

กิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของน้ำผลไม้หมักต่อเชื้อโรคทางอาหารบางชนิด

Antimicrobial Activity of Fermented fruit juices on Selected Foodborne Pathogens

กรรณิกา ศรีประยา (Kannika Sripraya)¹

ณฐนนท์ トラชู (Nathanon Trachoo)^{2*}

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ของน้ำผลไม้หมัก (fermented fruit juices : FF) คือ มะนาว ส้ม อะโวคาโด มะกรูด สับปะรด มะเฟือง และอ้อย โดยใช้วิธี Paper disc diffusion ทดสอบกับเชื้อ *Campylobacter jejuni* ATCC 29428, *C. jejuni* FBRL-S32, *C. jejuni* FBRL-S08, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* O157:H7 ผลการทดลอง พบว่า FF ทุกชนิดสามารถยับยั้งเชื้อโรคได้ โดย FF หมัก จากอะโวคาโด ยับยั้งเชื้อโรคได้ดีที่สุด FF มี pH ในช่วง 3.1-3.4 และเมื่อนำ FF มาปรับ pH เป็น 6.5-7.0 พบว่า มีบริเวณใสลดลง แสดงถึงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อโรคลดลง อย่างไรก็ตาม FF 5 ชนิด คือ มะนาว ส้ม มะกรูด สับปะรด และ อ้อย ยังให้บริเวณใสกับเชื้อโรคบางชนิดได้ ส่วน FF หมักจากอะโวคาโด และมะเฟือง เมื่อปรับ pH แล้วจะไม่ให้บริเวณใสกับเชื้อโรคทุกชนิด จากการวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธี HPLC พบว่า FF ประกอบด้วยกรดออกซาลิก, กรดทาร์ทริก, กรดมาลิก, กรดแอสคอบิก, กรดแลคติก, กรดอะซิติก, กรดซิตริก และ กรดเบนโซอิก

Abstract

The present study evaluate the antimicrobial activity of seven fermented fruit juices (FF), namely lime, orange, kaffir lime, pineapple, avocado, star fruit and sugar cane. The antimicrobial activity of these FF was tested against seven foodborne pathogens, namely *Campylobacter jejuni* ATCC 29428, *C. jejuni* FBRL-S32, *C. jejuni* FBRL-S08, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* O157:H7 using paper disc diffusion method. The results showed that seven FF inhibited all tested strains. The FF made from avocado fruit yielded the greastest clear zones. After adjusting the pH from 3.1-3.4 to 6.5-7.0, antimicrobial activities of FF on all pathogens reduced. However, FF made from lime, orange, kaffir lime, pineapple and sugar cane still gave clear zone on some pathogens. After adjusting pH, FF made

¹ นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาสารคาม

² ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาสารคาม

*corresponding author, e-mail:Nathanon.t@msu.ac.th, Nathanon.t@gmail.com

from avocado and star fruit showed no clear zone on all pathogens. Chemical analysis by HPLC showed that FF contained various organic acids including oxalic acid, tartaric acid, malic acid, ascorbic acid, lactic acid, acetic, citric and benzoic

คำสำคัญ: การยับยั้ง น้ำผลไม้หมัก เชื้อโรคทางอาหาร

Keywords: Antimicrobial, Fermented fruit juices, Foodborne Pathogens

บทนำ

ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาผู้บริโภคให้ความสนใจต่อการบริโภคผักและผลไม้สดเพื่อสุขภาพ (Nthenge, Chen and Gadwin, 2006) ผักมีสารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการที่สำคัญต่อมนุษย์ ได้แก่ แร่ธาตุ วิตามิน แอนติออกซิแดนท์ ไฟโตสเตอรอล และใยอาหาร (Zhang, Liu and Hong, 2007) แต่อย่างไรก็ตาม ผักและผลไม้มีโอกาสสัมผัสกับสิ่งสกปรกได้มาก เช่น ฝุ่น เศษดิน สารเคมี โดยเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์ การระบาดของเชื้อโรคทางอาหาร เช่น *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp. และ *Escherichia coli* O157:H7 (Yaun, 2004) จึงมีผักและผลไม้ที่ปนเปื้อนเป็นสาเหตุ รายงานของ Buck, Walcott and Beuchat ในปี ค.ศ. 2003 พบว่าเกิดโรคระบาดทางอาหารเนื่องจากการบริโภคผักสด ผลไม้สด และน้ำส้มที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ กระบวนการหมักอาหารและเครื่องดื่มด้วยแลคติกแอซิคแบคทีเรียทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะเซทิล คาร์บอนไดออกไซด์ และ แบคทีเรียโอซิน (Savadogo, 2004; Zamfir et al., 1999) ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนมากับอาหาร โดยเฉพาะแบคทีเรียโอซินซึ่งได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในอุตสาหกรรมอาหาร เพราะถือว่าเป็นสารกันเสียจากธรรมชาติสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของอาหารและจุลินทรีย์ก่อโรค อาทิ *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ *Clostridium botulinum* (Hernandez, Cardell and Zarate, 2005) ปัจจุบันผู้ผลิตและผู้บริโภคจึงให้ความสนใจ

สนใจการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในผักสด โดยใช้ผลิตภัณฑ์สารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติ (Allende et al., 2007) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อโรคทางอาหาร 7 ชนิด คือ *Campylobacter jejuni* ATCC 29428, *C. jejuni* FBRL-S32, *C. jejuni* FBRL-S08, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *B. cereus* และ *E. coli* O157:H7 ของ fermented fruit juices (FF) จาก มะนาว ส้ม อะโวคาโด มะกูด สับปะรด มะเฟือง และอ้อย เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมสำคัญในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด

