บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันผู้บริโภคอาหารได้ให้ความสนใจในเรื่องการดูแลสุขภาพของตนเองมากขึ้น ทั้งนี้เพราะในปัจจุบันมีการใช้วัตถุกันเสียซึ่งก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค อีกทั้งการบริโภคอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ เช่น อาหารที่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรคและสารเคมีที่ใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร จึงได้มีความพยายามหาทางในการแก้ไขปัญหาเชื้อก่อโรคและหาสารกันเสียธรรมชาติมาทดแทน ซึ่งมีความปลอดภัยมากกว่าสารกันเสียที่มาจากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีที่อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคหากได้รับในปริมาณมากติดต่อกันเป็นเวลานาน ทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางคือ การใช้สารต้านจุลชีพที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกซึ่งใช้ในการผลิตอาหารหมักดอง

แบคทีเรียแลกติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่พบมากในอาหารประเภทอาหารหมัก เช่น แหนม ผักดอง ผลไม้ดอง ไส้กรอกเปรี้ยว เนยแข็ง และนมเปรี้ยว อีกทั้งยังสามารถพบได้ในร่างกายคนและสัตว์ เช่น ในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร และอวัยวะสืบพันธุ์ แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ท่อนสั้นหรือยาว ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ต้องการอากาศเล็กน้อยในการเจริญ (microaerophile) บางชนิดสามารถเจริญได้ในสภาวะไม่มีอากาศ (strictly anaerobe) ไม่เคลื่อนที่ (Wood and Holzapfel, 1997) ให้ผลผลิตหลักจากการหมักย่อยน้ำตาล คือ กรดแลกติก การที่แบคทีเรียแลกติกมีความสามารถในการยับยั้งทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ เนื่องจากกรดแลกติกที่แบคทีเรียผลิตขึ้นทำให้ค่าพีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคหรือจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในอาหาร นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกยังสร้างสารระเหยที่มีกลิ่นเฉพาะตัว เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และไดอะซิติล (diacetyl) ซึ่งจะไปมีผลต่อคุณลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์อาหาร ในระดับอุตสาหกรรมมีการใช้แบคทีเรียแลกติกเป็นหัวเชื้อตั้งต้นเพื่อเติมลงไปในอาหาร ซึ่งจะมีผลต่อกลิ่นรสและเนื้อสัมผัสของอาหาร (Lasen *et al.*, 1993; Brink *et al.*, 1994) นอกจากนี้กลุ่มของแบคทีเรียแลกติก อาทิ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ยังมีคุณสมบัติในการทนต่อกรดและเกลือน้ำดี ทำให้สามารถมีชีวิตอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารอันเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของการเป็นโปรไบโอติก ซึ่งโปรไบโอติกหมายถึงจุลินทรีย์มีชีวิตที่สามารถก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มัน

อาศัยอยู่โดยการคงไว้หรือปรับสภาพสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ทำให้เกิดความต้านทานต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้มีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค (Saarela *et al.*, 2000)

ดังนั้นการเลือกใช้จุลินทรีย์ที่มีชีวิต มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก และสามารถผลิตสารยับยั้งกับผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ เพื่อเพิ่มความปลอดภัยและสุขภาพที่ดีของผู้บริโภค จึงเป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ การศึกษาครั้งนี้ต้องการที่จะคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านต่างๆทั้งที่ทำจากเนื้อสัตว์และพืชผัก เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ และศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่ผลิตได้ รวมทั้งการประเมินคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกด้วยวิธีการต่างๆในห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ เพื่อเพิ่มความปลอดภัยและยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารหมักชนิดต่างๆ

บทตรวจเอกสาร

1. อาหารหมัก (Fermented food)

กระบวนการหมักเป็นวิธีหนึ่งที่ยอมรับในการถนอมอาหาร เป็นกระบวนการที่ทำให้สารประกอบของอาหารเปลี่ยนแปลงไปคือ เปลี่ยนทั้งสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่ทำให้คุณค่าทางอาหารเสียไป รวมทั้งรสชาติ และลักษณะผลิตภัณฑ์

โดยสารประกอบที่มีบทบาทสำคัญในการถนอมอาหาร คือ กรดแลกติก ปกติแบคทีเรียแลกติกพบได้ทั่วไปในผัก ผลไม้ หรือเนื้อสัตว์ แบคทีเรียแลกติกจะใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในผัก ผลไม้หรือเนื้อสัตว์เปลี่ยนเป็นกรดแลกติกทำให้สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้

อาหารหมักหากแบ่งตามวัตถุดิบที่ใช้ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1. อาหารหมักจากพืช เช่น กะหล่ำปลีดอง แตงกวาดอง สะตอดอง เหรียงดอง เต้าเจี้ยว ผักเสี้ยนดอง หน่อไม้ดอง หัวไชโป๊ ข้าวหมาก กระเทียมดอง และขิงดอง เป็นต้น

2. อาหารหมักจากสัตว์ เช่น ไส้กรอกเปรี้ยว แหนม ปลาร้า ไตปลา น้ำปลา ปลาแป้งแดง กุ้งส้ม ปลาส้ม ปลาจ่อม หอยดอง และน้ำบูดู เป็นต้น

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

1. ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากพืช

<u>กะหล่ำปลีดอง</u> เป็นการหมักกะหล่ำปลีด้วยแบคทีเรียแลกติกโดยธรรมชาติ ซึ่งมีการเติมเกลือเพื่อให้สภาวะเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย พบว่า *Enterobacter coacae* และ *Erwinia herbicola* มีบทบาทในระยะแรกของการหมักทำให้เกิดกลิ่นและรสที่ดี ในระยะกลางของการหมัก *Leuconostoc mesenteroides* จะเพิ่มจำนวนขึ้นมาแทนที่แบคทีเรียอื่นๆ ผลิตกรดแลกติก 0.7-1.0 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก เอธานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และแมนนิทอล (ซึ่งมีรสขม) ระยะสุดท้ายของการหมักอาศัย *Lactobacillus plantarum* ซึ่งสามารถใช้แมนนิทอลได้ทำให้รสขมของกะหล่ำปลีดองหมดไป (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

<u>แตงกวาดอง</u> เป็นการนำแตงกวามาหมักด้วยเกลือหรือน้ำเกลือ ในระยะแรกของการหมักพบจุลินทรีย์พวก *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, รา และยีสต์ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นพวกที่ไม่ต้องการ ขณะที่แบคทีเรียแลกติกที่ต้องการจะพบจำนวนน้อยกว่า หลังจากการหมัก 7 วัน แบคทีเรียแลกติกจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ส่วนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการจะลดจำนวนลง และอาจจะหายไปเมื่อปริมาณกรดเพิ่มขึ้น ค่าพีเอชลดลง โดยแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญได้แก่ *Lactobacillus brevis* และ *Lactobacillus plantarum* (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

ผักกาดดอง เป็นการนำผักกาดเขียวมาหมักด้วยน้ำเกลือ แบคทีเรียที่พบในการหมักระยะแรกส่วนใหญ่เป็นชนิด heterofermentative rod ได้แก่ *Lactobacillus* spp. และ *Lactobacillus brevis* การหมักในระยะต่อมาแบคทีเรียพวก heterofermentative cocci จะเด่นขึ้นมา ได้แก่ *Pediococcus cerevisiae* ส่วนช่วงหลังของการหมักจะพบแบคทีเรียพวก heterofermentative rod ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* (ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2524)

หน่อไม้ดอง มีหลักการเดียวกับการทำกะหล่ำปลีดองของประเทศตะวันตก โดย *Pediococcus cerevisiae* และ *Lactobacillus plantarum* จะผลิตกรดแลกติกในระยะเริ่มแรกของกระบวนการหมัก ส่วนในระยะสุดท้ายของกระบวนการหมักจะพบ *Lactobacillus buchneri, Lactobacillus fermenti* และ *Lactobacillus mesenteriodes* (ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2524)

ผักเสี้ยนดอง วิธีการดองทำโดยนำผักเสี้ยนมาหั่นเป็นท่อนขนาดพอคำ นำไปตากแห้งพอหมาดๆ เพื่อขจัดกลิ่นเหม็นเขียว เสร็จแล้วผสมข้าวเย็น 1 กำมือต่อผักเสี้ยน 5 ถ้วยแกง ขยำกับเกลือให้มีรสเค็มเล็กน้อย แล้วใส่น้ำ 5 ถ้วยแกง น้ำตาลโตนด 5 ช้อนแกง คลุกเคล้าปิดฝาภาชนะตั้งไว้ในที่ร่ม 3-4 คืน ผักเสี้ยนจะมีรสเปรี้ยวพร้อมรับประทาน ส่วนแบคทีเรียแลกติกที่พบในผักเสี้ยนดองมีทั้ง heterofermentative และ homofermentative ส่วนใหญ่ก็เป็นแบคทีเรียที่พบในหน่อไม้ดอง (ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2524)

2. ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์

แหนม เป็นอาหารหมักประเภทเนื้อเกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียแลกติก โดยในระยะแรก *Lactobacillus* จะเจริญอย่างช้าๆ จึงมีจำนวนน้อย หลังจากหมักเป็นเวลา 3 วัน *Pediococcus* ซึ่งทนกรดได้น้อยจะเจริญช้าลงและหยุดการเจริญในที่สุด ในขณะที่ *Lactobacillus* สามารถเจริญและสร้างกรดต่อไปได้ (วิลาวัฒย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

บูดู เป็นอาหารหมักที่ทำมาจากปลาทะเลขนาดเล็ก ระยะแรกของการหมักพบแบคทีเรียพวก *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. และ coryneform bacteria ซึ่งเชื่อว่าแบคทีเรียเหล่านี้มีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อปลา ส่วนแบคทีเรีย *Pediococcus halophilus* จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามระยะเวลาการหมัก และเมื่อสิ้นสุดการหมักจะพบแบคทีเรียชนิดนี้สูงถึงร้อยละ 90 และมีบทบาทสำคัญในการสร้างกรดและกลิ่นในบูดู (วิลาวัฒย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

ไส้กรอกเปรี้ยว เป็นอาหารหมักที่มีต้นกำเนิดจากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ บางครั้งจึงเรียกไส้กรอกอีสาน จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมักไส้กรอกเปรี้ยว ได้แก่ แบคทีเรียแลกติกที่พบมากที่สุดคือ *Pediococcus cerevisiae* และ *Lactobacillus plantarum* นอกจากนี้ยังพบ *Pediococcus halophilus* และ *Lactobacillus brevis* (วิลาวัฒย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

ปลาส้ม เป็นอาหารหมักประเภทปลามีลักษณะคล้ายคลึงกับปลาเจ่าแต่ในการทำใช้ข้าวสุกแทนข้าวหมาก ในระยะแรกของการหมักพบแบคทีเรียพวก *Staphylococcus*, *Micrococcus* และ *Bacillus* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลา ส่วนแบคทีเรียที่พบในปริมาณมากและพบตลอดระยะเวลาในการหมัก คือ *Pediococcus cerevisiae* รองลงมา คือ *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus brevis* โดยแบคทีเรียแลกติกเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการสร้างกรดและกลิ่นในปลาส้ม (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

