodulation division (RND) antibiotic efflux pump ส่งผลให้เชื้อดังกล่าวสามารถต้านยาปฏิชีวนะได้หลากหลายชนิด ได้แก่ fluoroquinolone, tetracycline, cephalosporin, glycylcycline, penam, oxazolidinone, glycopeptide, rifamycin และ phenicol นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบ virulence factor ได้แก่ ยีน *mbtH* - like ซึ่งเป็นยีนที่จำเป็นในการสังเคราะห์องค์ประกอบผนังเซลล์ของเชื้อ *Mycobacterium*⁽¹⁵⁵⁾ และยีน *hsc1/vipB* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของระบบ Type VI Secretion และมีบทบาทสำคัญในการปลดปล่อย toxin⁽¹⁵⁶⁾ นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบ prophage บนจีโนมทั้งหมด 10 ตำแหน่ง อย่างไรก็ตามไม่พบพลาสมิดในจีโนมของเชื้อ ซึ่งจากการศึกษานี้ถือเป็นการศึกษาครั้งแรกในการรายงานจีโนมทั้งหมดของเชื้อ *P. mosselii* โดย *P. mosselii* ถูกจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ในปี 2022 โดยการสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree ผ่านยีน 16S rDNA, oprF และ oprD ซึ่งเดิมจัดอยู่ในสปีชีส์ *P. putida*⁽⁴³⁾

จากการศึกษาลำดับจีโนมทั้งหมดของเฟจ ΦC106 และ Φ21A ที่ถูกใช้ในการทดสอบยับยั้ง *Pseudomonas* ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าเฟจ ΦC106 และ Φ21A มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ มีความยาว 36,127 และ 39,716 คู่เบส และมี G+C content เท่ากับ 56.83 และ 59.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพประกอบ 28) ผลจากการเปรียบเทียบจีโนมของเฟจกับฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับพันธุกรรมทุก node ของเฟจ ΦC106 มีความเหมือนกันมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ กับเฟจ UNO-SLW1 นอกจากนี้ยังพบว่า มี 2 node ที่แสดงความเหมือนกันมากกว่า

78 เปอร์เซ็นต์ กับเฟจ PPpW-4 โดยเฟจ UNO-SLW1 และ PPpW-4 มีรายงานว่าเป็นเฟจที่พบใน *Pseudomonas* และจัดอยู่ในแฟมิลี *Podoviridae* เช่นเดียวกัน^(157, 158) จากการศึกษาครั้งนี้ถือเป็นการศึกษาแรกในการคัดแยกเฟจจาก *P. mosselii* โดยไม่พบการรายงานเกี่ยวกับเฟจของ *P. mosselii* มาก่อน อย่างไรก็ตามพบว่า *P. mosselii* เป็นสปีชีส์ที่แยกมาจาก *P. putida* ดังที่ได้กล่าวไป ซึ่งเฟจของ *P. putida* มีการศึกษาและรายงานมาก่อนแล้ว และพบว่าจัดอยู่ในแฟมิลี *Podoviridae* และ *Myoviridae* เช่นเดียวกับ ΦC106 และ Φ21A โดยงานวิจัยของ Shaburova และคณะ (2009)⁽¹⁵⁹⁾ สามารถคัดแยกเฟจของ *P. putida* ได้ทั้งหมด 5 ตัว ได้แก่ เฟจ af, pf16, Φ2f, Φ15 และ Φ27 โดย Φ15, Φ27 และ Φ2f จัดอยู่ในแฟมิลี *Podoviridae* และเฟจ pf16 จัดอยู่ในแฟมิลี *Myoviridae* และงานวิจัยของ Lee และคณะ (1966)⁽¹⁶⁰⁾ สามารถคัดแยกเฟจ gh-1 จากเชื้อ *P. putida* ซึ่งจัดอยู่ในแฟมิลี *Podoviridae* จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเฟจ ΦC106 และ Φ21A สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tanaka และคณะ (2018)⁽¹⁰⁶⁾ ที่รายงานว่าเฟจที่แยกได้จากเชื้อในกลุ่ม *P. fluorescens* และจัดอยู่ในแฟมิลี *Podoviridae* มีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 39 - 50 กิโลเบส จากการหาตำแหน่งและหน้าที่ของยีน เฟจ ΦC106 และ Φ21A พบว่ามี 45 และ 52 ORFs โดยพบส่วนที่สามารถระบุหน้าที่ของโปรตีนได้เท่ากับ 15 และ 18 ORFs ตามลำดับ นอกจากนี้เฟจทั้งสองยังไม่มี ORFs ที่เกี่ยวข้องกับโปรตีน toxin, antibiotic resistant gene (ARGs) และ virulence factors (VFs) อีกทั้งเฟจทั้งสองยังไม่พบโปรตีนที่จำเป็นต่อ lysogenic cycle ได้แก่ ยีนที่แสดงออกให้ โปรตีน integrase, recombinase, repressor, anti-repressor protein และ excisionase และจากผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม phageAI ยังยืนยันได้ว่าเฟจ ΦC106 และ Φ21A จัดเป็น virulent phage ซึ่งจากการวิเคราะห์จีโนมของเฟจทั้งสองตัว จะเห็นได้ว่า เฟจทั้งสองตัวสามารถนำไปใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ เพื่อยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas* ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในนมได้อย่างปลอดภัย

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มของเฟจ ΦC106 และ Φ21A โดยอาศัยยีน terminase large subunit ซึ่งแสดงออกเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการบรรจุดีเอ็นเอเข้าสู่ส่วนหัวของเฟจ ยีนดังกล่าวเป็นยีนที่พบในเฟจที่มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่⁽¹⁶¹⁾ โดยยีนที่มีรายงานในการจัดกลุ่มเฟจ ได้แก่ major capsid, terminase large subunit, replicative helicase, transposase protein, tail fiber protein โดยจากงานวิจัยของ Magill และคณะ (2017)⁽¹⁶²⁾ จัดจำแนกเฟจของ *P. putida* ผ่านการสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree โดยใช้ยีน major capsid, terminase large subunit และ replicative helicase เช่นเดียวกับการศึกษาของ Cui และคณะ (2020)⁽¹⁶³⁾ ที่มีการจัดกลุ่มเฟจผ่านการสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree โดย