วิธีการทดลอง

แหล่งที่มาของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบประกอบด้วย จุลินทรีย์ก่อโรค 7 ชนิด ได้แก่ *C. jejuni* ATCC 29428, *C. jejuni* FBRL-S32, *C. jejuni* FBRL-S08, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* และ *E. coli* O157:H7 โดย *C. jejuni* ATCC 29428 ได้มาจาก New Zealand Reference Culture Collection, Institute of Environmental Science and Research Limited, New Zealand ซึ่งแยกได้จากอุจจาระเด็กที่ป่วยด้วยอาการอุจจาระร่วง ส่วน *C. jejuni* FBRL-S32 *C. jejuni* FBRL-S08, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* และ *E. coli* O157:H7 จากห้องปฏิบัติการวิจัยเชื้อโรคทางอาหารและแผ่นชีว (Foodborne Pathogens and Biofilm Research Laboratory : FBRL) ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและ

โภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ใน 15% glycerol-brucella broth ที่อุณหภูมิ -35°C และการทำแห้งแบบเยือกแข็งอาหารเลี้ยงเชื้อ

C. jejuni ATCC 29428, *C. jejuni* FBRL-S32, *C. jejuni* FBRL-S08 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brucella agar ซึ่งประกอบด้วย Brucella broth 28 กรัม/ลิตร (Criterion, U.S.A.); agar 15 กรัม/ลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตร.นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม ferrous sulfate 0.5 กรัม/ลิตร, sodium bisulfate 0.2 กรัม/ลิตร, pyruvic acid 0.5 กรัม/ลิตร (FBP) ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 m ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brucella agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 48 ชม. ภายใต้สภาพบรรยากาศ microaerobic ซึ่งประกอบด้วย O_2 5%, CO_2 10%, N_2 85% (Premixed gas) (Trachoo and Brooks, 2005) ส่วน *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* และ *E. coli* O157:H7 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA) (Criterion, U.S.A.) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. (Chang and Fang, 2007; Shin et al., 2007)

การเตรียม FF

FF เป็นน้ำหมักจากผลไม้ ได้แก่ มะนาว ส้ม อะโวคาโด มะกรูด สับปะรด มะเฟือง และอ้อย เตรียมโดยนำผลไม้ดังกล่าวมาหั่นเป็นชิ้น แล้วนำมาหมักในภาชนะ เติมน้ำตาลทิ้งไว้ 6 เดือน รอจนตกตะกอน นำบริเวณใสมาทำการวิเคราะห์ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้รับมาจากบริษัทเอกชน การเตรียมสำหรับการทดสอบโดยนำ FF มากรองผ่านกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 m แล้วนำไปทดสอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 7 ชนิด ได้แก่ *C. jejuni* ATCC 29428, *C. jejuni* FBRL-S32, *C. jejuni* FBRL-S08, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* และ *E. coli* O157:H7 และกรณีที่ปรับ pH โดยปรับด้วย 1 N NaOH ให้ได้ pH 6.5-7.0 แล้วนำไปทดสอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 7 ชนิด ดังกล่าวข้างต้น

การหาความเป็นกรดโดยวิธีการไตเตรต

ทำการทดสอบโดยใช้วิธีการไตเตรต (Tetteh et al., 2004) โดยนำ FF ปริมาตร 5 ml มาเติมสารละลาย 1 % phenolphthalein 2-3 หยด แล้วนำไปทำการไตเตรตด้วย 0.1 N NaOH จนได้จุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอินทรีย์ โดยใช้วิธี HPLC

ทำการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ตามวิธีของ Cen และคณะ (2007) ดังนี้ เตรียมสารมาตรฐานกรดอินทรีย์ 8 ชนิด ได้แก่ กรดออกซาลิก กรดทาร์ทาริก กรดมาลิก กรดแอสคอบิก กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดซิตริก และ กรดเบนโซอิก โดยละลายด้วย 25 mM potassium phosphate, pH 2.5 กรดทาร์ทาริก กรดมาลิก กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดซิตริก และ กรดเบนโซอิก เตรียมที่ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 1, 5, 10 และ 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนกรดออกซาลิก เตรียมที่ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ กรดแอสคอบิก เตรียมความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0.0025, 0.01, 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารมาตรฐาน 20 ไมโครลิตร ไปฉีดวิเคราะห์ โดยเครื่อง HPLC (Shimadzu Cooperation Analytical & Measuring Instruments Division Kyoto, Japan ; LC-20AD Series pumping system, SIL-10AD Series Autoinjector system and SPD-M20A Series Diode array detector) เพื่อทำกราฟมาตรฐาน การเตรียมตัวอย่าง FF ทำการแยกตะกอนออกจาก FF โดยการ centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนบนมากรองด้วย membrane 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนที่กรองได้มาวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC ใช้ UV detector คอลัมน์ Apollo C18 (250 x 4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) และ guard column Inertsil ODS-3 (4.0 มิลลิเมตร, 10 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) mobile phase คือ 25mM potassium phosphate, pH 2.5 อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส อัตราการไหลที่ใช้เท่ากับ 0.8 มิลลิลิตร/นาที และใช้

ความยาวคลื่นที่ 210 นาโนเมตร ปริมาณที่ฉีดวิเคราะห์เท่ากับ 20 ไมโครเมตร (Cen et al., 2007; Eiteman and Chastain. 1997; Rodrigues et al., 2007; Shui and Leong, 2002)

การทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค

ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยวิธี Paper disc diffusion (Sofia et al., 2007) โดยทำการขีด *C. jejuni* ATCC 29428, *C. jejuni* FBRL-S32 และ *C. jejuni* FBRL-S08 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brucella agar ที่เติม FBP จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 48 ชม. ภายใต้สภาพบรรยากาศ microaerobic ส่วนเชื้ออื่นทำการขีด *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* และ *E. coli* O157:H7 ลงบน TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. เมื่อบ่มครบเวลาแล้ว นำเชื้อมาเติม 0.1% peptone water ปริมาตร 3 ml แล้วใช้แท่งแก้วกวาดเชื้อจะได้ cell suspension ออกมา จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (PU8625 UV/VIS Spectrophotometer, Philips, England) (Valimaa et al., 2007) ให้ได้ประมาณ 0.75 – 0.8 (เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^7 – 10^8 CFU/ml) แล้วนำไป spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย *C. jejuni* ATCC 29428, *C. jejuni* FBRL-S32 และ *C. jejuni* FBRL-S08 spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brucella

agar ที่เติม FBP ส่วนเชื้อ *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* และ *E. coli* O157:H7 spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA จากนั้นจุ่ม paper discs ($\varnothing$ 6 มม.) (Whatman Ltd, Maidstone, England) ลงใน FF (ไม่ปรับ pH และ ปรับ pH เป็น 6.5–7.0) เป็นเวลา 2 วินาที หรือเท่ากับ FF ปริมาตร 15 μ l (Ayhan et al., 1999; Xianfei et al., 2007) แล้ววางลงบนอาหารที่ spread plate ไว้ข้างต้น นำไปบ่มโดยอาหารเลี้ยงเชื้อ Brucella agar ที่เติม FBP บ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 48 ชม. ภายใต้สภาพบรรยากาศ microaerobic ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24–48 ชม. (Kotzekidou, Giannakidis and Boulamatis, 2007) เทียบกับประสิทธิภาพของชุดควบคุม น้ำกลั่น และ 0.7% lactic acid

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดสอบกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของ FF 7 ชนิด ได้แก่ มะนาว ส้ม อะโวคาโด มะกรูด สับปะรด มะเฟือง และอ้อย (รูปที่ 1) ต่อเชื้อ *C. jejuni* ATCC 29428, *C. jejuni* FBRL-S32, *C. jejuni* FBRL-S08, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* and *E. coli* O157:H7 แสดงผลการวัด pH และ equivalent of NaOH normality /ml sample ดังตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 pH ของตัวอย่างน้ำผลไม้หมัก

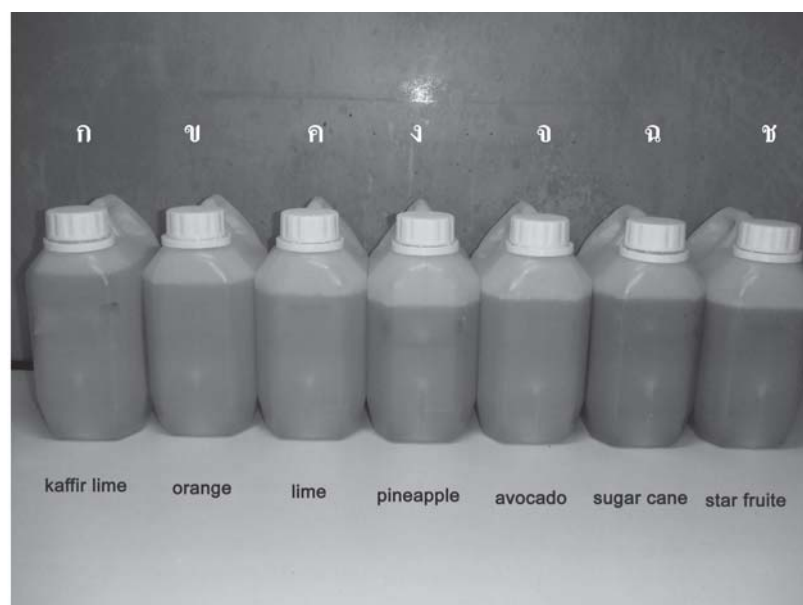
ผลไม้ที่ใช้หมัก	pH	SD
มะนาว	3.12	0.06 ^c
ส้ม	3.28	0.14 ^{ab}
อะโวคาโด	3.39	0.12 ^a
มะกรูด	3.09	0.14 ^c
สับปะรด	3.20	0.14 ^{bc}
มะเฟือง	3.34	0.12 ^a
อ้อย	3.38	0.06 ^a

^{a,b,c},...ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 2 equivalent of NaOH normality /ml sample ของตัวอย่างน้ำผลไม้หมัก

	equivalent of NaOH normality /ml sample $\pm$ SD	
	ไม่ปรับ pH	ปรับ pH เป็น 6.5-7.0
มะนาว	$1.55 \times 10^{-4} \pm 0.07^c$	$0.70 \times 10^{-4} \pm 0.17^a$
ส้ม	$1.25 \times 10^{-4} \pm 0.07^f$	$0.13 \times 10^{-4} \pm 0.06^c$
อะโวคาโด	$6.95 \times 10^{-4} \pm 0.07^a$	$0.37 \times 10^{-4} \pm 0.06^b$
มะกรูด	$4.70 \times 10^{-4} \pm 0.14^b$	$0.27 \times 10^{-4} \pm 0.06^{bc}$
สับปะรด	$2.27 \times 10^{-4} \pm 0^c$	$0.57 \times 10^{-4} \pm 0.12^a$
มะเฟือง	$0.80 \times 10^{-4} \pm 0^g$	$0.10 \times 10^{-4} \pm 0^c$
อ้อย	$2.20 \times 10^{-4} \pm 0^d$	$0.27 \times 10^{-4} \pm 0.06^{bc}$