ปลาร้า เป็นอาหารพื้นเมืองที่นิยมบริโภคกันมากในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง ซึ่งได้จากการหมักปลา ผลิตภัณฑ์มีน้ำเล็กน้อยและเนื้อปลามีลักษณะนิ่มยุ่ย มีสีเหลืองเข้มจนถึงน้ำตาลดำ (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536) แบคทีเรียแลกติกที่พบในการหมักปลาร้าได้แก่ *Pediococcus* sp. และ *Pediococcus halophilus* ซึ่งจะมีผลต่อกลิ่นรสของปลาร้า นอกจากนี้ยังพบ *Staphylococcus* sp. และ *Staphylococcus epidermidis* โดยมีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนและมีผลต่อกลิ่นรสบ้างเล็กน้อยเช่นเดียวกับ *Micrococcus* sp., *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* (ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2524)

น้ำปลา กะปิ ปลาเจ่า ตลอดจนอาหารหมักที่ใช้ปลาเป็นวัตถุดิบอีกหลายชนิดพบว่ามีแบคทีเรียแลกติกที่เกี่ยวข้อง คือ *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus halophilus* และ *Micrococcus sarcina* (ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2524 และวิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

2. แบคทีเรียแลกติก

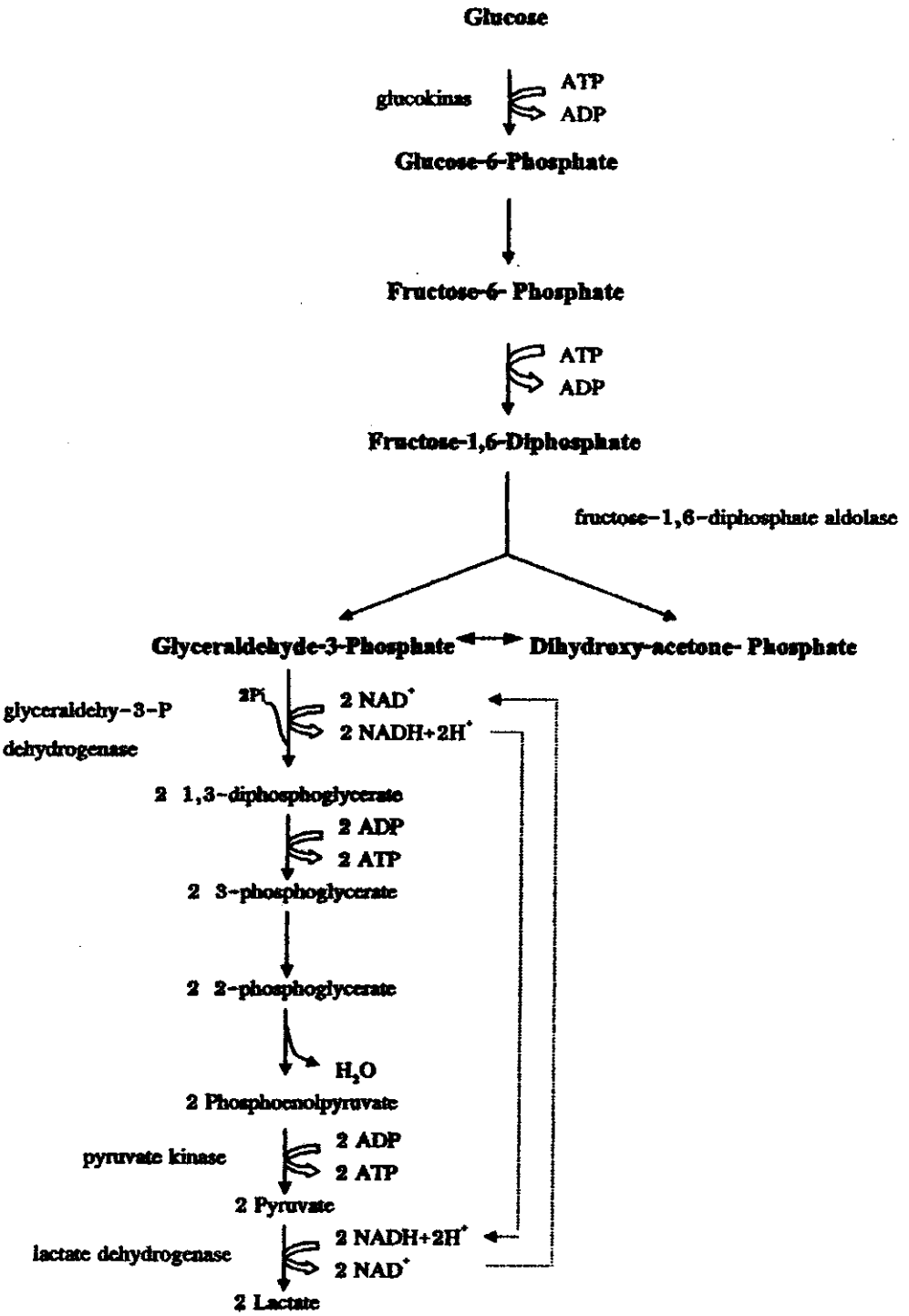
แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ท่อนสั้นหรือยาว ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ต้องการอากาศเล็กน้อยในการเจริญ (microaerophile) บางชนิดสามารถเจริญได้ในสภาวะไม่มีอากาศ (strictly anaerobe) ให้ผลผลิตหลักจากการหมักย่อยน้ำตาลคือกรดแลกติก แบคทีเรียแลกติกมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ ทั้งนี้เนื่องจากกรดแลกติกที่แบคทีเรียผลิตขึ้นทำให้ค่าพีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคหรือจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในอาหาร อีกทั้งยังพบว่าแบคทีเรียแลกติกสร้างสารระเหยที่มีกลิ่นเฉพาะตัว เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และไดอะซิติล (diacetyl) (Lasen *et al.*, 1993; Brink *et al.*, 1994) มีผลทำให้เกิดคุณลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์อาหาร สำหรับในระดับอุตสาหกรรมมีการใช้แบคทีเรียแลกติกเป็นหัวเชื้อตั้งต้นเพื่อเติมลงไปในอาหาร มีผลต่อกลิ่นรสและเนื้อสัมผัสของอาหาร และสารที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งซึ่งผลิตจากแบคทีเรียแลกติก คือ แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้อย่างจำเพาะ

การจัดกลุ่มแบคทีเรียแลกติกสกุลต่างๆขึ้นอยู่กับรูปร่างลักษณะ รูปแบบการหมักน้ำตาลกลูโคส การใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ การใช้ซิเตรท การใช้อาร์จินิน การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ การผลิตกรดแลกติก การเจริญในที่มีเกลือความเข้มข้นสูงและการทนเกลือหรือด่าง (Axelsson, 1993) ในปัจจุบันมีการจัดกลุ่มแบคทีเรียแลกติกออกเป็น 7 สกุล (genus) คือ *Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus* และ *Tetragenococcus* และในบางครั้งจะมีการรวม *Bifidobacterium* และ *Propionibacterium* เอาไว้ในกลุ่มแบคทีเรียแลกติกด้วย (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534)

หากจัดแบ่งแบคทีเรียแลกติกตามการใช้อาหารและการสร้างสาร(Axelsson, 1993; Kandler and Weiss, 1986) สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

1. Homofermentative lactic acid bacteria หมายถึง แบคทีเรียแลกติกที่หมักน้ำตาลกลูโคสทำการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวตโดยอาศัยเอนไซม์ aldolase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแล้วให้กรดแลกติกประมาณร้อยละ 85 หรือมากกว่าจากการหมักคาร์โบไฮเดรตโดยผ่าน glycolysis pathway (Embden-Meyerhof-Parnas pathway) ดังแสดงในภาพที่ 1 แบคทีเรียแลกติกกลุ่มนี้ไม่ต้องการ thiamine ในการเจริญ ได้แก่ แบคทีเรียแลกติกในสกุล *Pediococcus, Streptococcus* และ *Lactobacillus* บางชนิด

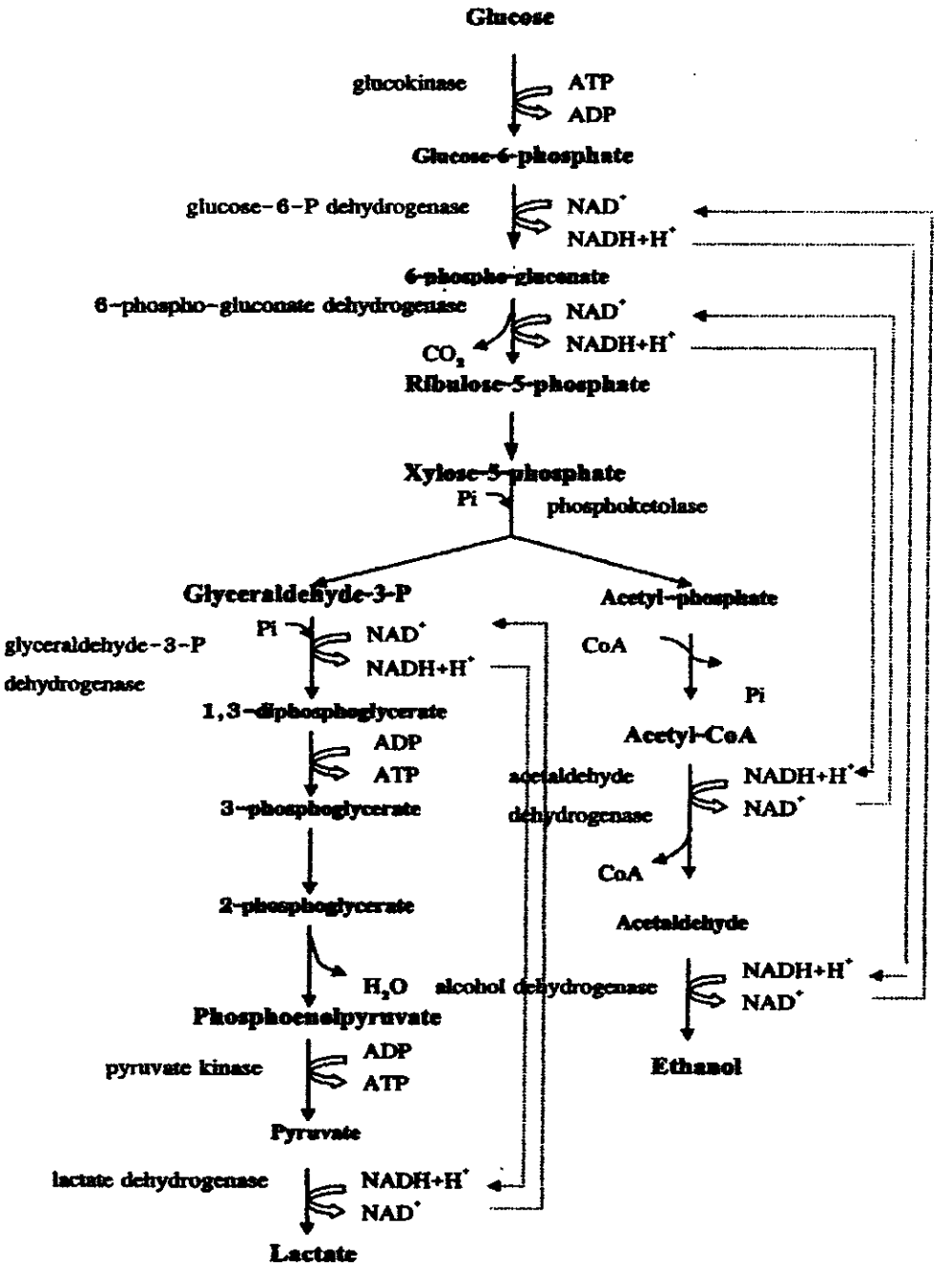
2. Heterofermentative lactic acid bacteria หมายถึง แบคทีเรียแลกติกที่หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วให้กรดแลกติกร้อยละ 50 คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 20-25 กรดอะซิติก และเอธานอลร้อยละ 20-25 โดยผ่าน phosphoglyconate pathway หรือ phosphoketolase pathway ดังแสดงในภาพที่ 2 แบคทีเรียแลกติกกลุ่มนี้ต้องการ thiamine ในการเจริญ สร้างเอนไซม์ phosphoketolase แต่ไม่สร้างเอนไซม์ aldolase ได้แก่แบคทีเรียในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* บางชนิด