ใช้ยีน transposase protein, terminase large subunit, capsid protein และ tail fiber protein พบว่าสามารถจัดกลุ่มเฟจของ *Pseudomonas* ออกจากเฟจของโฮสต์แบคทีเรียอื่น ได้แก่ *Rhodobacter*, *Rhizobium*, *Escherichia* และ *Vibrio* รวมทั้งการศึกษาของ Necel และคณะ (2022)⁽¹⁶⁴⁾ ที่สามารถจัดจำแนกเฟจในกลุ่มของ *Pseudomonas* ออกจากเฟจของ *Xanthomonas* และ *Escherichia* ได้ โดยใช้ลำดับอะมิโนของ terminase large subunit ในการสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor-joining จากรายงานวิจัยต่าง ๆ จะเห็นได้ว่ายีน terminase large subunit เป็นยีนที่นิยมใช้ในการจัดกลุ่มเฟจ ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกใช้ยีน terminase large subunit ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มเฟจ จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการจัดกลุ่มโดยใช้วิธี Neighbor - joining พบว่าเฟจ Φ C106 และ Φ 21A มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Pseudomonas* phage UNO-SLW1 มากที่สุด โดยมีค่าความเชื่อมั่น bootstrap เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *Pseudomonas* phage PppW - 4 มีความสัมพันธ์ห่างจากเฟจ Φ 21A ไปอยู่บนกิ่งอื่น จากภาพแผนภูมิ phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่ายีน terminase large subunit สามารถใช้จำแนกเฟจในกลุ่มของ *Pseudomonas* ออกจากเฟจของแบคทีเรียอื่นที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Pseudomonas* ได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงช่วยยืนยันได้ว่ายีน terminase large subunit สามารถใช้ในวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มเฟจที่มีโฮสต์แตกต่างกันได้



บรรณานุกรม





ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	รินรตรี วงศ์อยู่
วัน เดือน ปี เกิด	14 สิงหาคม 2539
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดระยอง
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2554 ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนแกลง "วิทยสถานาร" พ.ศ. 2557 ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนระยองวิทยาคม พ.ศ. 2562 วท.บ. (จุลชีวะวิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ พ.ศ. 2565 วท.ม. (จุลชีวะวิทยาประยุกต์) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน ผลงานตีพิมพ์	22 ซอยสุนทรภู่ 7 ตำบลทางเกวียน อำเภอแกลง จังหวัดระยอง 21110 Wongyoo R, Sunthornthummas S, Sawaengwong T, Surachat K, Rangsiruji A, Atitthep T, Sarawaneeyaruk S, Doi K, Nantavisai K, Insian K, Pomwised R, Pringsulaka O. Isolation of bacteriophages specific to <i>Pseudomonas mosselii</i> for controlling milk spoilage. Int Dairy J. In press. Wongyoo R, Sunthornthummas S, Surachat K, Atitthep T, Sarawaneeyaruk S, Pringsulaka O. Isolation and characterization of lytic <i>Pseudomonas fluorescens</i> bacteriophage isolated from milk. JCST. In press.

1. Foreign agriculture service. U.S. Department of Agriculture: Dairy: World Markets and Trade [internet]; 2021 [cited 2021 Nov 1]. Available from:
<https://www.fas.usda.gov/data/dairy-world-markets-and-trade>
2. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. แผนปฏิบัติการด้านโคนมและผลิตภัณฑ์นม ระยะที่ 1 (พ.ศ.2561-2570) [internet]. ; 2563 [เข้าถึงเมื่อ 10 พฤศจิกายน 2564]. เข้าถึงได้จาก:
<https://biotech.dld.go.th/webnew/Data/School-Milk/09082563.pdf>
3. กองอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 420) พ.ศ. 2563 [internet]; 2563 [เข้าถึงเมื่อ 10 พฤศจิกายน 2564]. เข้าถึงได้จาก: http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_moph/P420.pdf
4. Vithanage NR, Yeager TR, Jadhav SR, Palombo EA, Datta N. Comparison of identification systems for psychrotrophic bacteria isolated from raw bovine milk. *Int J Food Microbiol.* 2014;189:26-38.
5. Graf B, Kohler E, Rosenberger M, Schäfer J, Hinrichs J. Shelf-stable milk produced by microfiltration and microwave heating: Effects of processing and storage. *J Food Eng.* 2021;311:110734.
6. Nakai T, Park SC. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Res Microbiol.* 2002;153(1):13-8.
7. Almeida A, Cunha A, Gomes NC, Alves E, Costa L, Faustino MA. Phage therapy and photodynamic therapy: Low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. *Mar Drugs.* 2009;7(3):268-313.
8. Bruttin A, Brüssow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: A safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(7):2874-8.
9. Chhibber S, Kaur S, Kumari S. Therapeutic potential of bacteriophage in treating *Klebsiella pneumoniae* b5055-mediated lobar pneumonia in mice. *J Med Microbiol.* 2008;57(Pt 12):1508-13.
10. Gutiérrez D, Rodríguez-Rubio L, Martínez B, Rodríguez A, García P. Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Front Microbiol.* 2016;7:825.