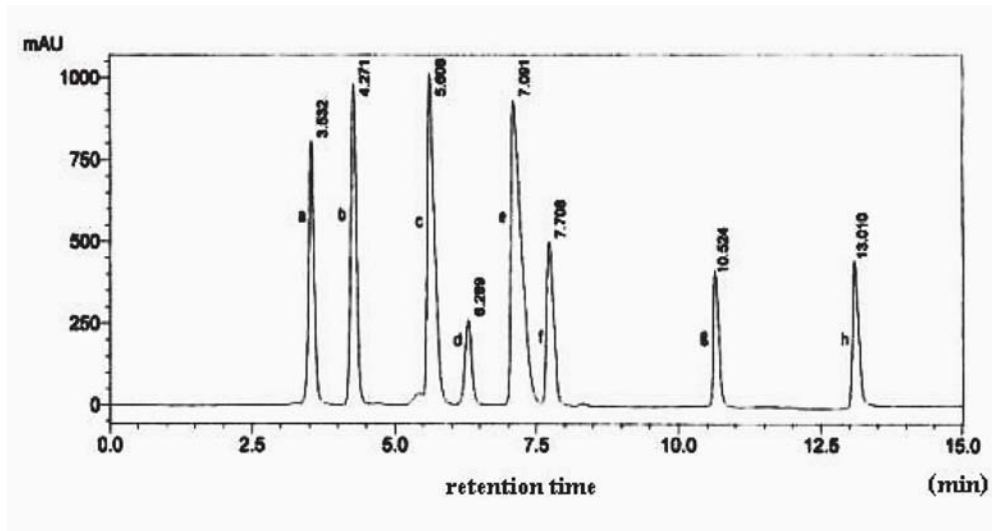
^{a,b,c},...ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวดิ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



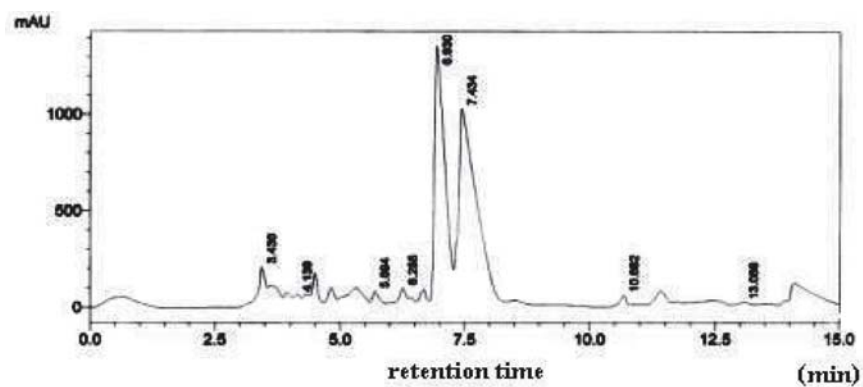
รูปที่ 1 ตัวอย่าง FF 7 ชนิด ได้แก่ (ก) มะกรูด (ข) ส้ม (ค) มะนาว (ง) สับปะรด (จ) อะโวคาโด (ฉ) อ้อย และ (ช) มะเฟือง

FF มี pH ในช่วง 3.1-3.4 (ตารางที่ 1) และ FF ทุกชนิดมี equivalent of normality NaOH/ml sample แตกต่างกัน ($p \leq 0.05$) ซึ่ง FF ที่มี equivalent of normality NaOH/ml sample สูงสุด คือ FF ที่หมักจากอะโวคาโด รองลงมาคือ มะกรูด สับปะรด อ้อย มะนาว ส้ม และน้อยที่สุด คือ มะเฟือง (ตารางที่ 2) แสดงว่าใน FF มีปริมาณกรดอินทรีย์แตกต่างกัน และเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ 8 ชนิด ได้แก่ กรดออกซาลิก กรดทาร์ทาริก กรดมาลิก กรดแอสคอบิก กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดซิตริก และกรดเบนโซอิก โดยใช้วิธี HPLC เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ พบว่า FF มีปริมาณ กรดออกซาลิกอยู่ในช่วง 1,000-1,300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กรดทาร์ทาริกอยู่ในช่วง 850-865 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กรดมาลิกอยู่ในช่วง 900-950 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กรดแอสคอบิกอยู่ในช่วง 1,000-2,800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กรดแลคติกอยู่ในช่วง 1,000 - 4,600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กรดอะซิติกอยู่ในช่วง 1,000- 7,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กรดซิตริก อยู่ในช่วง 880-920 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและกรดเบนโซอิกอยู่ในช่วง 1,000-2,590 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 3) เมื่อทำการวิเคราะห์โดยตามชนิดของ FF พบว่า FF จะพบกรดอินทรีย์ในปริมาณแตกต่างกัน ($p \leq 0.05$) โดย FF หมักจากอะโวคาโด จะมีปริมาณกรดมาลิก กรดแลคติก กรดอะซิติกสูงสุด และกรดออกซาลิก กรดเบนโซอิกพบปริมาณสูงสุดใน FF ที่หมักจากมะเฟือง กรดแอสคอบิก กรดซิตริก พบปริมาณสูงสุดใน FF หมักจากมะกรูด ส่วนกรดทาร์ทาริก พบปริมาณสูงสุดใน FF หมักจากสับปะรด ซึ่งโดยสรุปส่วนใหญ่ FF พบปริมาณกรดแลคติก และกรดอะซิติก เป็นปริมาณมากและมีปริมาณกรดแลคติกในปริมาณมากกว่ากรดอะซิติก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ ดวงพร คันธโชติ และคณะ (2548) พบว่า น้ำหมักชีวภาพจากพืชจะประกอบด้วยกรดแลคติกและอะซิติก เนื่องจากในกระบวนการหมักผลไม้จะเกิดกรดอินทรีย์ ทั้งนี้เนื่องมาจากการกระทำของเอนไซม์ซึ่งอาจจะเป็นเอนไซม์ที่มีในผลไม้

หรือเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทำการย่อยน้ำตาลให้กลายเป็นกรดอินทรีย์ ซึ่งกรดอินทรีย์ที่เกิด คือ กรดมาลิก กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดซิตริก (ศิริกัญญา และ พิมพิไล, 2549; Savadogo et al., 2004) นอกจากนี้ กรดอินทรีย์ที่พบจากการวิเคราะห์ยังอาจจะมีมาจากกรดอินทรีย์ที่มีในผลไม้ที่หมัก เช่น กรดทาร์ทาริก (Savadogo et al., 2004) กรดแอสคอบิก และ กรดซิตริก (Ocana-Morgner and Dankert, 2001) กรดออกซาลิก สำหรับกรดแลคติกที่พบมากใน FF มีกระบวนการเกิด คือ กรดแลคติกเกิดจากแบคทีเรียแลคติกพวก homofermentative หรือ homolactic fermentation เช่น *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* เป็นต้น โดยแบคทีเรียจะหมักน้ำตาลกลูโคสโดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า Emden-Meyerhof-Parnas (EMP) หรือ glycolytic pathway ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกได้ประมาณ 95% จากการหมักกลูโคสหรือกาแลคโตส 1 โมเลกุล เมื่อเข้าสู่ EMP จะได้ไพรูเวตจะถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ กรดแลคติก กลไกฆ่าเชื้อของกรดแลคติก กรดแลคติกที่ pH 4 จะซึมผ่าน outer membrane ของ *E. coli* O157:H7 (Alakomi et al., 2000; Ocana-Morgner and Dankert, 2001) ส่วนกรดอะซิติกและกรดอื่นๆ ที่พบเกิดจากแบคทีเรียในกลุ่ม heterofermentative หรือ heterolactic fermentation เช่น *Lactobacillus* บางสปีชีส์ และ *Leuconostoc* ซึ่งหมักน้ำตาลกลูโคสและแลคโตสเป็นผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก ฟอรั่มิก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ (ศิริกัญญา และ พิมพิไล, 2549) แบคทีเรียกลุ่ม acetobacter ซึ่งเป็นกลุ่มที่ผลิต อะซิติกได้สูง และยังสามารถออกซิไดส์เอทานอลให้เป็น acetaldehyde โดย alcohol dehydrogenase enzyme ต่อจากนั้น acetaldehyde จะรวมตัวกับน้ำได้เป็น acetaldehyde hydrate ซึ่งจะถูกออกซิไดส์ต่อไปเป็นกรดอะซิติก ซึ่งแสดงรูปโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานกรดอินทรีย์ และ ตัวอย่างน้ำหมักจากอะโวคาโด ดังรูปที่ 2 และ 3 ตามลำดับ



รูปที่ 2 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานกรดอินทรีย์ (a = กรดออกซาลิก, b = กรดทาร์ทาริก, c = กรดมาลิก, d = กรดแอสคอบิก, e = กรดแลกติก, f = กรดอะซิติก, g = กรดซิตริก, h = กรดเบนโซอิก)



รูปที่ 3 โครมาโทแกรมของ FF ที่หมักจากอะโวคาโด

ตารางที่ 3 ปริมาณของกรดอินทรีย์ใน FF จาก มะนาว ส้ม อะโวคาโด มะกรูด สับปะรด มะเฟือง และอ้อย

ผลไม้ที่ใช้	ปริมาณกรดอินทรีย์ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) $\pm$ SD							
	กรดออกซาลิก	กรดทาร์ทาริก	กรดมาลิก	กรดแอสคอร์บิก	กรดแลคติก	กรดอะซิติก	กรดซิตริก	กรดเบนโซอิก
มะนาว	994.4 $\pm$ 0.2 ^c	852.0 $\pm$ 0.1 ^f	904.2 $\pm$ 0.1 ^c	1,863.3 $\pm$ 48.0 ^c	2,080.0 $\pm$ 12.6 ^d	1,352.2 $\pm$ 6.6 ^d	892.6 $\pm$ 0.8 ^d	2,590.1 $\pm$ 21.6 ^a
ส้ม	1,009.3 $\pm$ 1.7 ^d	858.1 $\pm$ 0.3 ^b	904.5 $\pm$ 0.6 ^c	1,057.9 $\pm$ 19.2 ^e	2,149.1 $\pm$ 30.7 ^c	1,409.3 $\pm$ 10.3 ^{cd}	891.1 $\pm$ 10.3 ^d	1,491.5 $\pm$ 12.2 ^b
อะโวคาโด	1,126.0 $\pm$ 4.1 ^b	856.2 $\pm$ 0.4 ^c	942.6 $\pm$ 0.7 ^a	2,291.2 $\pm$ 7.5 ^b	4,605.1 $\pm$ 42.5 ^a	7,051.8 $\pm$ 16.9 ^a	920.4 $\pm$ 1.6 ^b	1,230.5 $\pm$ 62.4 ^b
มะกรูด	1,019.7 $\pm$ 0.3 ^c	851.9 $\pm$ 0.1 ^f	902.4 $\pm$ 0.1 ^d	2,727.1 $\pm$ 20.4 ^a	1,846.4 $\pm$ 9.3 ^c	1,616.7 $\pm$ 6.7 ^c	980.7 $\pm$ 3.1 ^a	1,510.9 $\pm$ 25.8 ^b
สับปะรด	1,002.1 $\pm$ 1.2 ^{de}	865.3 $\pm$ 0.8 ^a	902.2 $\pm$ 1.1 ^d	1,143.7 $\pm$ 8.5 ^f	1,756.8 $\pm$ 42.3 ^f	2,802.3 $\pm$ 27.1 ^b	905.7 $\pm$ 4.0 ^c	1,169.4 $\pm$ 16.5 ^b
มะเฟือง	1,289.1 $\pm$ 6.7 ^a	853.0 $\pm$ 0.1 ^c	903.8 $\pm$ 0.1 ^c	1,785.5 $\pm$ 23.9 ^d	1,229.2 $\pm$ 31.2 ^e	1,085.0 $\pm$ 20.0 ^c	884.6 $\pm$ 1.5 ^d	2,354.0 $\pm$ 8.5 ^a
อ้อย	1,130.0 $\pm$ 11.9 ^b	854.8 $\pm$ 0.9 ^d	915.6 $\pm$ 0.1 ^b	1,717.8 $\pm$ 26.6 ^c	4,061.4 $\pm$ 30.4 ^b	2,849.6 $\pm$ 40.7 ^b	914.9 $\pm$ 0.4 ^b	2,208.7 $\pm$ 12.1 ^a