ภาพที่ 1 วิถีการใช้น้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียแลกติกในกลุ่ม homofermentative

Figure 1. Homofermentation of glucose by homofermentative lactic acid bacteria.

ที่มา : Axelsson (1993)



ภาพที่ 2 วิถีการใช้น้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียแลกติกในกลุ่ม heterofermentative

Figure 2. Heterofermentation of glucose by heterofermentative lactic acid bacteria.

ที่มา : Axelsson (1993)

3. โปรไบโอติก

จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่มีประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน (host) มีคุณสมบัติในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารและทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้ สามารถผลิตกรดแลกติกและสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารหรือกระตุ้นคุณค่าทางโภชนาการให้สูงขึ้น (นวลจันทร์ พารักษา, 2533 และ Marteau *et al.*, 2001)

3.1 คุณสมบัติของโปรไบโอติก

1. สามารถสร้างกรดแลกติก ทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดมากขึ้นจึงเกิดการย่อยและการใช้ประโยชน์จากสารอาหารต่างๆได้ดีขึ้น (กิจการ ศุภมาตย์, 2544) ช่วยปรับสภาพของระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่แบคทีเรียโคลิฟอร์มเจริญได้ยาก (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

2. สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารได้ดี (Kontula *et al.*, 1998) เช่น *Lactobacillus acidophilus* (ADH) สามารถทนต่อกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์อื่นๆ (Conway *et al.*, 1987) *Lactobacillus gasseri* สามารถรอดชีวิตได้สูงที่พีเอช 3.0, 2.0 และ 1.5 ตามลำดับ (Arihara *et al.*, 1998) *Lactobacillus* สายพันธุ์ BFE 1058 และ 1061 มีความสามารถในการทนต่อพีเอชต่ำได้ดีกว่าสายพันธุ์ BFE 1059 (Toit *et al.*, 1998) *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถมีชีวิตรอดได้สูงสุดที่พีเอช 3.0 (Erkkila and Petaja, 2000)

3. สามารถทนต่อเกลือน้ำดี โดยแบคทีเรียในกลุ่ม lactobacilli ซึ่งอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์มีคุณสมบัติในการทนต่อเกลือน้ำดี และมีความสำคัญต่อระบบสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตสารซึ่งจะช่วยปรับปรุงและรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ รวมถึงรักษาโรคที่เกิดกับลำไส้ Erkkila และ Petaja (2000) พบว่า *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) มีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีได้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.30

4. สามารถแข่งขันกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้ โดยปกติเชื้อโรคจะเข้าเกาะและต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ที่มีการบีบตัวให้อาหารเคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น (peristalsis) ซึ่งการเกาะเคลือบของโปรไบโอติกที่ผนังทางเดินอาหารนี้จะทำให้การย่อยอาหารและการดูดซึมเป็นไปอย่างปกติ (Fuller, 1993)

5. ไม่ถูกดูดซึมในทางเดินอาหาร (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

6. ไม่หลงเหลืออยู่ในเนื้อเยื่อ (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

7. สามารถสร้างเอนไซม์ pectinase, β-galactosidase, amylase, protease, lactase และ cellulase มีผลทำให้การย่อยและการใช้ประโยชน์ของสารอาหารต่างๆดีขึ้น (อุทัย คันโธ, 2535)

8. สามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อโรคทั้งที่เป็น primary metabolite เช่น กรดอินทรีย์ และ secondary metabolite เช่น hydrogen peroxide และ bacteriocin (Fuller, 1993)

9. กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ซึ่งสามารถพบได้ใน *Lactobacillus* sp. ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง gamma globulin และ gamma interferon ส่งเสริมกิจกรรมของ macrophage ในการกำจัดเชื้อโรคออกจากร่างกาย (Fuller, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Klila และคณะ (1992) ที่มีการนำ *Lactobacillus* sp. จากผลิตภัณฑ์นมหรือโยเกิร์ตให้ผู้ป่วยโรคท้องร่วงรับประทาน พบว่า ทำให้ร่างกายผู้ป่วยสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้นถึงร้อยละ 90 เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับประทาน *Lactobacillus* sp. ที่มีการสร้างภูมิคุ้มกันเพียงร้อยละ 46

10. ลดการสังเคราะห์ amine ที่เป็นพิษในระบบทางเดินอาหาร และเพิ่มการใช้ประโยชน์ของสารต่างๆในร่างกาย (อุทัย คันโธ, 2535)

11. ลดการเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่

12. แย่งอาหารของเชื้อก่อโรค (Fuller, 1993)

13. การออกฤทธิ์ของสารยับยั้งไม่เปลี่ยนแปลง (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

14. สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีแหล่งอาหารน้อย (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

15. เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วและสามารถยังชีพอยู่ในลำไส้ได้นานประมาณ 24 ชั่วโมง (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

16. ไม่สามารถสร้างสารพิษ (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

17. ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หรือดื้อยา (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

18. สามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิกว้างคือ 20–60 องศาเซลเซียส (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

19. สร้างสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น folate ช่วยสร้างเม็ดเลือดแดงและวิตามินบี 2 ที่ช่วยบำรุงเส้นผมและเล็บ (Fuller, 1993)

4. การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียในอาหารนอกจากจะใช้สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะแล้ว การนำเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารยับยั้งได้ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น อาหารหมักพื้นเมือง นมเปรี้ยว และนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม เป็นต้น เกศินี เมธาวัชรวงศ์ (2532) พบว่า การหมักเนื้อปลาโดยการเติมแบคทีเรียแลกติกจะมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียและแบคทีเรียก่อโรคในเนื้อปลาได้ ได้แก่ *Bacillus* sp., *Achromobacter* sp., *Clostridium botulinum* type E, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*,

Flavobacterium sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp., *Shigella* sp., *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio cholerae*

ตามธรรมชาติของแบคทีเรียแลกติกต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ อาจมีผลจากผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น กรดที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นทำให้ค่าพีเอชลดลง ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นๆได้ โดยจากการศึกษาของ ทองคำ คิมหะมานนท์ (2538) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักส้มฟัก ได้แก่ *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus maltaromicus*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus urinaeequi*, *Pediococcus dextrinicus*, *Pediococcus halophilus* และ *Pediococcus penyosaceus* พบว่าจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร 4 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. และ *Vibrio parahaemolyicus*

วิลาวัฒย์ เจริญจิระตระกูล และคณะ (2539) ได้ศึกษา *Lactobacillus* spp. ที่แยกจากนมเปรี้ยว คือ *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus delbrurckii* subsp. *bulgaricus* สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้ร้อยละ 61.1-75.5, *Salmonella typhimurium* ร้อยละ 40.5-62.1 และ *Escherichia coli* ร้อยละ 47.9-53.0

Schillinger และ Lucke (1989) ได้ศึกษาถึงกิจกรรมของ *Lactobacillus sake* ที่แยกได้จากเนื้อสัตว์จำนวน 19 สายพันธุ์ ในการยับยั้งแบคทีเรียโดยใช้เชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ คือ *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus devergens* และ *Listeria monocytogenes* ผลการศึกษา พบว่าน้ำหมักของ *Lactobacillus sake* มีกิจกรรมการยับยั้งต่อแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่ แต่ไม่มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ โดยการศึกษานี้มีข้อสรุปว่าเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เป็นแหล่งของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ เพราะว่าสามารถปรับตัวได้ดีในสภาวะของกระบวนการผลิต และยังมีความสามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ดีกว่าแบคทีเรียแลกติกที่มาจากแหล่งอื่น

Vignolo และคณะ (1993) ได้ศึกษาถึงกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากไส้กรอกหมัก โดยใช้วิธี Well diffusion assay ซึ่งแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ประกอบด้วย *Lactobacillus casei* จำนวน 52 สายพันธุ์ และ *Lactobacillus plantarum* จำนวน 48 สายพันธุ์ ผลการศึกษาพบว่าน้ำหมักที่ได้มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc lactis*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* และยังมีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบบางสายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่ถูกยับยั้งได้แก่ *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* และ *Serratia marcescens*

Messi และคณะ (2001) ได้ศึกษาถึงการผลิตแบคเทอริโอซินและกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคต่างๆของ *Lactobacillus plantarum* 35d ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไส้กรอกอิตาเลียน ผลการศึกษาพบว่าเชื้อชนิดนี้ผลิตแบคเทอริโอซินได้สูง โดยผลการยับยั้งสามารถยับยั้งแบคทีเรียแลกติกในจีนัสเดียวกันได้มากที่สุด

5. สารยับยั้งแบคทีเรียที่ได้จากแบคทีเรียแลกติก

1. กรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแลกติก และกรดอะซิติก ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากแบคทีเรียแลกติกชนิด homofermentative สังเคราะห์ขึ้นโดยวิถี Embden-Meyerhof Parnas pathway (EMP) ส่วนในกลุ่ม heterofermentative พบว่ามีการสังเคราะห์กรดแลกติก กรดอะซิติก และกรดฟอร์มิกรวมอยู่ด้วยโดยสังเคราะห์ผ่านวิถีฟอสโฟคีโตเลส การสะสมของกรดส่งผลให้พีเอชลดลงซึ่งจะมีผลต่อจุลินทรีย์ไม่ทนกรด เช่น *Escherichia coli*, *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. (Ostling and Lindgren, 1993) แต่ทั้งนี้ก็ยังขึ้นอยู่กับชนิดของกรดและชนิดของจุลินทรีย์อีกด้วย เช่น กรดอะซิติกความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ทำลายแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ได้ภายในระยะเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องสาเซลเซียส ในขณะที่กรดแลกติกความเข้มข้นเพียง 0.75 เปอร์เซ็นต์ สามารถทำลายแบคทีเรียดังกล่าวในสภาพเดียวกัน