11. Simões LC, Lemos M, Pereira AM, Abreu AC, Saavedra MJ, Simões M. Persister cells in a biofilm treated with a biocide. *Biofouling*. 2011;27(4):403-11.
12. Milk facts.Milk composition [internet]. 2021 [cited 2021 Sep 15]. Available from: <http://milkfacts.info/Milk%20Composition/Milk%20Composition%20Page.htm>
13. Safefood.Net. A review of the milk supply chain [internet]; 2008 [cited 2021 Nov 10]. Available from: https://www.safefood.net/getmedia/55d3f2c2-64c9-4f8f-8599-c86e68b9dbf2/safefood_dairy_report_web_version.aspx?ext=.pdf
14. Meunier-Goddik L, Sandra S. Liquid milk products: Pasteurized milk. In: Fuquay j w, editor. *Encyclopedia of Dairy Sciences* Massachusetts: Academic Press;. 2011:274-80.
15. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. นมโค [internet]; 2563 [เข้าถึงเมื่อ 10 พฤศจิกายน 2564]. เข้าถึงได้จาก: <http://food.fda.moph.go.th/Rules/dataRules/3-PreManualCowMilk.pdf>
16. H B. *Ultra-high-temperature processing of milk and milk products*. London. Elsevier Applied Science. 1988.
17. กองอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข; 2549 [เข้าถึงเมื่อ 10 พฤศจิกายน 2564]. เข้าถึงได้จาก: http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_moph/P298.pdf
18. Techer M-C, Baron F, Jan S. Microbial milk spoilage. In: Robinson RK, editor. *Encyclopedia of Food Microbiol* Massachusetts: Academic Press 1999.
19. Law BA, Andrews AT, Sharpe ME. Gelation of ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. *J Dairy Res*. 1977;44(1):145-8.
20. de Oliveira GB, Favarin L, Luchese RH, McIntosh D. Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? *Braz J Microbiol*. 2015;46(2):313-21.
21. Teh K, Flint S, Bremer P. Raw milk quality influenced by biofilms and the effect of biofilm growth on dairy product quality. In: Teh KH, Flint S, Brooks J, Knight G. *Biofilms in the Dairy Industry*. USA: John Wiley & Sons, Ltd; 2015. p. 65-98.

22. Lafarge V, Ogier J-C, Girard V, Maladen V, Leveau J-Y, Gruss A, et al. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(9):5644-50.
23. Quigley L, McCarthy R, O'Sullivan O, Beresford TP, Fitzgerald GF, Ross RP, et al. The microbial content of raw and pasteurized cow milk as determined by molecular approaches. *J Dairy Sci.* 2013;96(8):4928-37.
24. Marchand S, Heylen K, Messens W, Coudijzer K, De Vos P, Dewettinck K, et al. Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from belgian raw milk samples. *Environ Microbiol.* 2009;11(2):467-82.
25. Muehlherr JE, Zweifel C, Corti S, Blanco JE, Stephan R. Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in switzerland. *J Dairy Sci.* 2003;86(12):3849-56.
26. Angelidis A. The microbiology of raw milk. In: Papademas P., editor. *Dairy Microbiology: A Practical Approach*. Florida: CRC Press; 2014. p. 22-68.
27. Griffiths MW, Phillips JD, Muir DD. Effect of low-temperature storage on the bacteriological quality of raw milk. *Food Microbiol.* 1987;4(4):285-91.
28. Celestino EL, Iyer M, Roginski H. Reconstituted uht-treated milk: Effects of raw milk, powder quality and storage conditions of UHT milk on its physico-chemical attributes and flavour. *Int Dairy J.* 1997;7(2):129-40.
29. Yuan L, Sadiq FA, Burmølle M, Wang NI, He G. Insights into psychrotrophic bacteria in raw milk: A review. *J Food Prot.* 2019;82(7):1148-59.
30. Samarzija D, Zamberlin Š, Pogacic T. Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality. *Mljekarstvo.* 2012;62:77-95.
31. Chen L, Daniel RM, Coolbear T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *Int Dairy J.* 2003;13(4):255-75.
32. Franzetti L, Scarpellini M. Characterisation of *Pseudomonas* spp. Isolated from foods. *Ann Microbiol.* 2007;57(1):39-47.

33. Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, et al. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;37(5):664-98.
34. Munsch-Alatossava P, Alatossava T. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. *Microbiol Res.* 2006;161(4):334-46.
35. Meng L, Zhang Y, Liu H, Zhao S, Wang J, Zheng N. Characterization of *Pseudomonas* spp. And associated proteolytic properties in raw milk stored at low temperatures. *Front Microbiol.* 2017;8(2158).
36. De Jonghe V, Coorevits A, Van Hoorde K, Messens W, Van Landschoot A, De Vos P, et al. Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(2):460-70.
37. Dogan B, Boor KJ. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. Isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(1):130-8.
38. Sillankorva S, Neubauer P, Azeredo J. *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiBB-PF7A. *BMC Biotechnol.* 2008;8(1):79.
39. von Neubeck M, Baur C, Krewinkel M, Stoeckel M, Kranz B, Stressler T, et al. Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *Int J Food Microbiol.* 2015;211:57-65.
40. Caldera L, Franzetti L, Van Coillie E, De Vos P, Stragier P, De Block J, et al. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. Isolated from different foods. *Food Microbiol.* 2016;54:142-53.
41. Zhang Y, Chen P, Ye G, Lin H, Ren D, Guo L, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas parafulva* PRS09-11288, a biocontrol strain produces the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid. *Curr Microbiol.* 2019;76(9):1087-91.
42. Chabeaud P, de Groot A, Bitter W, Tommassen J, Heulin T, Achouak W. Phase-variable expression of an operon encoding extracellular alkaline protease, a serine protease homolog, and lipase in *Pseudomonas brassicacearum*. *J Bacteriol.* 2001;183(6):2117-20.