^{a,b,c}, ...ตัวเลขตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4 กิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของน้ำผลไม้หมักจาก มะนาว ส้ม อะโวคาโด มะกรูด สับปะรด มะเฟือง และ อ้อยต่อจุลินทรีย์ก่อโรค *Campylobacter jejuni* ATCC 29428, *C. jejuni* FBRL-S32, *C. jejuni* FBRL-S08, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* และ *Escherichia coli* O157:H7

ผลไม้ที่ใช้หมัก	<i>C. jejuni</i>		<i>C. jejuni</i>		<i>C. jejuni</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i>	
	ATCC 29428		FBRL-S32		FBRL-S08								O157:H7	
เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (มม.)														
มะนาว	35	1.00 ^{cd}	26	1.00 ^c	23	2.52 ^{cd}	8	0 ^b	10	0.58 ^{bc}	23	2.08 ^a	10	1.0 ^{bc}
ปรับ pH 6.85	NC		NC		20	0.58 ^{de}	NC		NC		7	4.62 ^e	NC	
ส้ม	43	2.30 ^b	30	1.00 ^b	24	3.61 ^{cd}	9	1.73 ^b	9	1.0 ^d	13	1.53 ^{bc}	9	0.58 ^{bc}
ปรับ pH 6.58	NC		NC		29	0.58 ^c	NC		8		0.58 ^e	8	0.58 ^{de}	NC
อะโวคาโด	65	7.02 ^a	48	2.89 ^a	43	4.93 ^a	19	3.21 ^a	16	1.0 ^a	18	0.58 ^b	18	2.0 ^a
ปรับ pH 6.87	NC		NC		NC		NC		NC		NC		NC	
มะกรูด	39	2.60 ^{bc}	25	2.65 ^c	35	7.0 ^b	7	6.08 ^b	9	0.58 ^{cd}	27	2.0 ^a	11	0.58 ^b
ปรับ pH 6.98	9	0.58 ^f	NC		NC		NC		NC		NC		NC	
สับปะรด	31	8.08 ^d	24	1.53 ^c	17	3.51 ^{de}	7	0 ^b	10	0.58 ^{cd}	10	1.53 ^{cd}	11	0 ^b
ปรับ pH 6.79	NC		NC		21	1.0 ^{de}	NC		NC		8	0.58 ^{de}	8	1.53 ^{cd}
มะเฟือง	21	0.58 ^c	17	1.15 ^d	13	3.46 ^{de}	7	4.04 ^b	7	0 ^e	7	5.50 ^e	7	0 ^d
ปรับ pH 6.76	NC		NC		NC		NC		NC		NC		NC	
อ้อย	34	2.00 ^{cd}	24	3.46 ^c	29	2.52 ^c	10	1.15 ^b	11	1.0 ^b	11	1.53 ^{cd}	10	2.0 ^{bc}
ปรับ pH 6.72	NC		9	1.15 ^f	NC		NC		NC		NC		NC	
0.7% lactic acid	9	0 ^f	3	1.16 ^e	9	0.29 ^g	9	0.58 ^b	7	0.29 ^e	NC		NC	

^{a,b,c},...ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวดิ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ (p0.05)

NC : No clear zone

น้ำกลั่น คือ negative control ซึ่งแสดงผล No clear zone ต่อเชื้อทั้ง 7 ชนิด ที่ทำการทดสอบ

FF ทั้ง 7 ชนิด ที่ยังไม่ปรับ pH สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ *C. jejuni* ATCC29428, *C. jejuni* FBRL-S32, *C. jejuni* FBRL-S08, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* และ *E. coli* O157:H7 และให้ผลในการยับยั้งเชื้อโรคได้ดีกว่า FF ที่ปรับ pH ให้เป็น 6.5-7.0 ซึ่ง FF ที่หมักจากอะโวคาโด สามารถยับยั้งเชื้อโรคโดยเฉลี่ยได้ดีที่สุด รองลงมาคือ มะกรูด ส้ม มะนาว อ้อย สับปะรด และน้อยที่สุดคือ มะเฟือง FF ทุกชนิดมี pH ต่ำกว่า 4.0 เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคตายได้ที่ pH ต่ำกว่า 4.0 (Stopforth et al., 2003) FF จึงสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ทดลอง เมื่อปรับ pH ให้ได้ 6.5-7.0 พบว่ามีบริเวณใสลดลงอย่างเห็นได้ชัด แสดงถึงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อโรคลดลง ความสามารถในการแตกตัวของกรดและชนิดของกรดยังมีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค กรดอินทรีย์จะยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดในสภาวะที่เป็นกรดมากกว่าในสภาวะที่เป็นกลาง เนื่องจากกรดอินทรีย์ที่อยู่ในสภาวะที่เป็นกรดสูงจะไม่แตกตัวและจะสามารถเคลื่อนที่ผ่านเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ขณะที่ภายในเซลล์กรดที่ไม่แตกตัวเหล่านี้จะแตกตัวในสภาวะที่เป็นกลางหรือเป็นกรดเล็กน้อย จากนั้นเซลล์จะขับ H^+ ที่เกินออกมาแต่กิจกรรมนี้จะทำให้เซลล์สูญเสียพลังงานในรูปของ ATP เมื่อ มี H^+ มากเกินที่จะขับออกมาได้จะส่งผลให้ค่า pH ภายในเซลล์จะลดลง (Ross, Morgam and Hill, 2002) ทำให้มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ การทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ การลำเลียงสารอาหาร กิจกรรมเมแทบอลิซึมทั้งหมด และ เซลล์ตายในที่สุด (Chang and Fang, 2007; Bjornsdottir, Breidt and McFeeters, 2006) เมื่อปรับ pH ให้เป็น 6.5-7.0 จึงทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ลดลง เนื่องจากกรดจะเกิดการแตกตัวและไอออนที่แตกตัวจะไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้ FF ยังประกอบด้วยกรดอินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกัน ซึ่งกรดแต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ต่างกัน เช่น กรดอะซิติกจะมีการออกฤทธิ์ที่ต่ำกว่ากรดแลคติกและมีช่วงของการยับยั้ง