Niemand และคณะ (1983) พบว่าการเติมกรดแลกติกลงในเนื้อบดเพื่อให้มีค่าพีเอชเป็น 5.0 จะมีผลในการลดจำนวนของเชื้อ Enterobacteriaceae, Pseudomonads และ Brochospacta แต่จะไม่มีผลต่อเชื้อ *Leuconostoc* และ *Pediococcus* เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตกรดได้ทำให้ตัวมันเองปรับสภาพในการทนกรด

Ziauddin และคณะ (1993) แสดงให้เห็นว่ากรดแลกติกมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค โดยพบว่ากรดแลกติกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และร้อยละ 2.5 จะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่างๆ ได้แก่ *Bacillus*, *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus* และ *Streptococcus* ได้อย่างสมบูรณ์

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ (2536) รายงานว่า กรดอะซิติกใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองต่างๆ เช่น ไส้กรอกเปรี้ยว โดยกรดอะซิติกมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นเมื่อนำมาใช้ในการถนอมอาหารต้องใช้ที่ความเข้มข้นไม่ต่ำกว่าร้อยละ 3.6 แต่ Dickson (1992) พบว่าเมื่อใช้เนื้อวัวที่มีการเติม *Salmonella typhimurium* มาทดสอบกับกรดอะซิติกร้อยละ 2 จะมีผลในการลดจำนวนของแบคทีเรียดังกล่าวได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Jay (1996) ที่ได้ศึกษาผลของกรดอะซิติกร้อยละ 2 ในการทำลาย *Salmonella enteritidis* และ *Salmonella typhimurium* ใน

น้ำสลัด โดยเติมเชื้อดังกล่าวลงในน้ำสลัดจำนวน $5.0X10^6$ เซลล์ พบว่าหลังจากทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จะไม่พบเชื้ออยู่เลย

นอกจากการนำกรดแลกติกและกรดอะซิติกมาใช้เพียงเดี่ยวๆแล้ว ยังมีการใช้กรดแลกติกและกรดอะซิติกร่วมกัน ตัวอย่างเช่น Kotula and Thelappurate (1994) ได้ใช้กรดแลกติกและกรดอะซิติกกับเนื้อวัวพบว่าจะช่วยลดแบคทีเรียทั้งหมดและ *E. coli* เป็นจำนวน 1 log CFU ต่อมิลลิลิตร หากเพิ่มเวลาในการทดสอบให้นานขึ้นผลการยับยั้งจากกรดทั้งสองชนิดนี้ก็จะเพิ่มขึ้น โดยสามารถลดจำนวนเชื้อที่ใช้ทดสอบลง 2 log CFU ต่อมิลลิลิตร

Ziauddin และคณะ (1996 อ้างโดย อรัญญา สังขศรี, 2542) ทำการฉีดพ่นกรดอะซิติก กรดแลกติก สารสกัดขิง สารสกัดกระเทียม และสารสกัดหอมลงในเนื้อ โดยทำการฉีดเพียงเดี่ยวๆ และร่วมกันกับโซเดียมคลอไรด์ พบว่าจะช่วยยืดอายุการเก็บ ส่วนการสังเกตสี กลิ่น รส และการทดสอบทางประสาทสัมผัสอื่นๆของเนื้อที่มีการทดสอบจะเป็นที่ยอมรับของผู้ทดลอบชิม และเมื่อพิจารณาคุณภาพทางประสาทสัมผัสจะดีกว่าเนื้อที่ไม่ได้ผ่านการทดสอบ แสดงว่ากรดอินทรีย์และเครื่องเทศที่นำมาทดสอบมีคุณสมบัติเป็นสารต้านจุลินทรีย์ ช่วยควบคุมจุลินทรีย์ที่ทำให้เนื้อเน่าเสีย และพบว่าสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้

Conner และคณะ (1997 อ้างโดย อรัญญา สังขศรี, 2542) ทำการศึกษาถึงผลของกรดอินทรีย์ที่มีต่อเชื้อ *E. coli* 0157:H7 และ *Listeria monocytogenes* โดยใช้กรดอะซิติกและกรดแลกติกความเข้มข้นร้อยละ 2 และ 4 ฉีดพ่นลงในชิ้นเนื้อแล้วนำชิ้นเนื้อดังกล่าวมาบดตรวจนับเชื้อที่รอดชีวิตพบว่า สามารถลดจำนวนเชื้อ *E. coli* 0157:H7 ลง 0.1 log CFU ต่อมิลลิลิตร ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้น และลดเชื้อ *L. monocytogenes* ลง 0.36 log CFU ต่อมิลลิลิตร และ 0.40 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงว่ากรดอินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* 0157:H7 และ *Lis . monocytogenes*

Magnusson และคณะ (2003) ทำการเพาะเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* 21B ในอาหารเหลวพบว่าเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิต phenyllactic acid และ 4-hydroxy-phenyllactic acid ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราเส้นใยหลายสายพันธุ์ได้แก่ *Aspergillus fumigatus, Aspergillus nidulans, Penicillium commune, Fusarium sporotrichioides* โดย phenyllactic acid มีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) อยู่ในช่วง 7.5-10.5 mg/ml

2. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมในระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในจีนัส *Lactobacillus* และจะสะสมเพิ่มขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจาก *Lactobacillus* ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสที่จะไปเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Dasechel and Klaenhammer, 1989)

Anders และคณะ (1970) ได้รายงานว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.2 mmol/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactococcus* ได้ร้อยละ 50 และหากความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นเป็น 1.5 mmol/ml จะทำให้เซลล์ตายได้

Gilliland และ Speck (1977) พบว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สร้างจาก *Lactobacillus acidophilus* สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้

3. Diacetyl เป็นผลจากการย่อยสารอาหารของแบคทีเรียแลกติกบางสายพันธุ์ เป็นสารให้กลิ่น butter aroma ในผลิตภัณฑ์นมหมักและยังมีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์แต่ต้องใช้ปริมาณมาก (Dasechel and Klaenhammer, 1989)

4. Reuterin (3-hydroxy-propanal) พบว่า *Lactobacillus reuteri* บางสายพันธุ์สามารถสร้างสาร Reuterin ซึ่งเป็นสารโมเลกุลต่ำที่ไม่ใช่โปรตีน สามารถละลายได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Vogel *et al.*, 2002) ยีสต์ และรา (Schnurer and Magnusson, 2005) รวมทั้งโปรโตซัว (Daseche and Klaenhammer, 1989) จึงสามารถนำไปใช้ในการถนอมอาหารเพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

Ganzle และคณะ (2003) ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากขนมปัง พบเชื้อสายพันธุ์ *Lactobacillus reuteri* LTH2584 ที่สามารถผลิตสาร reutericyclin ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 349 ดาลตัน โดยสารตัวนี้แสดงการยับยั้งได้ในช่วงกว้างโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกรวมถึงแบคทีเรียก่อโรคที่สร้างสปอร์ ได้แก่ *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis* และ *Bacillus cereus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5. Microgard สามารถต่อต้านแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา แต่ไม่ต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวก ประกอบด้วย กรดโพรพิโอนิก ไดอะซิติล กรดอะซิติก และกรดแลกติก (Dasechel and Klaenhammer, 1989)

6. Bacteriocin แบคเทอริโอซินถูกใช้ครั้งแรกโดย Jacob และคณะในปี ค.ศ.1953 เพื่อใช้เรียกสารประกอบประเภทโปรตีนที่ผลิตโดยแบคทีเรียและมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยจุลินทรีย์ดังกล่าวมักเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน เช่น มีสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน หรือมีถิ่นที่อยู่ในบริเวณเดียวกันกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซิน คือ สารเปปไทด์ (Yang and Ray, 1994) หรือสารประกอบโปรตีน (Brink *et al.*,1994; Klaenhammer, 1988; Parente and Hill, 1992 and Pilet *et al.*, 1994) ที่สร้างจากแบคทีเรียซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน หรือสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่มีความไว

ต่อแบคเทอริโอซิน (Barefoot and Klaenhammer, 1983; Kawai *et al.*, 1994 and Nettles and Barefoot, 1993)

6.1 คุณสมบัติโดยทั่วไปของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียต่างชนิดกันมักมีคุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพที่แตกต่างกัน เช่น มีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน และมีกลไกการทำลายจุลินทรีย์เป้าหมายที่แตกต่างกัน เป็นต้น โดยที่ Tagg และคณะ (1976) เป็นผู้เริ่มต้นในการกำหนดลักษณะของแบคเทอริโอซิน ซึ่ง มีคุณสมบัติหลักๆดังต่อไปนี้

6.1.1 ต้องเป็นโปรตีน

ด้วยเหตุที่แบคเทอริโอซินต้องเป็นโปรตีน ดังนั้นการทดสอบว่าสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สนใจเป็นแบคเทอริโอซินหรือไม่ จึงมักทำการทดสอบโดยการใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ในการทำลายสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สนใจ ซึ่งถ้าเอนไซม์ย่อยโปรตีนสามารถทำลายสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สนใจได้แสดงว่าสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สนใจเป็นโปรตีน ดังนั้นสารดังกล่าวจึงน่าที่จะเป็นแบคเทอริโอซิน ซึ่งสารแบคเทอริโอซินหลายชนิดสามารถถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น pepsin, trypsin และ pronase เป็นต้น ตัวอย่างเช่นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. plantarum* ถูกลดกิจกรรมการยับยั้งด้วยเอนไซม์ proteinase K, papain, trypsin, chymotrypsin, pronase, pepsin และ protease (Todorov and Dicks, 2005)

6.1.2 ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยการทำลายจุลินทรีย์ (bacteriocidal) หรือโดยการหยุดการเจริญของจุลินทรีย์ (bacteriostatic)

แบคเทอริโอซินบางชนิดจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยการทำลายจุลินทรีย์ เช่น Plantaricin KW 30 ซึ่งผลิตโดย *L. plantarum* KW 30 (Kelly *et al.*, 1996) และ Acidocin J 1229 ซึ่งผลิตโดย *L. adcidophilus* JCM 1229 (Tahara and Kanatani, 1996) เป็นต้น ในขณะที่แบคเทอริโอซินบางชนิดจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยการหยุดการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ไม่ทำลายจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. sake* 148 (Sobrino *et al.*, 1991) เป็นต้น