43. Dabboussi F, Hamze M, Singer E, Geoffroy V, Meyer JM, Izard D. *Pseudomonas mosselii* sp. Nov., a novel species isolated from clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52(Pt 2):363-76.
44. Giani T, Marchese A, Coppo E, Kroumova V, Rossolini GM. Vim-1-producing *Pseudomonas mosselii* isolates in Italy, predating known Vim-producing index strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(4):2216-7.
45. Zhuo T, Chen S, Wang D, Fan X, Zhang X, Zou H. Expression of the *ripAA* gene in the soilborne *Pseudomonas mosselii* can promote the control efficacy against tobacco bacterial wilt. *Biology (Basel).* 2022;11(8).
46. Wilkinson M, Kilcawley K. Mechanism of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *Int Dairy J.* 2005;15:817-30.
47. Fox PF, Kelly AL. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—part 1. *Int Dairy J.* 2006;16(6):500-16.
48. Deeth HC. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. *Int Dairy J.* 2006;16(6):555-62.
49. Bastian ED, Brown RJ. Plasmin in milk and dairy products: An update. *Int Dairy J.* 1996;6(5):435-57.
50. Lafarge V, Ogier J-C, Girard V, Maladen V, Leveau J-Y, Gruss A, et al. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl Environ.* 2004;70(9):5644-50.
51. Fairbairn DJ, Law BA. Proteinases of psychrotrophic bacteria: Their production, properties, effects and control. *J Dairy Res.* 1986;53(1):139-77.
52. Chopra AK, Mathur DK. Isolation, screening and characterization of thermophilic *Bacillus* species isolated from dairy products. *J Appl Bacteriol.* 1984;57(2):263-71.
53. Chen T, Wei Q, Chen YJ. *Pseudomonas* spp. and *Hafnia alvei* growth in UHT milk at cold storage. *Food Cont.* 2011;22:697-701.
54. Adams DM, Barach JT, Speck ML. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J Dairy Sci.* 1975;58(6):828-34.

55. Liao CH, McCallus DE. Biochemical and genetic characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. *Appl and environ microbiol.* 1998;64(3):914-21.
56. Duong F, Bonnet E, Géli V, Lazdunski A, Murgier M, Filloux A. The aprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: A new substrate for the apr type I secretion system. *Gene.* 2001;262(1-2):147-53. eng. 2001/02/17.
57. Woods RG, Burger M, Beven CA, Beacham IR. The *aprX-lipA* operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: A molecular analysis of metalloprotease and lipase production. *Microbiol.* 2001;147(Pt 2):345-54.
58. Stoeckel M, Lidolt M, Achberger V, Glück C, Krewinkel M, Stressler T, et al. Growth of *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas* sp. In raw milk: Impact of residual heat-stable enzyme activity on stability of UHT milk during shelf-life. *Int Dairy J.* 2016;59.
59. Zhang C, Bijl E, Svensson B, Hettinga K. The extracellular protease AprX from *Pseudomonas* and its spoilage potential for UHT milk: A review. *Compr Rev Food Sci and Food Saf.* 2019;18(4):834-52.
60. Ahn JH, Pan JG, Rhee JS. Identification of the tliDEF ABC transporter specific for lipase in *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. *J bacteriol.* 1999;181(6):1847-52.
61. Ma Q, Zhai Y, Schneider JC, Ramseier TM, Saier MH, Jr. Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1611(1-2):223-33.
62. Marchand S, Vandriesche G, Coorevits A, Coudijzer K, De Jonghe V, Dewettinck K, et al. Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. *Int J Food Microbiol.* 2009;133(1-2):68-77.
63. Dufour D, Nicodème M, Perrin C, Driou A, Brusseau E, Humbert G, et al. Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. Isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them. *Int J Food Microbiol.* 2008;125(2):188-96.

64. Ertan H, Cassel C, Verma A, Poljak A, Charlton T, Aldrich-Wright J, et al. A new broad specificity alkaline metalloprotease from a *Pseudomonas* sp. Isolated from refrigerated milk: Role of calcium in improving enzyme productivity. *J Mol Catal B: Enzym.* 2015;113:1-8.
65. Marchand S, Duquenne B, Heyndrickx M, Coudijzer K, De Block J. Destabilization and off-flavors generated by *Pseudomonas* proteases during or after UHT-processing of milk. *Int J Food Contam.* 2017;4(1):2.
66. Kroll S, Klostermeyer H. Heat inactivation of exogenous proteinases from *Pseudomonas fluorescens*. I. Possibility of inactivation in milk. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1984;179(4):288-95.
67. Baur C, Krewinkel M, Kranz B, von Neubeck M, Wenning M, Scherer S, et al. Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *Int Dairy J.* 2015;49:23-9.
68. Baglinière F, Matéos A, Tanguy G, Jardin J, Briard-Bion V, Rousseau F, et al. Proteolysis of ultra high temperature-treated casein micelles by AprX enzyme from *Pseudomonas fluorescens* F induces their destabilisation. *Int Dairy J.* 2013;31(2):55-61.
69. Samarzija D, Zamberlin Š, Pogacic T. Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. *Mljekarstvo.* 2012;62:77-95.
70. Bedeltavana A, Haghkhah M. Phenotypic characterization and PCR-ribotyping of *Pseudomonas fluorescens* isolates, in tracking contamination routes in the production line of pasteurized milk. *Iran J Vet Res.* 2010;11.
71. Chove L, Grandison A, Michael L. Detection of proteolysis in milk by *Pseudomonas fluorescens* using urea page method. *J Food Stud.* 2017;7:14.
72. Zhang S, Lv J. Purification and properties of heat-stable extracellular protease from *Pseudomonads fluorescens* BJ-10. *J Food Sci Technol.* 2014;51(6):1185-90.
73. Martin NH, Boor KJ, Wiedmann M. Symposium review: Effect of post-pasteurization contamination on fluid milk quality. *J Dairy Sci.* 2018;101(1):861-70.