ที่กว้างกว่าเพราะสามารถยับยั้งได้ทั้ง ยีสต์ รา และแบคทีเรีย เนื่องจากการดออะซิติกมีค่า pKa หรือค่าที่ครึ่งหนึ่งของกรดมีการแตกตัวสูงกว่า กรดแลคติก (4.75 และ 3.08 ตามลำดับ) กรดแลคติกที่ pH 4 อยู่ในรูปไม่แตกตัวมีเพียง 11 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรดอะซิติกอยู่ในรูปไม่แตกตัวถึง 85 เปอร์เซ็นต์ (ศิริกัญญา และ พิมพ์ใจ, 2549) ดังนั้นชนิดของกรดใน FF ที่แตกต่างกัน จึงอาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อโรคแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม FF ที่ pH สูงขึ้น บางชนิดยังสามารถยับยั้งเชื้อได้คือ น้ำหมักจากมะนาวให้บริเวณใสกับเชื้อ *C. jejuni* FBRL-S08 (20 มม.) และ *B. cereus* (7 มม.) น้ำหมักจากส้มให้บริเวณใสกับเชื้อ *C. jejuni* FBRL-S08 (29 มม.), *P. aeruginosa* (8 มม.) และ *B. cereus* (8 มม.) น้ำหมักจากมะกรูดให้บริเวณใสกับเชื้อ *C. jejuni* ATCC 29428 (9 มม.) น้ำหมักจากสับปะรดให้บริเวณใสกับเชื้อ *C. jejuni* FBRL-S08 (21 มม.), *B. cereus* (8 มม.) และ *E. coli* O157:H7 (8 มม.) น้ำหมักจากอ้อยให้บริเวณใสกับเชื้อ *C. jejuni* FBRL-S32 (9 มม.) (ตารางที่ 3) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกยังให้สารประกอบอื่น เช่น ไดอะเซติล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอทานอล และ แบคทีริโอซิน (Savadogo et al., 2004) ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (Osmanoglu, 2007) แสดงว่านอกจากกรดอินทรีย์แล้ว FF เหล่านี้อาจประกอบด้วยผลิตภัณฑ์อื่นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อโรค แบคทีริโอซิน ซึ่งเป็นสายเปปไทด์ขนาดเล็กซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคถูกสร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก โดยแบคทีริโอซินจะทำให้เกิดรูที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลให้เกิดการเสียสมดุลขององค์ประกอบภายในเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายทำให้เซลล์ตายได้ (Deraz et al., 2005)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า FF แต่ละชนิดมีปริมาณกรดอินทรีย์แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหมักด้วยวัตถุดิบที่แตกต่างกัน จึงทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งแตกต่างกัน โดย FF หมักจากอะโวคาโด มี equivalent

of normality NaOH/ml sample สูงสุด และมีปริมาณกรดแลคติกและกรดอะซิติกสูงสุด จึงเป็นผลให้ FF หมักจากอะโวคาโดยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด

สรุปผล

จากการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *C. jejuni* ATCC 29428, *C. jejuni* FBRL-S32, *C. jejuni* FBRL-S08, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* และ *E. coli* O157:H7 ของ FF พบว่า FF ทุกชนิดสามารถยับยั้งเชื้อโรคที่นำมาทดสอบในงานวิจัยนี้ได้ FF ประกอบด้วยกรดอินทรีย์ 8 ชนิด ได้แก่ กรดออกซาลิก กรดทาร์ทาริก กรดมาลิก กรดแอสคอร์บิก กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดซิตริก และ กรดเบนโซอิก ภายหลังจากปรับ pH ให้เป็น 6.5–7.0 ทำให้ความสามารถของ FF ลดลงไปตาม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการวิจัยร่วมภาคเอกชนในเชิงพาณิชย์สำนักประสานและส่งเสริมกิจการอุดมศึกษา สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ บริษัทกรีนโอเรียนท์ จำกัด กองส่งเสริมและพัฒนางานวิจัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

เอกสารอ้างอิง

- ดวงพร คันธโชติ, วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และ ณรงค์ฤทธิ์ อัครเรืองพิภพ. 2548. ลักษณะของน้ำหมักชีวภาพจากพืชในภาคใต้ของประเทศไทย. วารสารลานครินทร์ วท. 27(3) : 601–615.
- ศิริกัญญา ลิ้มประเสริฐศรี และ พิมพใจ เรือนนุช. 2549. การศึกษาคูณสมบัติของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่แบคทีเรียกรดแลคติก สร้างขึ้นเพื่อใช้ยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* sp. รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม.
- Alakomi, H.L. Skytta, E. Saarela, M. Mattila-Sandholm, T. Latva-Kala, K. and Helander,