6.1.3 สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะ

คุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ที่จำเพาะของแบคเทอริโอซินทำให้แบคเทอริโอซินแตกต่างจากสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิดที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติก เช่น กรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แบบไม่จำเพาะ การที่แบคเทอริโอซินสามารถไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะ เนื่องจากก่อนที่แบคเทอริโอซินจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไวต่อแบคเทอริโอซิน (sensitive strain) ได้

แบคเทอริโอซินต้องไปจับกับตำแหน่งจับที่จำเพาะ (specific binding site หรือ specific receptor) ซึ่งมักอยู่ที่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ไวต่อแบคเทอริโอซิน เช่น จากการศึกษา Pediocin AcH ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Pediococcus acidilactici* พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายสายพันธุ์ เช่น *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Listeria*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Brochothix*, *Clostridium botulinum* E เป็นต้น โดยการที่ Pediocin AcH มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้นั้น เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะมีโมเลกุลของกรด lipoteichoic ซึ่งเป็น receptor ของ Pediocin AcH ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกเกิดขึ้น ในขณะที่ในแบคทีเรียแกรมลบจะไม่มีโมเลกุลของกรด lipoteichoic จึงทำไม่สามารถดูดซับ Pediocin AcH ได้ จึงไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ (Ray, 1992 and Bhunia *et al.*, 1991)

6.1.4 ต้องถูกสังเคราะห์โดยการถอดรหัสทางพันธุกรรม

เนื่องจากแบคเทอริโอซินเป็นโปรตีน ดังนั้นในการสังเคราะห์แบคเทอริโอซินต้องผ่านกระบวนการ transcription และ translation เพื่อถอดรหัสทางพันธุกรรมจากยีนสำหรับแบคเทอริโอซิน (bacteriocin gene) โดยยีนสำหรับแบคเทอริโอซินอาจเป็นยีนที่อยู่ใน plasmid หรือ chromosome ก็ได้ ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่ถูกสังเคราะห์โดยการถอดรหัสทางพันธุกรรมจากยีนสำหรับแบคเทอริโอซินที่อยู่ใน plasmid เช่น Coagulin ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Bacillus coagulans* I_4 (Hyronimus *et al.*, 1998) เป็นต้น และตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่ถูกสังเคราะห์โดยการถอดรหัสทางพันธุกรรมจากยีนสำหรับแบคเทอริโอซินที่อยู่ใน chromosome ได้แก่ Plantaricin D ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. plantarum* BFE 905 (Franz *et al.*, 1998) และ Plantaricin KW 30 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. plantarm* KW 30 (Kelly *et al.*, 1996) เป็นต้น

6.2 การจำแนกแบคเทอริโอซิน (Classification of bacteriocins)

การจำแนกแบคเทอริโอซินสามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนก เช่น สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน มวลโมเลกุลของแบคเทอริโอซิน โครงสร้างทางเคมีของแบคเทอริโอซิน และกลไกการทำงานของแบคเทอริโอซิน เป็นต้น

Klaenhammer (1988) แบ่งแบคเทอริโอซินตามความสามารถในการยับยั้งเป็น 2 ชนิด คือ

1. แบคเทอริโอซินที่มีผลการยับยั้งในช่วงแคบ (narrow inhibitory spectrum) เป็นแบคเทอริโอซินที่มีผลยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียในจีนัส (genus) เดียวกัน เช่น Diplococcin จากเชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *cremolis* 346 ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม lactococci หรือยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มอื่นได้เล็กน้อย เช่น Lactacin F ยับยั้ง lactobacilli และ *Enterococcus faealis*

2. แบคเทอริโอซินที่มีผลในการยับยั้งในช่วงกว้าง (broad inhibitory spectrum) จัดเป็นแบคเทอริโอซินที่มีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ เช่น Nisin จากเชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้ Pediocin AcH จากเชื้อ *Pediococcus acidilactici* ยับยั้ง pediococci, lactobacilli, *Leuconostoc*, bacilli, enterococci, staphylococci, listeriae และ *Clostridium*

Klaenhammer (1993) แบ่งแบคเทอริโอซินตามลักษณะโครงสร้างมวลโมเลกุลและความคงตัวต่อความร้อนได้เป็น 4 ชนิด

1. lantibiotic เป็นแบคเทอริโอซินที่มีขนาดเล็กและมีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบประมาณ 19–37 โมเลกุล ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิด α, β-unsaturated ประกอบด้วย dehydroalanine และ dehydrobutyrine และกรดอะมิโนชนิดthioether ซึ่งประกอบด้วย lanthionine และ β-methyllanthionine โดยไม่มีกรดอะมิโนชนิดวงแหวนเป็นองค์ประกอบ มีพันธะ thioether 5 พันธะ ทำให้มีความแตกต่างจากแบคเทอริโอซินชนิดอื่นๆแบ่งได้เป็น 2 ชนิดย่อยๆ คือ

1.1 lantibiotic ชนิด A ซึ่งมีลักษณะโครงร่างเป็น screw-shaped มีมวลโมเลกุลประมาณ 2,164–3,488 ดาลตัน เช่น Nisin จากเชื้อ *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* และ Lactacin F จากเชื้อ *Lactobacillus sake* L45

1.2 lantibiotic ชนิด B ซึ่งมีลักษณะโครงร่างเป็น globular-shaped มีมวลโมเลกุลประมาณ 1,959-2,014 ดาลตัน เช่น Ancovonin จากเชื้อ *Streptomyces* sp.

2. non-lantibiotic ขนาดเล็ก เป็นแบคเทอริโอซินที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 15,000 ดาลตัน มีความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มากกว่า 30 นาที เช่น Lactacin B จากเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* N2 และ *Lactobacillus lactis* ssp. *cremolis* 346 หรือที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เช่น Lactacin F จากเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* 11088

3. non-lantibiotic ขนาดใหญ่ เป็นแบคเทอริโอซินที่มวลโมเลกุลมากกว่า 15,000 ดาลตัน ไวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 60–100 องศาเซลเซียส 10–15 นาที เช่น Caseicin 80 จากเชื้อ *Lactobacillus casie* B80

4. complex bacteriocin เป็นแบคเทอริโอซิที่มีโครงสร้างเปปไทด์ที่มีไขมันหรือคาร์โบไฮเดรตเกาะอยู่เช่น Lactacin 27 จากเชื้อ *Lactobacillus helveticus* LP27 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินชนิดไกลโคโปรตีน

อย่างไรก็ตาม แม้จะมีแบคเทอริโอซินจำนวนมากที่สามารถนำมาใช้เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร แต่ Nisin เป็นตัวเดียวที่ถูกนำไปทำการผลิตในระดับอุตสาหกรรม และได้รับอนุญาตให้นำไปใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหารซึ่งจะต้องทำให้อยู่ในรูปที่บริสุทธิ์เสียก่อน

6.3 กลไกการทำปฏิกิริยา

Hoover และคณะ (1993) ได้รายงานว่าการทำลายแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดย Nisin เกิดขึ้นได้โดยมีการดูดซับ (adsorption) Nisin ไปยัง cell envelope ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ตามด้วยการทำลายกิจกรรม (inactivation) ของ sulfhydryl groups และจากการรายงานของ Murina (1996) พบว่าโมเลกุลของแบคเทอริโอซินซึ่งมีโครงสร้างแบบ α-helical หรือ β-sheet จะไปเกิด poration complexes ในเยื่อหุ้มเซลล์ เกิดการฉีกขาดและเซลล์สูญเสียความสามารถในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ มีผลให้เซลล์แบคทีเรียที่ไวต่อแบคเทอริโอซินถูกทำลายได้ โดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกเป็น antimicrobial peptides ที่สังเคราะห์จากไรโบโซม ซึ่งการยับยั้งจะจำเพาะโดยตรงต่อแบคทีเรียแกรมบวกแต่จะไม่มีผลในการยับยั้งเซลล์ที่สร้างแบคเทอริโอซิน (Bruno and Montville, 1993)

6.4 ความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินกับสารปฏิชีวนะ (antibiotic)

ถึงแม้แบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะจะมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ แต่สารทั้งสองชนิดนี้ก็มีความแตกต่างกันหลายประการดังนี้

- แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบประเภทโปรตีนซึ่งถูกสังเคราะห์โดยการถอดรหัสสารพันธุกรรมจากยีน ในขณะที่สารปฏิชีวนะเป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีได้หลายรูปแบบ และมักถูกสังเคราะห์โดยการเปลี่ยนแปลง primary metabolite ไปเป็น secondary metabolite ก่อนที่จะถูกหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์

- แบคเทอริโอซินจะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะ และโดยส่วนใหญ่แล้วจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งการเจริญโดยแบคเทอโอซินมักเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ในขณะที่สารปฏิชีวนะบางชนิดเท่านั้นที่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะ

6.5 รายงานการวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอซิน

Brink และคณะ (1994) แยกเชื้อ *Lactobacillus* จากแตงกวาดอง เนยแข็ง ไส้กรอกหมัก หญ้าหมัก ช่องปาก และทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ 1,000 ไอโซเลต และพบว่ามีเพียง 8 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น และได้คัดแยกเชื้อ *Lactobacillus salivarisin* M7 ซึ่งสร้าง Salivarisin B สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, Brochotrix thermosphacta, Enterococcus faecalis* และ *Lactobacillus* อีกหลายสายพันธุ์ ส่วนเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* M46 สร้าง Acidocin B ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *Clostridium sporogines* และมีความไวต่อเอนไซม์ทริปซิน รวมทั้งสามารถทนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

Samelis และคณะ (1994) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus sake* 251 จากไส้กรอกหมัก พบว่า เชื้อ *Lactobacillus sake* 251 สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน Sakacin B เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS โดยเชื้อจะสร้างประกอบโปรตีนชนิดนี้มากที่สุดในช่วงปลายของระยะ exponential phase โดย Sakacin B มีความเสถียรในช่วงพีเอช 2.0-9.0 และมีความคงทนต่อความร้อน

Ivanova และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Streptococcus thermophilus* 81 พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้นสามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* และ *Yersinia enterocolitica* โดยกิจกรรมของแบคเทอริโอซินจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่พีเอชระหว่าง 3.0-10.0 และเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน ก็ไม่เกิดผลกระทบต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินดังกล่าวแต่อย่างใด

Ogunbanwo และคณะ (2003) ศึกษาสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus brevis* OG1 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในอาหาร โดยยับยั้งเชื้อ *E. coli* NCTC 10418 และ *Enterococcus faecalis* นอกจากนี้ยังพบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS ร่วมกับ yeast extracts (3.0%), NaCl (1.0-2.0%), glucose (1.0 %) และ Tween 80 (0.5%) ที่พีเอชเริ่มต้น 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะมีผลทำให้เชื้อ *Lactobacillus brevis* OG1 เพิ่มการผลิตแบคเทอริโอซิน