74. Alves MP, Salgado RL, Eller MR, Dias RS, Oliveira de Paula S, Fernandes de Carvalho A. Temperature modulates the production and activity of a metalloprotease from *Pseudomonas fluorescens* 07A in milk. *J Dairy Sci.* 2018;101(2):992-9. eng.
75. Němečková I, Pechacova M, Roubal P. Problems with detection of proteolytic microorganisms and their undesirable activities in milk. *Czech J Food Sci.* 2009;27:S282-S9.
76. Frazier William C, Rupp P. Studies on the proteolytic bacteria of milk iii. Action of proteolytic bacteria of milk on casein and gelatin. *J Bacteriol.* 1928;16(3):187-96.
77. Charney J, Tomarelli RM. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J Biol Chem.* 1947;171 2:501-5.
78. Cathcart J. Assessment of matrix metalloproteinases by gelatin zymography. *Methods Mol Biol.* 2016;1406:151-9.
79. Ranzato E, Martinotti S, Volante A, Tava A, Masini MA, Burlando B. The major *Boswellia serrata* active 3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid strengthens interleukin-1 α upregulation of matrix metalloproteinase-9 via JNK map kinase activation. *Phytomedicine.* 2017;36:176-82.
80. Leber TM, Balkwill FR. Zymography: A single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal Biochem.* 1997;249(1):24-8.
81. Cowan MK, Smith H. *Microbiology fundamentals : A clinical approach.* 3rd ed. New York: McGraw-Hill Education; 2019.
82. White H, Orlova EV. Bacteriophages: Their structural organisation and function. In: *Bacteriophage - biology and application.* London: IntechOpen; 2019.
83. Ackermann HW. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Arch Virol.* 2001;146:843-57.
84. García-Anaya MC, Sepulveda DR, Sáenz-Mendoza AI, Rios-Velasco C, Zamudio-Flores PB, Acosta-Muñiz CH. Phages as biocontrol agents in dairy products. *Trends Food Sci Technol.* 2020;95:10-20.

85. ภัทรสินไพบูรณ์ ณ. การคัดแยกและการศึกษาลักษณะของเฟจของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากนมในประเทศไทย [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ. บัณฑิตวิทยาลัย: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ; 2552.
86. Kasman LM, Kasman A, Westwater C, Dolan J, Schmidt MG, Norris JS. Overcoming the phage replication threshold: A mathematical model with implications for phage therapy. *J Virol.* 2002;76(11):5557-64.
87. Kutter E, Kuhl S, Alavidze Z, Blasdel B. Phage therapy: Bacteriophages as natural, self-limiting antibiotics. In: Pizzorno, JE, Murray MT, editors. *Textbook of Natural Medicine.* London: Elsevier; 2012. p. 945-56.
88. Nobrega FL, Vlot M, de Jonge PA, Dreesens LL, Beaumont HJE, Lavigne R, et al. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(12):760-73.
89. Dowah ASA, Clokie MRJ. Review of the nature, diversity and structure of bacteriophage receptor binding proteins that target Gram-positive bacteria. *Biophys Rev.* 2018;10(2):535-42.
90. Elbreki M, Ross RP, Hill C, O'Mahony J, McAuliffe O, Coffey A. Bacteriophages and their derivatives as biotherapeutic agents in disease prevention and treatment. *J Viruses.* 2014;2014:382539.
91. Bertozzi Silva J, Storms Z, Sauvageau D. Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiol Lett.* 2016;363(4).
92. Rakhuba DV, Kolomiets EI, Dey ES, Novik GI. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Pol J Microbiol.* 2010;59(3):145-55.
93. Smith-caldas m, herren c. The viral life cycle. [internet] 2021 [cited 2021 Nov 10]. Available from: <https://cnx.org/contents/kxd8RhSc@1.9:9xIjOPZi@1/The-Viral-Life-Cycle>
94. McKane LKJ. *Microbiology : Essentials and applications.* New York: McGraw-Hill; 1996.

95. Ellis EL, Delbrück M. The growth of bacteriophage. *J Gen Physiol.* 1939;22(3):365-84. eng.
96. Adams MH. *Bacteriophages.* New York: Interscience Publishers; 1959.
97. Prescott LM HJ, Klein DN. *Microbiology.* New York: The McGraw-Hill Companies, Inc; 1999.
98. Brüssow H, Desiere F. Comparative phage genomics and the evolution of *Siphoviridae*: Insights from dairy phages. *Mol Microbiol.* 2001;39(2):213-22.
99. Lucchini S, Desiere F, Brüssow H. Comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* phage species supports a modular evolution theory. *J Virol.* 1999;73(10):8647-56.
100. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi x174 DNA. *Nature.* 1977;265(5596):687-95.
101. Sanger F, Coulson AR, Hong GF, Hill DF, Petersen GB. Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *J Mol Biol.* 1982;162(4):729-73.
102. Ackermann HW, Kropinski AM. Curated list of prokaryote viruses with fully sequenced genomes. *Res Microbiol.* 2007;158(7):555-66.
103. Toussaint A, Lima-Mendez G, Leplae R. Phigo, a phage ontology associated with the ACLAME database. *Res Microbiol.* 2007;158(7):567-71.
104. O'Sullivan L, Bolton D, McAuliffe O, Coffey A. Bacteriophages in food applications: From foe to friend. *Annu Rev Food* 2019;10:151-72.
105. Fernández L, González S, Campelo AB, Martínez B, Rodríguez A, García P. Downregulation of autolysin-encoding genes by phage-derived lytic proteins inhibits biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(5).
106. Tanaka C, Yamada K, Takeuchi H, Inokuchi Y, Kashiwagi A, Toba T. A lytic bacteriophage for controlling *Pseudomonas lactis* in raw cow's milk. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(18).

107. Tahir A, Asif M, Abbas Z, Rehman S. Three bacteriophages SA, SA2 and SNAF can control growth of milk isolated staphylococcal species. *Pak J Zool.* 2017;49:493-6.
108. O'Flaherty S, Coffey A, Meaney WJ, Fitzgerald GF, Ross RP. Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk. *Lett Appl Microbiol.* 2005;41(3):274-9.
109. McLean SK, Dunn LA, Palombo EA. Phage inhibition of *Escherichia coli* in ultrahigh-temperature-treated and raw milk. *Foodborne Pathog Dis.* 2013;10(11):956-62.
110. Ly-Chatain M. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Front microbiol.* 2014; 5: 51. 2014.
111. Guenther S, Huwyler D, Richard S, Loessner MJ. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(1):93-100.
112. Misiou O, van Nassau TJ, Lenz CA, Vogel RF. The preservation of *Listeria*-critical foods by a combination of endolysin and high hydrostatic pressure. *Int J Food Microbiol.* 2018;266:355-62.
113. Jończyk E, Kłak M, Międzybrodzki R, Górski A. The influence of external factors on bacteriophages-review. *Folia Microbiol.* 2011;56(3):191-200.
114. Clark WA. Comparison of several methods for preserving bacteriophages. *Appl Microbiol.* 1962;10(5):466-71.
115. Sharp DG, Hook AE, et al. Sedimentation characters and ph stability of the T2 bacteriophage of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1946;165(1):259-70.
116. Tsutsaeva AA, Bysekantsev IP, Mikulinskiĭ Iu E, Butenko AE. Effect of low temperatures of the survival and intracellular multiplication of *Escherichia coli* bacteriophages. *Mikrobiologĭia.* 1981;50(2):292-4.
117. Thorne CB, Holt SC. Cold lability of *Bacillus cereus* bacteriophage CP-51. *J Virol.* 1974;14(4):1008-12.