- I.M. 2000. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria disrupting the outer Membrane. **Applied and Environmental Microbiology**. 66 : 2001–2005.
- Allende, A. Martinez, B. Selma, V. Gil, M.I. Suarez, J.E. and Rodriguez, A. 2007. Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce. **Food Microbiology**. 24 : 759–766.
- Ayhan, H. Sultan, N. Cirak, M. Ruhi, M.Z. and Bodur, H. 1999. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. **International Endodontic Journal**. 32 : 99–102.
- Bjornsdottir, K. Breidt, F.Jr. and McFeeters, R. F. 2006. Protective Effects of Organic Acids on Survival of *E. coli* O157:H7 in Acidic Environments. **Applied and Environmental Microbiology**. 72 (1) : 660–664.
- Buck, J.W. Walcott, R.R. and Beuchat, L.R. 2003. Recent Trends in Microbiological Safety of Fruits and Vegetables. Online. Plant Health Progress doi : 10.1094/PHP-2003-0121-01-RV.
- Cen et al. 2007. Visible and near infrared spectroscopy for rapid detection of citric and tartaric acids in orange juice. **Journal of Food Engineering**. 82 : 253–260.
- Chang, J. M. and Fang, T. J. 2007. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against *E. coli* O157:H7. **Food Microbiology**. 24 : 745–751.

- Deraz, S. F. Karlsson, E.N. Hedstrom, M. Andersson, M.M. and Mattiasson, B. 2005. Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. **Journal of Biotechnology**. 117 : 343-354.
- Eiteman, M.A. and Chastain, M.J. 1997. Optimization of the ion-exchange analysis of organic acids from fermentation. **Analytica Chimica Acta**. 338 : 69-75.
- Hernandez, D. Cardell, E. and Zarate, V. 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese : initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. **Journal of Applied Microbiology**. 99 : 77-84.
- Kotzekidou, P. Giannakidis, P. and Boulamatsis, A. 2007. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens *in vitro* and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **Food Science and Technology**. doi ; 10.1016/j.lwt. 2007.01.016.
- Nthenge, A. K. Chen, F. C. and Godwin, S. L. 2006. Efficacy of Home Washing Methods in Controlling Surface Microbial Contamination on Fresh Produce. **Journal of Food Protection**. 69 (2) : 330-334.
- Ocana-Morgner, C and Dankert, JR. 2001. Induction of complement sensitivity in *Escherichia coli* by citric acid and low pH. **Journal of Applied Microbiology**. 90 : 771-778.
- Osmanagaoglu, O. 2007. Detection and characterization of Leucocin OZ, a new *anti-listerial* bacteriocin produced by *Leuconostoc carnosum* with a broad spectrum of activity. **Food Control**. 18 : 118-123.
- Ross, R.P. Morgan, S. and Hill, C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**. 79 : 3-16.
- Rodrigues, Marta, L. Maia, R. Miranda, M. Ribeirinhob, M and Maguasa, C. 2007. Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**. 20 : 440-448.
- Savado, A. Ouattara, C.A.T. Bassole, I. H.N. and Traore, A.S. 2004. Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolation from Burkina Faso Fermented Milk. **Pakistan Journal of Nutrition**. 3 (3) : 174-179.
- Shin, S. Y. Bajpai, V.K. Kim, H.R. and Kang, S.C. 2007. Antibacteria activity of bioconverted eicosapentaeic (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) against foodborne pathogenic bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. 113 : 233-236.
- Shui, G and Leong, LP. 2002. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. 977 : 89-96.
- Sofia, P. K. Prasad, R. Vijay, V.K. and Srivastava, A.K. 2007. Evaluation of antibacterial activity of Indian spices against common foodborne pathogens. **International Journal**

- of Food Science and Technology. 42 : 910-915.
- Stopforth, J. D. Samelis, J. Sofos, J. N. Kendall, P. A. and Smith, G.C. 2003. Influence of organic acid concentration on survival of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in beef carcass wash water and on model equipment surfaces. **Food Microbiology**. 20 : 651-660.
- Tetteh, G.L. Sefa-Dedeh, S.K. Phillips, R.D. and Beuchat, L.R. 2004. Survival and growth of acid-adapted and unadapted *Shigella flexneri* in a traditional fermented Ghanaian weaning food as affected by fortification with cowpea. **International Journal of Food Microbiology**. 90 : 189-195.
- Trachoo, N. and Brooks, J.D. 2005. Attachment and Heat Resistance of *Campylobacter jejuni* on *Enterococcus faecium* Biofilm. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. 8 (4) : 599-605.
- Valimaa, A. L. Hamalainen, U.H. Pietarinen, S. Willfor, S. Holmbom, B. and Wright, A.V. 2007. Antimicrobial and cytotoxic knotwood extracts and related pure compounds and their effects on food-associated microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**. 115 : 235-243.
- Xianfei, X. Xiaoqiang, C. Shunying, Z. and Guolin, Z. 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China. **Food Chemistry**. 100 : 1312-1315.
- Yaun, B. R. Sumner, S.S. Eifert, J.D. and Marcy, J.E. 2004. Inhibition of pathogens on fresh produce by ultraviolet energy. **International Journal of Food Microbiology**. 90 : 1-8.
- Zamfir, M. Callewaert, R. Cornea, P.C. Savu, L. Vatafu, I. and Vuyst, L.D. 1999. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. **Journal of Applied Microbiology**. 87 : 923-931.
- Zhang, Z.Y. Liu, X. J. and Hong X. Y. 2007. Effects of home preparation on pesticide residues in cabbage. **Food Control**. 18 : 1484-1487.