Savadogo และคณะ (2004) ทำการคัดแยกเชื้อ 8 สายพันธุ์ ของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากนมหมัก เมื่อทำการเทียบเคียงพบว่าเป็น *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus* spp., *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesneteroides* และ *Lactococcus* จากนั้นเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แบคเทอริโอซินที่คัดแยกได้สามารถยับยั้งเชื้อ *Enterococcus faecalis* 103907 CIP เมื่อทดสอบด้วยวิธี Agar drop diffusion test โดยกิจกรรมของแบคเทอริโอซินจะไวต่อเอนไซม์ chymotrypsin, trypsin และ pepsin แต่ทนต่อเอนไซม์ lipase และ catalase ในขณะที่เอนไซม์ amylase ไม่มีผลต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

Aslim และคณะ (2005) ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากผลิตภัณฑ์นมในประเทศตุรกี ได้แก่ *Lactobacillus bulgaricus* (6 สายพันธุ์), *Lactobacillus casei* (4 สายพันธุ์), *Lactobacillus plantarum* (2 สายพันธุ์), *Lactobacillus acidophilus* (2 สายพันธุ์), *Lactobacillus brevis* (2 สายพันธุ์), *Lactobacillus fermentum* (1 สายพันธุ์), *Lactobacillus lactis* (1 สายพันธุ์) และ *Lactobacillus helveticus* (1 สายพันธุ์) เมื่อทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Yersinia enterocolitica* พบว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิต

จากทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ดังกล่าว โดยแบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้นจะไม่ถูกทำลายด้วยความร้อนและยังคงมีกิจกรรมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ศิรินาถ หนูเอก (2540) แยกเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) จากอาหารหมักประเภทส้มฟักพบว่า แบคทีเรีย SN11 สามารถสร้างแบคเทอริโอซินที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus, Lactobacillus sake, Carnobacterium* sp. M11-25, *Escherichia coil, Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* 018 และ *Lactobacillus plantarum* โดยมีการเจริญและสร้างสารยับยั้งได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 5.5 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส แบคเทอริโอซินที่ผลิตได้ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน จึงยังคงมีกิจกรรมที่อุณหภูมิสูง 90 องศาเซลเซียส เวลา 45 นาที มีความคงตัวที่ pH ระหว่าง 5.0-7.0 แต่ให้ค่ากิจกรรมสูงสุดที่ pH 4.0 และมีความไวต่อเอนไซม์ trypsin, α-chymotrypsin, pronase-E และ pronase-K แต่ทนต่อเอนไซม์ catalase

อัจฉรา หนูเพชร และคณะ (2547) ทำการแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักได้แบคทีเรียแลกติก 327 สายพันธุ์ พร้อมทั้งทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก ได้แก่ สามารถทนเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 ทนกรดที่ระดับพีเอช 2.0, 3.0 และ 4.0 สามารถย่อยโปรตีน ไขมันและแป้ง เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน และสามารถเจริญในสภาวะที่ปราศจากวิตามินบี 12 สามารถคัดเชื้อที่มีคุณสมบัติดังกล่าวได้ 67 สายพันธุ์ และเมื่อทดสอบการยับยั้งโดยวิธี Agar spot พบว่า มีแบคทีเรียแลกติก 5 สายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ทดสอบได้ทั้ง 13 สายพันธุ์ โดยมีขอบวงใสของการยับยั้งมากกว่า 10 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปทดสอบการยับยั้งโดยวิธีเพาะเลี้ยงร่วมกันพบว่า จะมีการยับยั้งอยู่ระหว่างร้อยละ 80-100 เมื่อทดสอบความสามารถในการอยู่รอดที่ระดับพีเอช 2.0, 3.0 และ 4.0 ในเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า สามารถอยู่รอดที่ระดับพีเอช 4.0 ได้เกือบร้อยละ 100 ส่วนที่พีเอช 2.0 และ 3.0 มีจำนวนลดลง 1 log cycle โดยสายพันธุ์ LA71 (*Lactobacillus plantarum*) สามารถอยู่รอดได้ดีที่สุด

7. Low-molecular-mass (LMM) สารกลุ่มนี้สามารถต่อต้านได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดย Niku-Paavola และคณะในปี ค.ศ. 1999 รายงานว่า สารประกอบกลุ่ม LMM จะเป็นกลุ่มสารพวก small hydrophobic heterocyclic หรือ aromatic structured ซึ่งจะมีความคล้ายกับ benzoic acid (pKa = 4.19) สามารถทำงานได้ดีที่พีเอชต่ำและมีความคงตัวต่อความร้อน (Brul and Coote, 1999)

Bello และคณะ 2007 ทำการศึกษาปรับปรุงคุณภาพและยืดอายุการเก็บของขนมปังโดยการใช้สารยับยั้งที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 เมื่อทดสอบการยับยั้งกับเชื้อรา พบว่า

สามารถคัดเลือกสารที่จุลินทรีย์ชนิดนี้ผลิตคือ กรดแลกติก, phenyllactic acid และ cyclic dipeptides คือ cyclo(L-Leu-L-Pro) และ cyclo(L-Phe-L-Pro) ซึ่งแสดงการยับยั้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ

นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียแลกติกสามารถผลิตสารยับยั้งที่มีโมเลกุลขนาดเล็กแต่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ เช่น *Lactobacillus delbrueckii* supsp. *bulgaricus* 7994 ผลิตสารยับยั้งที่มีโมเลกุลเล็กกว่า 700 ดาลตัน และสามารถยับยั้ง *Pseudomonas fragi* และ *Staphylococcus aureus* (Abdel-Bar, 1987 อ้างโดย ชุตินันท์ รัตนไพบูลย์สวัสดิ์, 2547) *Lactobacillus casei* GG ผลิตสารยับยั้งที่มีโมเลกุลเล็กกว่า 1,000 ดาลตัน ทนความร้อน ไม่มีสมบัติเป็นโปรตีน แสดงกิจกรรมยับยั้งในสภาวะที่เป็นกรดมีค่าพีเอชในช่วง 3-5 สามารถยับยั้ง *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp. และ *Bacillus* sp. (Elo and Salminen, 1994 อ้างโดย ชุตินันท์ รัตนไพบูลย์สวัสดิ์, 2547) และ *Lactobacillus acidophilus* ผลิตสารยับยั้งโมเลกุลเล็กกว่า 200 ดาลตัน โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ได้ (Hamdan and Mikolajik, 1994 อ้างโดย ชุตินันท์ รัตนไพบูลย์สวัสดิ์, 2547)

8. กรดไขมัน (Fatty acids) จากการแยกสารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14 ในอาหารเหลว พบว่ามี fatty acid คือ 3-hydroxylated fatty acid ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ โดยฤทธิ์ต้านเชื้อราจะเพิ่มขึ้นตามความยาวของ chain ที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่า caprylic acid (C_8) และสายที่ยาวกว่านี้จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้สูงสุด มีรายงานการทดสอบฤทธิ์ของ fatty acid และ monoglyceride ต่อการเจริญของ *Candida albicans* พบว่าที่ความเข้มข้น 10 mM ของ fatty acid มีเพียง capric acid (C_{10}) และ lauric acid (C_{12}) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์นี้ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า fatty acid จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ดีกว่าเชื้อรา โดยค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของ hydroxylated fatty acid ต่อเชื้อราและยีสต์จะอยู่ในช่วง 10-100 g/ml ซึ่งถ้าเปรียบเทียบกับ Amphotericin B ซึ่งมีค่า MIC อยู่ในช่วง 10-100 กรัมต่อมิลลิลิตร เช่นกัน (Schnurer and Magnusson, 2005)

Nieman (1954 อ้างโดย James and Nicoholas, 1980) พบว่า โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียแกรมบวกจะมีความไวต่อสารในกลุ่มของ long chain fatty acids มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งสารพวก long chain fatty acids (C_{12}, C_{14}, C_{16}, $C_{18:1}$) นี้สามารถแสดงผลการยับยั้งได้ในสภาวะเป็นกรด นอกจากนี้ Kondo และ Kanai (1972 อ้างโดย James and Nicoholas, 1980) ยังพบว่า long chain fatty acids (C_{14}, $C_{18:1}$, $C_{19:2}$) สามารถแสดงผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ในการทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์หลายท่านพบว่า สารพวก long chain fatty acids มีฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งเชื้อแบคทีเรีย รา และยีสต์ โดย fatty acid ที่เป็นสายตรง (C_{12}), monosaturated fatty acid

($C_{16:1}$) และ polysaturated fatty acid ($C_{18:2}$) สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุดของสารแต่ละกลุ่ม โครงสร้างของ fatty acid ที่เป็น cis แสดงการยับยั้งได้มากกว่าโครงสร้างที่เป็น trans นอกจากนี้สารพวก short chain lengths (C_{10}-C_{12}) สามารถยับยั้งยีสต์ได้ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบจะมีความไวต่อ very-short-chain fatty acids จากการศึกษาของ Kabara (1955 อ้างโดย James and Nicoholas, 1980) ยังพบอีกว่าสารในกลุ่ม acetylenic fatty acids มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่าสารในกลุ่ม ethylenic fatty acids

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าแบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างสารยับยั้งต่างๆที่มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียทำให้สามารถเก็บรักษาอาหารได้ยาวนานมากยิ่งขึ้น สารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกจัดเป็นสารกันเสียชีวภาพ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติกที่มีฤทธิ์ยับยั้ง

Table 1. Products of lactic acid bacteria (LAB) with broad inhibitory spectrum.

แบคทีเรียแลกติก	ผลิตภัณฑ์
Lactobacillus plantarum	low-molecular-mass compounds (benzoic acid, cyclo(glycyl-L-leucyl), mevalonolactone, methyl hydantoin)
Lactococcus spp.	Diacetyl
Lactobacillus reuteri	Reuterin
Lactobacillus acidophilus N2	Lactacin B
Lactobacillus helveticus	Helveticin B
Lactobacillus plantarum	Plantacin A
Lactobacillus lactis ssp. *lactis*	Nisin
Pediococcus acidilactici	Pediocin AcH
Lactobacillus acidophilus M46	Acidocin N
Enterococcus feacium	Enterocin EL1
Lactobacillus casei B80	Caseicin 80
Lactobacillus cremoris 346	Diplococcin
Lactobacillus lactis CNRZ481	Lactacin 481

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Table 1. (Cont.)