118. Jepson CD, March JB. Bacteriophage lambda is a highly stable DNA vaccine delivery vehicle. *Vaccine*. 2004;22(19):2413-9.
119. Lin L, Hong W, Ji X, Han J, Huang L, Wei Y. Isolation and characterization of an extremely long tail *Thermus* bacteriophage from tengchong hot springs in china. *J Basic Microbiol*. 2010;50(5):452-6.
120. Kerby GP, Gowdy RA, Dillon ES, Dillon ML, Csáky TZ, Sharp DG, et al. Purification, ph stability and sedimentation properties of the T₇ bacteriophage of *Escherichia coli*. *J Immunol*. 1949;63(1):93.
121. Höglund C, Ashbolt N, Stenström T, Svensson L. Viral persistence in source-separated human urine. *Adv Environ Res*. 2002;6:265-75.
122. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus taxonomy: Viiith report of the international committee on taxonomy of viruses. San Diega, CA: Elsevier Academic Press; 2005.
123. Ackermann HW, Tremblay D, Moineau S. Long-term bacteriophage preservation *World Fed Cult Collect Newslett*. 2004;38:35-40
124. Hagens S, Loessner MJ. Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: Calculations and considerations. *Curr Pharm Biotechnol*. 2010;11(1):58-68.
125. Bergey DH, Holt JG. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins; 1994.
126. Al-Saffar M, Mohammed E. Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* from Babylon province. *Biochem Cell Arch*; 2019;19(1):203-9
127. Sambrook J FE, Maniatis T. Molecular cloning. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
128. Smibert RM KN. Phenotypic characterization. In: Gerhardt P, murray RGE, wood WA, krieg NR, editors. *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington DC: ASM; 1994.
129. Andreani NA, Carraro L, Fasolato L, Balzan S, Lucchini R, Novelli E, et al. Characterisation of the thermostable protease AprX in strains of *Pseudomonas*

- fluorescens* and impact on the shelf-life of dairy products: Preliminary results. Ital J Food Saf. 2016;5(4):6175.
130. Zhang D, Palmer J, Teh KH, Calinisan MMA, Flint S. Milk fat influences proteolytic enzyme activity of dairy *Pseudomonas* species. Int J Food Microbiol. 2020;320:108543.
131. Andrews S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom; 2010.
132. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. Spades: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 2012;19(5):455-77.
133. Seemann T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics. 2014;30(14):2068-9.
134. Grant JR, Stothard P. The CGview server: A comparative genomics tool for circular genomes. Nucleic Acids Res. 2008;36(suppl_2):W181-W4.
135. McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, et al. The comprehensive antibiotic resistance database. Antimicrob Agents chemother. 2013;57(7):3348-57.
136. Chen L, Yang J, Yu J, Yao Z, Sun L, Shen Y, et al. VFDB: A reference database for bacterial virulence factors. Nucleic Acids Res. 2005;33(suppl_1):D325-D8.
137. Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, et al. Phaster: A better, faster version of the PHAST phage search tool. Nucleic Acids Res. 2016;44(W1):W16-W21.
138. Carattoli A, Hasman H. Plasmidfinder and *in silico* plasmid multiLocus sequence typing (pMLST) are two easy-to-use web tool for detection and characterization of plasmid replicons in whole-genome sequencing (WGS). Methods Mol Biol. 2020:285-94.
139. Lowe TM, Eddy SR. TRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. Nucleic Acids RES. 1997;25(5):955-64.

140. Tynecki P, Guziński A, Kazimierczak J, Jadczyk M, Dastych J, Onisko A. PhageAI- bacteriophage life cycle recognition with machine learning and natural language processing. *BioRxiv*. 2020:2020.07. 11.198606.
141. Wang LT, Tai CJ, Wu YC, Chen YB, Lee FL, Wang SL. *Pseudomonas taiwanensis* sp. Nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010;60(Pt 9):2094-8.
142. Matéos A, Guyard-Nicodème M, Baglinière F, Jardin J, Gaucheron F, Annie D-M, et al. Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of uht milk. *Int Dairy J*. 2015;49.
143. Kumarsan G, Annalvilli R, Sivakumar K. Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage. *J Appl Sci Res*. 2007;3:1383-1387.
144. Nicodème M, Grill JP, Humbert G, Gaillard JL. Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: Dependence of proteolytic activity on culture conditions. *J Appl Microbiol*. 2005;99(3):641-8.
145. Srinivasiah S, Bhavsar J, Thapar K, Liles M, Schoenfeld T, Wommack KE. Phages across the biosphere: Contrasts of viruses in soil and aquatic environments. *Res Microb*. 2008;159(5):349-57.
146. Kasman LM, Porter LD. *Bacteriophages*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022
147. Ceysens P-J, Lavigne, R. Bacteriophage of *Pseudomonas*. *Future Microbiology*; 2010;5(7):1041-55.
148. Krylov V, Pleteneva E, Bourkaltseva M, Shaburova O, Volckaert G, Sykilinda N, et al. *Myoviridae* bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: A long and complex evolutionary pathway. *Res Microbiol*. 2003;154(4):269-75.
149. Jończyk-Matysiak E, Łodej N, Kula D, Owczarek B, Orwat F, Międzybrodzki R, et al. Factors determining phage stability/activity: Challenges in practical phage application. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2019;17(8):583-606.
150. Nascimento ECD, Sabino MC, Corguinha LDR, Targino BN, Lange CC, Pinto CLO, et al. Lytic bacteriophages UFJF_PfDIW6 and UFJF_PfSW6 prevent