แบคทีเรียแลกติก	ผลิตภัณฑ์
Lactobacillus sake	Sakacin P
Lactobacillus sake	Sakacin K
Pediococcus acidilactici	Pediocin AcH/PA-1/SJ-1
Pediococcus parvulus	Pediocin AcH/PA-1/SJ-1
Lactobacillus plantarum	Pediocin AcH/PA-1/SJ-1
Leuconostoc gelidium	Leucosin A/B-Talla
Leuconostoc carnosum	Leucosin A/B-Talla
Leuconostoc mesenteroides	Mesentericin Y105
Enterococcus faecium	Enterocin A
Enterococcus faecium	Enterocin P
Enterococcus faecium	Enterocin B

ที่มา: ดัดแปลงจาก Schillinger (1990); Brink และคณะ (1994); Lyon และคณะ (1995); Hoover และ Tyopponena และคณะ (2003)

6. แบคทีเรียก่อโรคทางอาหาร

6.1 *Staphylococcus aureus* (พิไลพรรณ พงษ์พูล, 2531)

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

Staphylococcus เป็นแบคทีเรียใน family Micrococcaceae มีรูปร่างกลม ไม่เคลื่อนที่ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8-1.0 μm ติดสีแกรมบวก เรียงตัวเป็นรูปคล้ายพวงองุ่น เมื่อย้อมแกรมจะเห็นว่าอยู่เป็นเดี่ยวๆ เป็นคู่ และอยู่กันเป็นกลุ่มต่อกันเป็นสายโซสั้นๆ มีน้อยชนิดที่สร้างแคปซูลซึ่งไปเพิ่มความรุนแรงทำให้เกิดโรค

Staphylococcus เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) แต่ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในที่ที่มีอากาศ บางสายพันธุ์ต้องใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในการเจริญด้วย สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 6.5-46 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 30-37 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมคือ 7.0-7.5 แต่สามารถเจริญได้ที่พีเอช 4.2-9.3 ต้องการ growth factor

2 ชนิด คือ adenine และ thiamine แต่เมื่อเจริญในสภาพที่ไม่มีอากาศจะต้องการ uracil และ pyruvate สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เช่น nutrient agar

ใน agar plate โคโลนีของ *Staphylococcus* มีลักษณะกลมเรียบ นูนเล็กน้อย มีขนาดตั้งแต่ 1-4 มิลลิเมตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง โคโลนีจะขุ่นและทึบแสงมากกว่า *Streptococcus* และ *Pneumococcus* โคโลนีของสายพันธุ์ *Staphylococcus aureus* จะมีสีเหลืองทอง สีเกิดขึ้นเนื่องจากรงควัตถุพวก carotenoid บางครั้งพบว่าโคโลนีมีสีตั้งแต่สีส้มจัดจนถึงสีเหลืองอ่อนทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพการเลี้ยง

การทำให้เกิดโรค

Staphylococcus aureus มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในอาหารหลายชนิด โดยเชื้อปนเปื้อนในอาหารเหล่านี้ทางแผล ฝี หนอง ที่ผิวหนังของผู้ปรุงอาหาร เช่น อาหารพวกดัสตาร์ด สลัด อาหารพวกเนื้อและผลิตภัณฑ์นม (dairy product) อาหารที่ปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* จะมีกลิ่นรสปกติ

อาการจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) A, B, C1, C2, D และ E ภายในเวลา 1-6 ชั่วโมง ยิ่งบริโภค enterotoxin มากอาการยิ่งเกิดขึ้นรวดเร็วและรุนแรง enterotoxin ที่พบบ่อยคือ A และ D ทำให้เกิดอาการอักเสบของเซลล์บุทางเดินอาหารและถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตแล้วกลับมาทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ โดยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องร่วง แต่มักไม่มีไข้และมักหายเองภายใน 24 ชั่วโมง แต่อาจเกิดอาการรุนแรงได้ในทารก คนชรา หรือผู้ที่มีร่างกายอ่อนแอ

6.2 *Bacillus cereus* (พิไลพรรณ พงษ์พูล, 2531)

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

Bacillus เป็นแบคทีเรียใน family Bacillaceae รูปแท่ง ขนาด 1.0-1.2 x 3.0-10 ไมโครเมตร มักจะเรียงตัวเป็นสายมีสปอร์เป็นรูปไข่อยู่ตรงกลาง สปอร์ไม่ใหญ่กว่าตัวเซลล์ ติดสีแกรมบวก ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้และไม่มีแคปซูล

การทำให้เกิดโรค

พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ เช่น ในอากาศ น้ำ ดิน และพืชผักต่างๆ เจริญได้ในที่มีอากาศและมีสปอร์ที่ทนความร้อน ถ้าสปอร์อยู่ในอาหารที่ปรุงเรียบร้อยแล้วและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส สปอร์จะงอกเพิ่มจำนวนและสร้าง toxin เมื่อทานอาหารที่ปนเปื้อนเข้าไปทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษซึ่งมีลักษณะอาการ 2 แบบ คือ

1) ถ้าบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนด้วยสายพันธุ์ที่สร้างทอกซินที่ทำให้ท้องเสีย (diarrheal toxin) จะมีระยะฟักตัวนานประมาณ 8-17 ชั่วโมง จึงเกิดอาการปวดท้อง ท้องเสีย บางรายมีอาการ

อาเจียน อาการจะเป็นนานเฉลี่ย 12-24 ชั่วโมง อาหารที่มักจะเป็นต้นเหตุได้แก่ อาหารพวกเนื้อ น้ำซุป และน้ำซอส

2) ถ้าบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนด้วยสายพันธุ์ที่สร้างทอกซินที่ทำให้อาเจียน (vomiting หรือ emiting toxin) toxin นี้ทนต่อความร้อน จะทำให้เกิดอาการขึ้นหลังจากรับประทาน 1-5 ชั่วโมง มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง 1 ใน 3 ของผู้ป่วยจะมีอาการท้องเสีย อาการจะเป็นนาน 6-24 ชั่วโมง อาหารที่มักจะเป็นต้นเหตุได้แก่ ข้าวผัด

6.3 *Listeria monocytogenes* (สุมาลี เหลืองสกุล, 2535)

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

Listeria monocytogenes เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ท่อนสั้น มักเรียงตัวเป็นสายต่อกัน 3-5 เซลล์ หรือมากกว่านั้น เซลล์มีอายุ 18-24 ชั่วโมง ไม่สร้างสปอร์หรือแคปซูล อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตคือ 37 องศาเซลเซียส แต่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 2.5 องศาเซลเซียส สามารถอยู่รอดในที่ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 20 นาน 8 สัปดาห์ และสามารถทนความร้อนได้ดี *Listeria monocytogenes* สามารถพบได้ทั่วไปในน้ำ น้ำเสีย อุจจาระคนและสัตว์ สำหรับในอาหารที่มักพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้แก่ นม เนื้อ ไก่ และอาหารทะเล เป็นต้น

การทำให้เกิดโรค

Listeria monocytogenes เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค Listeriosis ซึ่งมีอาการโลหิตเป็นพิษและเยื่อหุ้มสมองอักเสบมักพบในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันอ่อนแอหรือทารกที่เกิดจากมารดาที่ได้รับเชื้อขณะตั้งครรภ์

6.4 *Escherichia coli* (พิไลพรรณ พงษ์พูล, 2531)

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) ขึ้นได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ MacConkey จะให้โคโลนีสีชมพูหรือสีแดงเนื่องจากการสลายแลกโตส บนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB (Eosin methylene blue) จะให้โคโลนีมีลักษณะสะท้อนแสงแววาวที่เรียกว่า metallic sheen

การทำให้เกิดโรค

Escherichia coli มีถิ่นอาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น ปกติจะไม่ก่อโรค (normal microbiota) แต่มีบางสายพันธุ์ก่อโรคในเนื้อเยื่อและอวัยวะบางอย่างได้ โดยมากจะเป็นกับระบบทางเดินปัสสาวะ นอกจากนี้ยังก่อโรคท้องร่วงได้ กลุ่มของ *Escherichia coli* ที่ทำให้เกิดโรคท้องร่วงแบ่งเป็น

Enterotoxicgenic *Escherichia coli* (ETEC)

ทำให้เกิดการท้องร่วงอย่างอ่อนจนถึงขั้นรุนแรง ETEC สร้าง enterotoxin 2 ชนิด คือ

1) heat-labile toxin (LC) เป็น toxin ที่ถูกทำลายด้วยความร้อน ออกฤทธิ์เช่นเดียวกับ cholera toxin (CT) ซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ adenyl cyclase ในลำไส้เป็นผลให้เอนไซม์นี้มีปริมาณมากขึ้น ทำให้ adenosine triphosphate (ATP) เปลี่ยนเป็น cyclic adenosine monophosphate (C-AMP) และเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์โดยมีการขับน้ำและเกลือแร่ต่างๆ ออกมาสู่ทางเดินอาหารเป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดอาการท้องร่วงคล้ายอหิวาตกโรค

2) heat-stable toxin (ST) เป็น toxin ที่ทนต่อความร้อน ทำให้เกิดท้องร่วงในเด็กทารก มักระบาดในสถานเลี้ยงเด็ก ซึ่งเป็นสาเหตุของการตายของทารกในประเทศที่กำลังพัฒนา ส่วนในผู้ใหญ่ทำให้เกิด traveller's diarrhea คือ เกิดการท้องร่วงกับนักท่องเที่ยวที่เดินทางเข้าไปในประเทศที่กำลังพัฒนา

Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC)

เป็น *Escherichia coli* ที่สามารถบุกรุกเซลล์เยื่อบุของลำไส้ใหญ่ ทำให้เกิดอาการคล้ายโรคบิด คือ มีไข้ เป็นตะคริว ท้องร่วง ถ่ายเป็นมูกเลือด

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)

เป็นสาเหตุของการเกิดโรคท้องร่วงเนื่องจากจะเข้าไปทำให้เกิดการติดเชื้อที่ epithelial cell ในชั้น mucosa ของลำไส้ เมื่อเข้าไปแล้วจะเพิ่มจำนวนอย่างมากมายและปล่อยสารพิษออกมาทำให้เกิดอาการท้องร่วง มักจะระบาดในทารกแรกคลอดในสถานรับเลี้ยงเด็ก

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)

ทำให้เกิด hemorrhagic colitis คือ ถ่ายเป็นเลือดอย่างมากแต่ไม่มีไข้

Enteroautoagglutinate *Escherichia coli* (EAggEC)

ทำให้เกิดอาการท้องร่วงในเด็กที่อายุต่ำกว่า 6 เดือน

การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

สิ่งที่ส่งตรวจเป็นอุจจาระหรือปัสสาวะ ในกรณีที่เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะนำมาขีดบน blood agar และ MacConkey agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สายพันธุ์ที่ก่อโรคจะเจริญบน MacConkey agar โดยจะให้สีชมพู ทำการทดสอบทางชีวเคมี ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคจะไม่เจริญบน MacConkey agar และ blood agar

โดยสรุปสิ่งส่งตรวจเป็นอุจจาระ ควรลงใน blood agar, MacConkey agar และ SS agar เพื่อป้องกันความผิดพลาด สำหรับ *Escherichia coli* เมื่อโคโลนีขึ้นมาแล้ว ทดสอบ TSI agar ให้ผล acid slant acid butt และสร้างก๊าซ ไม่ให้ H_2S ทดสอบ IMViC test ให้ผล ++-- จะบอกได้ว่าเป็น

Escherichia coli แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็น pathogenic *Escherichia coli* หรือไม่ ต้องคัดเลือกโคโลนีไปทำทาง serology