- Pseudomonas fluorescens* growth in vitro and the proteolytic-caused spoilage of raw milk during chilled storage. Food Microbiol. 2022;101:103892.
151. Atamer Z, Dietrich J, Neve H, Heller KJ, Hinrichs J. Influence of the suspension media on the thermal treatment of mesophilic lactococcal bacteriophages. Int Dairy J. 2010;20(6):408-14.
152. Jamal M, Hussain T, Das CR, Andleeb S. Characterization of siphoviridae phage Z and studying its efficacy against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* planktonic cells and biofilm. J Med Microbiol. 2015;64(Pt 4):454-62.
153. Baur C, Krewinkel M, Kutzli I, Kranz B, von Neubeck M, Huptas C, et al. Isolation and characterisation of a heat-resistant peptidase from *Pseudomonas panacis* withstanding general UHT processes. Int Dairy J. 2015;49:46-55.
154. Hu Z, Meng X-C, Liu F. Isolation and characterisation of lytic bacteriophages against *Pseudomonas* spp., a novel biological intervention for preventing spoilage of raw milk. Int Dairy J. 2016;55:72-8.
155. Tatham E, Sundaram Chavadi S, Mohandas P, Edupuganti UR, Angala SK, Chatterjee D, et al. Production of mycobacterial cell wall glycopeptidolipids requires a member of the *mbtH*-like protein family. BMC Microbiol. 2012;12:118.
156. Lossi NS, Manoli E, Förster A, Dajani R, Pape T, Freemont P, et al. The HsiB1C1 (TssB-TssC) complex of the *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system forms a bacteriophage tail sheathlike structure. J Biol Chem. 2013;288(11):7536-48.
157. Kawato Y, Yasuike M, Nakamura Y, Shigenobu Y, Fujiwara A, Sano M, et al. Complete genome sequence analysis of two *Pseudomonas plecoglossicida* phages, potential therapeutic agents. Appl Environ Microbiol. 2015;81(3):874-81.
158. Lu G, Luhr J, Stoecklein A, Warner P, Tapprich W. Complete genome sequences of *Pseudomonas fluorescens* bacteriophages isolated from freshwater samples in Omaha, Nebraska. Genome Announcements. 2017;5(12):e01501-16.

159. Shaburova OV, Krylov SV, Veřko VP, Pleteneva EA, Burkal'tseva MV, Miroshnokov KA, et al. [search for destruction factors of bacterial biofilms: Comparison of phage properties in a group of *Pseudomonas putida* bacteriophages and specificity of their halo-formation products]. *Genetika*. 2009;45(2):185-95.
160. Lee LF, Boezi JA. Characterization of bacteriophage gh-1 for *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol*. 1966;92(6):1821-7.
161. Chénard C, Wirth JF, Suttle CA. Viruses infecting a freshwater filamentous cyanobacterium (*Nostoc* sp.) encode a functional CRISPR array and a proteobacterial DNA polymerase B. *mBio*. 2016;7(3).
162. Magill DJ, Krylov VN, Shaburova OV, McGrath JW, Allen CCR, Quinn JP, et al. Pf16 and phiPMW: Expanding the realm of *Pseudomonas putida* bacteriophages. *PLoS One*. 2017;12(9):e0184307.
163. Cui Z, Xu Z, Wei Y, Zhang Q, Qin K, Ji X. Characterization and genome analysis of a novel MU-like phage VW-6B isolated from the Napahai plateau wetland of china. *Curr Microbiol*. 2021;78(1):150-8.
164. Necel A, Bloch S, Nejman-Faleńczyk B, Grabski M, Topka G, Dydecka A, et al. Characterization of a bacteriophage, vB_eco4M-7, that effectively infects many *Escherichia coli* O157 strains. *Sci Rep*. 2020;10(1):3743.



ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient broth (NB)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Nutrient agar (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Nutrient soft agar

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	7.5	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Cetrinide agar (อาหารสำเร็จ)

Pancreatic digest of gelatin	20	กรัม
Potassium sulphate	10	กรัม
Magnesium chloride	1.4	กรัม
Cetrinide	0.3	กรัม
Agar	15	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร เติมกลีเซอรอล 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Skim milk agar

Skim milk powder	100	กรัม
------------------	-----	------

ละลาย Skim milk powder ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาผสมรวมกับอาหาร Nutrient agar ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีมาแล้ว



ภาคผนวก ข บัฟเฟอร์และสารเคมี

1. 50X TAE buffer

Tris - base	24.2	กรัม
Glacial acetic acid	5.7	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	10	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Lysis buffer

1 M Tris - HCl (pH 8)	5	มิลลิลิตร
50 mM EDTA (pH 8)	5	มิลลิลิตร
20เปอร์เซ็นต์ SDS	7.5	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายและปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน นำไป
นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. TE buffer

Tris	1.211	กรัม
0.5 M EDTA	1	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 8 แล้วปรับ
ปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส
ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. 10X Phosphate buffer saline (PBS) solution

Sodium chloride	80	กรัม
Potassium chloride	2	กรัม
Disodium hydrogen phosphate	14.4	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	2.4	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.5 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1X ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อก่อนที่จะนำไปใช้ละลาย azocasein

5. Azocasein solution

Azocasein	2	กรัม
Sodium azide	1	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายใน PBS solution 100 มิลลิลิตร

6. Trichloroacetic acid (TCA) 20เปอร์เซ็นต์

Trichloroacetic acid	20	กรัม
----------------------	----	------

นำมาละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บรักษาในภาชนะแก้ว



ภาคผนวก ค

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับการทำ zymography

1. 1.5 M Tris - HCl pH 8.8

Tris - base	18.15	กรัม
-------------	-------	------

นำมาละลายในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 8.8 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. 1.5 M Tris - HCl pH 6.8

Tris - base	18.15	กรัม
-------------	-------	------

นำมาละลายในน้ำปราศจากไอออน 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 6.8 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Sodium dodecyl sulfate (SDS) 10เปอร์เซ็นต์

Sodium dodecyl sulfate	10	กรัม
------------------------	----	------

นำมาละลายในน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

4. Ammonium persulfate (APS) 10เปอร์เซ็นต์

Ammonium persulfate	1	กรัม
---------------------	---	------

นำมาละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. Zymography sample buffer

Tris - HCl (pH 6.5)	62.5	มิลลิโมลาร์
SDS	4	กรัม
Glycerol	25	มิลลิลิตร
Bromophenol blue	0.01	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. 10X Glycine running buffer

Tris - base	30.3	กรัม
Glycine	143.75	กรัม
SDS	10	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำปราศจากไอออนและปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1X ด้วยน้ำปราศจากไอออนก่อนที่จะนำไปใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

7. Development buffer solution

Tris - HCl (pH 7.5)	50	มิลลิโมลาร์
Sodium chloride	200	มิลลิโมลาร์
Calcium chloride	5	มิลลิโมลาร์
Brij - 35	0.02	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

8. Coomassie Brilliant Blue solution

Coomassie Brilliant Blue	0.1	กรัม
Absolute methanol	40	มิลลิลิตร
Acetic acid	10	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

9. Destaining solution

Absolute methanol	40	มิลลิลิตร
Sodium azide	10	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

10. Separating gels

Acrylamide - bisacrylamide	30	กรัม
Ammonium persulfate	10	กรัม
glycerol	50	มิลลิลิตร
TEMED	10	มิลลิลิตร
1.5 M Tris - HCl pH 8.8	1.5	มิลลิลิตร
Skim milk	0.2	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

11. Stacking gels

Acrylamide - bisacrylamide	30	กรัม
Ammonium persulfate	10	กรัม
SDS	10	กรัม
TEMED	1	ไมโครลิตร
1.5 M Tris - HCl pH 6.8	1.5	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

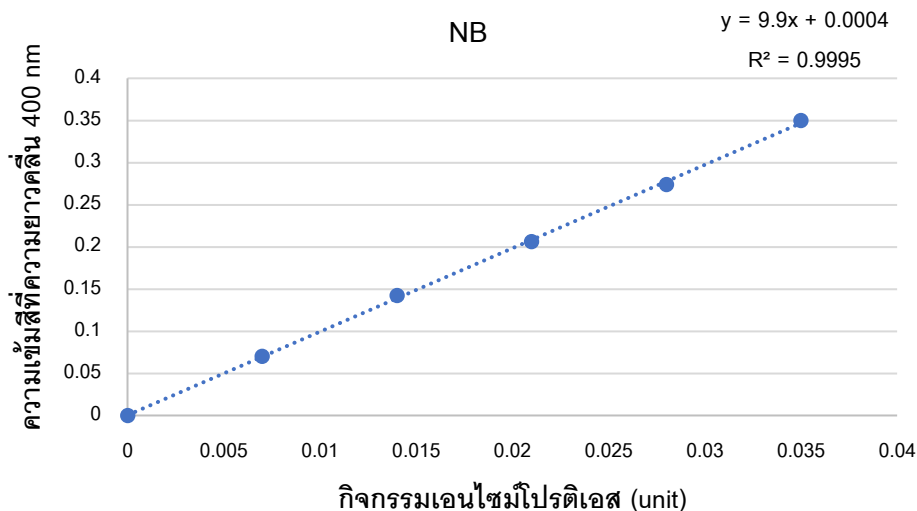


ภาคผนวก ง

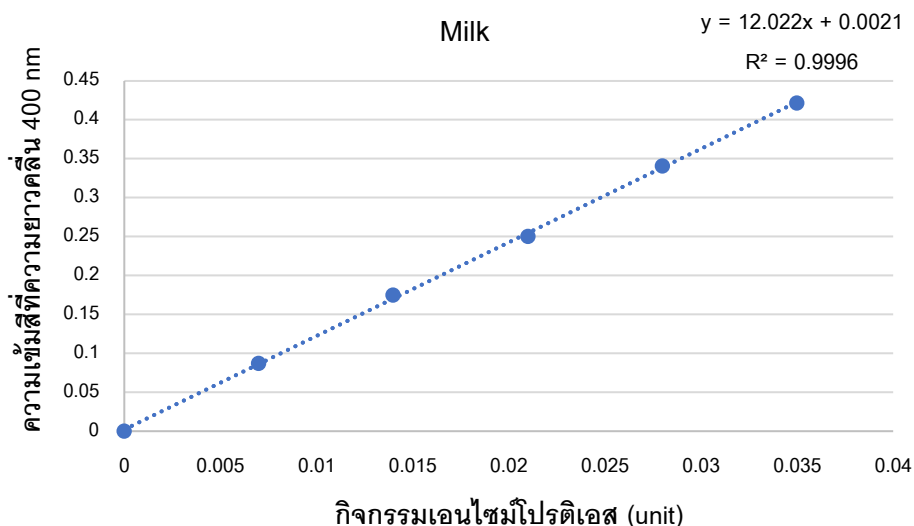
ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐาน

กิจกรรมการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ 1 unit จะเท่ากับกิจกรรมการย่อยโปรตีนของเอนไซม์โปรตีนเอสที่สร้างจาก *S. griseus* 1 มิลลิกรัม



ภาพประกอบ 30 กราฟมาตรฐานจากอาหาร NB
(กราฟมาตรฐานที่สร้างจากกิจกรรมการย่อยโปรตีนของเอนไซม์โปรตีนเอสจากเชื้อ *S. griseus* (3.5 unit/mg) ในอาหาร NB ที่ค่า OD₄₀₀ ต่าง ๆ)



ภาพประกอบ 31 กราฟมาตรฐานจากอาหาร skim milk
(กราฟมาตรฐานที่สร้างจากกิจกรรมการย่อยโปรตีนของเอนไซม์โปรตีนเอสจากเชื้อ *S. griseus* (3.5 unit/mg) ในอาหาร skim milk ที่ค่า OD₄₀₀ ต่าง ๆ)