6.5 *Vibrio parahaemolyticus* (อรษา สุตเธียรกุล, 2541)

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่งขนาด 0.5-0.8 x 1.4-2.6 μm สามารถเจริญได้ในที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) จัดเป็นพวก mesophile คือ เจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 15-42 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญคือ 30-35 องศาเซลเซียส ช่วง pH ที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญ คือ 7.6-8.6 ต้องการเกลือโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญ (halophile) โดยเจริญได้ในเกลือโซเดียมคลอไรด์มีความเข้มข้นอยู่ระหว่างร้อยละ 0.5-8.0 แต่ความเข้นข้นที่เหมาะสมที่สุด คือ ร้อยละ 2-3

แหล่งของโรค

Vibrio parahaemolyticus พบได้ในน้ำทะเลทั่วโลก บริเวณชายฝั่งทะเล ตะกอนโคลน (sediment) อนุภาคแขวนลอย (suspened particles) แพลงค์ตอน ปลา ปู กุ้ง และหอย การกระจายตัวของเชื้อในสิ่งแวดล้อมขึ้นอยู่กับความแตกต่างของฤดูกาล ในช่วงฤดูร้อนจะพบเชื้อมากกว่าฤดูหนาว จะพบเชื้อได้น้อยในน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 13-15 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส เชื้อจะไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อได้ใน zooplankton และเพิ่มจำนวนมากขึ้นในทะเล สำหรับประเทศไทยอุณหภูมิทั้งปีไม่แตกต่างกันมากนักดังนั้นการระบาดของเชื้อจึงพบได้ทุกเดือนตลอดทั้งปี บริเวณอ่าวไทยตอนบนซึ่งมีประชากรอยู่หนาแน่นจะมีการปนเปื้อนและแพร่กระจายของเชื้อ *V. parahaemolyticus* มากกว่าบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน

การทำให้เกิดโรค

Virulence factor ที่สำคัญแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1) Thermostable direct hemolysin (tdh)

V. parahaemolyticus จะพบอยู่ทั่วไปในน้ำทะเลและปนเปื้อนในอาหารทะเลต่างๆ แต่ไม่ใช่ทุกสายพันธุ์ที่ทำให้เกิด gastroenteritis พบว่าสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคจะสามารถสร้าง hemolysin ซึ่งทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหรือสัตว์แตกแบบสมบูรณ์ (β-hemolysis) ดังนั้น hemolysin นี้จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดโรค (virulence factor) ซึ่งต่อมาเรียกว่า thermostable direct hemolysin (tdh) เนื่องจากไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากการศึกษาในเวลาต่อมา tdh เป็น spore-forming toxin คือ ออกฤทธิ์โดยตรงกับเม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดรูและเซลล์แตกในเวลาต่อมา

2) Thermostable direct hemolysin-related hemolysin (trh)

พบครั้งแรกในปีพ.ศ. 2528 ที่เกาะ Maldives มีรายงานผู้ป่วยท้องร่วงจากการรับประทานอาหารทะเล 51 ราย พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* สามารถสร้าง hemolysin ชนิดใหม่ คือ trh ซึ่งเป็นโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน 189 ตัว มีฤทธิ์คล้ายคลึงกับ tdh คือทำให้เม็ดเลือดแดงของสัตว์บางชนิดแตกทำให้เกิดการสะสมน้ำในลำไส้ เพิ่มการซึมผ่านของของเหลวออกจากหลอดเลือดที่ผิวหนัง และมีผลต่อกล้ามเนื้อหัวใจ

V. parahaemolyticus ก่อให้เกิด gastroenteritis เมื่อผู้ป่วยรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าไปประมาณ 106-109 ตัว ระยะฟักตัวประมาณ 4-9 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อและภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย อาการที่แสดงออกที่สำคัญคือ อุจจาระร่วง ปวดท้อง (abdominal cramps) คลื่นไส้อาเจียน อาจมีไข้ ผู้ป่วยบางรายอุจจาระอาจมีมูกเลือดปน ระยะเวลาในการป่วยประมาณ 2-3 วัน ในรายที่รุนแรงอาจนานกว่า 1-2 อาทิตย์ โดยปกติมักหายเอง

6.6 *Salmonella* (พิไลพรรณ พงษ์พูล, 2531)

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

Salmonella มีลักษณะเป็นท่อนสั้นๆ เคลื่อนที่ได้รวดเร็ว ไม่สร้างสปอร์ ติดสีแกรมลบ เป็น aerobic gram negative rod ไม่สามารถ ferment lactose ก่อโรคในลำไส้สัตว์เลือดอุ่นได้หลายชนิด รวมทั้งมนุษย์ด้วย บางสายพันธุ์ที่แยกเชื้อได้ใหม่ๆจะมีแคปซูลทำให้โคโลนีมีลักษณะมูก

Antigenic structure

Salmonella มี antigen อยู่ 3 ชนิด คือ

1) Somatic antigen (O) เป็นส่วนของผนังเซลล์ มีคุณสมบัติเหมือน O-antigen ของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ คือ ทนความร้อน ทนกรด และแอลกอฮอล์

2) Flagella antigen (H) เป็นส่วนของ flagella เตรียมได้โดยเติมฟอร์มาลินลงในเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่เคลื่อนที่ ทำลาย H-antigen ได้โดยใช้ความร้อนอุณหภูมิที่สูงกว่า 60 องศาเซลเซียส หรือโดยใช้แอลกอฮอล์หรือกรด

3) Capsular antigen (Vi) จะไปรบกวนปฏิกิริยาตกตะกอน O-antigen ของสายพันธุ์ที่แยกได้ ทำลายได้โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือโดยการใช้กรดหรือฟีนอล

การทำให้เกิดโรค

เชื้อ *Salmonella* สร้างสารพิษชนิด endotoxin ซึ่งจะปล่อยสารพิษนี้ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือ host ได้ก็ต่อเมื่อเซลล์ตายหรือถูกทำลาย โดยปกติแล้วจะเข้าสู่ร่างกาย host ได้ทางปากจากการรับประทานอาหารหรือน้ำดื่ม

Salmonella มีทั้งหมดประมาณ 1,930 serotype ชนิดที่เป็นสาเหตุของโรค Salmonellosis มี 3 สปีชีส์ คือ *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis* และ *Salmonella enteritidis* โดยเชื้อ *Salmonella* ทำให้เกิดโรคได้ทั้งคนและสัตว์ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่ 1 ก่อให้เกิดโรคเฉพาะในคนคือ *Salmonella* ซึ่งพบตามธรรมชาติ ก่อให้เกิดโรคเฉพาะในคนและคนเหล่านี้ที่จะเป็นพาหะของเชื้อ

- กลุ่มที่ 2 ก่อให้เกิดโรคได้ทั้งคนและสัตว์ ซึ่งพบเป็นส่วนใหญ่ของ *Salmonella* ทั้งหมดสัตว์ต่างๆที่เป็นโรค อาทิ หมู หนู เป็ด และไก่ เป็นต้น หรือที่พบบ่อยคือ *Salmonella typhimurium* และ *Salmonella anatum* เป็นต้น

การติดเชื้อส่วนใหญ่จะพบลักษณะอาการใน 3 รูปแบบนี้ผสมผสานกัน

1) Enteric fever หมายถึง ไข้ typhoid และ paratyphoid เชื้อจะเข้าสู่ร่างกายทางปาก โดยติดมากับอาหารหรือน้ำดื่ม ผ่านกระเพาะอาหารเข้าไปถึงลำไส้เล็ก เข้าสู่ท่อน้ำเหลือง และเข้าสู่กระแสเลือดไปสิ้นสุดที่อวัยวะต่างๆรวมทั้งลำไส้ด้วย เชื้อจะแบ่งตัวในลำไส้แล้วจะขับออกไปทางอุจจาระ

2) Gastroenteritis หรือ *Salmonella* food poisoning หมายถึง อาหารเป็นพิษ (food poisoning) เนื่องจากเชื้อ *S. typhimurium*, *S. enteritidis* หรือ *S. derby* เชื้อจะไม่เข้าสู่กระแสเลือด และไม่เกิดการติดเชื้อที่อวัยวะภายในหลังจากการรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ แต่เชื้อจะไปทำให้เกิดการอักเสบของลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ ระยะฟักตัวอยู่ในช่วงระหว่าง 8-48 ชั่งโมง ผู้ป่วยจะมีอาการไข้ หนาวสั่น คลื่นไส้ อุจจาระร่วง ในรายที่ไม่รุนแรงอาจหายได้เองภายในเวลา 2-4 วัน

3) Septicemia การติดเชื้อ *S. choleraesuis* โดยเชื้อจะเข้าสู่ร่างกายทางปากแต่จะไม่เกิดอาการทางลำไส้ เชื้อจะเข้าไปทางกระแสโลหิตทำให้เกิดการอักเสบเป็นหนองฝี ตามอวัยวะภายใน เช่นทำให้เกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบ กระดูกพรุน อักเสบ ปวดบวม เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มีสุขภาพไม่แข็งแรงและความต้านทานต่ำ

การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

1) Enrichment culture ใส่สิ่งตรวจซึ่งเป็นอุจจาระลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ selenite F หรือ tetrathionate broth อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดนี้จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นในลำไส้ แต่จะเร่งการเจริญของ *Salmonella* บ่มเชื้อไว้ 1-2 วัน นำลงไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งต่อไป

2) Selective medium cultures นำสิ่งตรวจไปป้ายบน SS (Salmonella-Shigella) agar หรือ deoxycholate-citrate agar ซึ่งจะไปเร่งการเจริญของ *Salmonella* และ *Shigella* ให้เจริญได้ดีกว่าพวก coliform

3) Differential medium cultures ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin-methylene blue, MacConkey หรือ Deoxycholate อาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้จะแยกออกได้ว่า โคโลนีที่ขึ้นมานั้นเป็นชนิดย่อยสลาย

แลกโตส แบคทีเรียพวกแกรมบวกจะถูกยับยั้งการเจริญ Bismuth sulfite เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่งชี้ *S. typhi* ได้รวดเร็วมาก เพราะให้โคโลนีสีดำเนื่องจากสร้างก๊าซ H_2S

4) Final identification นำโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* ไปทดสอบทางชีวเคมี จากนั้นนำไปทดสอบทาง serology

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทำการคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์
2. เพื่อประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารยับยั้งจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก
4. เพื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

ขอบเขตการวิจัย

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารหมักพื้นบ้านจากตลาดสดและตลาดนัดในจังหวัดสุราษฎร์ธานี ทั้งอาหารหมักจากสัตว์และอาหารหมักจากพืช จากนั้นนำมาคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ทำการประเมินความสามารถของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ทดสอบ ศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารยับยั้งจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ อาทิ การทนต่อเกลือน้ำดี และการทนต่อกรด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์
2. ทราบถึงประสิทธิภาพของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์
3. ทราบถึงคุณสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก