บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เต้าหู้ยี้มีต้นกำเนิดมาจากประเทศจีนในบริเวณตอนเหนือและตอนกลาง เป็นอาหารหมักพื้นเมืองของชาวจีนมานานนับศตวรรษและยังบริโภคกันอย่างแพร่หลายในประเทศต่างๆ ในทวีปเอเชีย โดยนำมาบริโภคกับข้าวต้ม หรือเป็นเครื่องปรุงรสในอาหารประเภทสุกี้ เต้าหู้ยี้มีชื่อเรียกหลากหลายตามภาษาท้องถิ่นว่า sufu, furu หรือ doufuru (จีน) และ tofuyo หรือ nyu-fu (ญี่ปุ่น), choa (เวียตนาม), ta-huri (ฟิลิปปินส์), taokaoan (อินโดนีเซีย) และ tao-hu-yi (ไทย) (Han *et al*., 2001) กระบวนการผลิตเต้าหู้ยี้มีหลายวิธีซึ่งแตกต่างกันไปตามสูตรของแต่ละโรงงานเนื่องจากได้รับการถ่ายทอดมาในระบบครอบครัว แต่สำหรับการผลิตเต้าหู้ยี้แบบธรรมชาติทำโดยการเตรียมหัวเชื้อราจากข้าวที่หุงสุกแล้วทิ้งให้เย็น เกลี่ยลงบนกระด้ง วางทิ้งไว้ 7-15 วันในห้องเฉพาะซึ่งมีเชื้อราประจำถิ่นอยู่ในห้อง จากนั้นเตรียมเต้าหู้โดยใช้ถั่วเหลืองแช่น้ำ 6 ชม. นำไปบดในโม่หิน ต้มให้เดือดในน้ำ กรองเอาเปลือกออกแล้วใส่ magnesium sulfate วางทิ้งไว้ให้ตกตะกอนในบล็อก เมื่อเต้าหู้แข็งตัวให้ตัดเต้าหู้เป็นชิ้นยาว นำไปแช่น้ำเกลือ แล้วตัดเป็นชิ้นขนาด 3 x 3 x 2.5 ซม. นำเต้าหู้และหัวเชื้อที่เตรียมไว้เรียงใส่โอ่งที่มีฝาปิด โดยวางเรียงสลับกันระหว่างเต้าหู้และหัวเชื้อพร้อมโรยเกลือ หมักทิ้งไว้กลางแดดเป็นเวลา 9 เดือน จะได้เต้าหู้ยี้ที่มีกลิ่นรสชาติที่ดี มีสีเหลือง (ประเสริฐและคณะ, 2548) ส่วนในกรณีการผลิตเต้าหู้ยี้แดง ให้ใส่เชื้อรา *Monascus purpureus* ซึ่งให้สารสีแดงของ monascarubrin แล้วบ่มต่ออีก 40-60 วัน ทำให้เกิดสีแดงน่ารับประทานยิ่งขึ้น ซึ่งทำให้นิยมรับประทานและใส่ในเย็นตาโฟเพื่อเพิ่มรสชาติ จากนั้นนำไปบรรจุขวดและผ่านการต้มในน้ำเดือดหรือพาสเจอร์ไรส์เพื่อฆ่าเชื้อก่อนนำไปจำหน่ายหรือบริโภค (ลัดดาวัลย์, 2536)

เนื่องจากเต้าหู้ยี้เป็นแหล่งของอาหารโปรตีน การย่อยสลายโปรตีนใช้เวลา 3-9 เดือน เพื่อเปลี่ยนโมเลกุลใหญ่ของโปรตีนเป็น peptide, amino acids, amines และ ammonia ทำให้เพิ่มปริมาณกลิ่นรส (Han *et al*., 2003) ปริมาณกรดอะมิโนในเต้าหู้ยี้แต่ละประเภทมีไม่เท่ากัน กรดอะมิโนที่มีมากในเต้าหู้ยี้แดงได้แก่ glutamic acid, aspartic acid, isoleucine, lysine, cystine, phenylalanine และ tyrosine ในขณะที่กรดอะมิโนที่มีปริมาณสูงในเต้าหู้ยี้ชนิดอื่นได้แก่ glutamic

acid, isoleucine, alanine, aspartic acid, phenylalanine, leucine, alanine, aspartic acid, isoleucine และ valine (Han *et al.,* 2001)

คุณค่าทางโภชนาการของเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป (รายงานเป็นกรัมหรือมก. ต่อ100 กรัม น้ำหนักเปียก) ประกอบด้วยโปรตีน 12-17 กรัม, ไขมัน 8-12 กรัม, เส้นใย 0.2-1.5 กรัม, คาร์โบไฮเดรต 6-12 กรัม, ขี้เถ้า 4-9 กรัม, calcium 100-230 มก., phosphorus 150-300 มก., iron 7-16 มก. นอกจากนี้ยังมี thiamin (V_{B1}) 0.04-0.09 มก. riboflavin (V_{B2}) 0.13-0.36 มก. niacin 0.5-1.2 มก. vitamin B12 1.7-2.2 มก.

เชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในเต้าหู้ยี้ ได้แก่ เชื้อรา *Actinomucor elegans*, *Mucor sufu*, *M. hiemalis, M. silvaticus*, *M. subtilissimus* , *A. taiwanensis* (Chou *et al.,* 1988) และ *Rhizopus* sp. (Han *et al.,* 2001) ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบ ได้แก่ *Bacillus* และ *Micrococcus* (Han *et al.,* 2001; Han *et al.,* 2004) และเมื่อเร็ว ๆ นี้ ประเสริฐ และคณะ (2548) ได้รายงานชนิดของจุลินทรีย์ที่ตรวจพบจากกระบวนหมักเต้าหู้ยี้ ได้แก่ *Aspergillus, Penicillium, Rhizopus*, *Bacillus*, *Pediococcus* และ *Saccharomyces* นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียแลกติกที่ทนเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 5-10% ตลอดระยะเวลาหมักในปริมาณ 10^3 ถึง 10^5 CFU/g จากการตรวจพบแบคทีเรียแลกติกในเต้าหู้ยี้เป็นจำนวนมาก จึงนำมาซึ่งความสนใจที่จะศึกษาบทบาทของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ โดยเก็บตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตั้งแต่เริ่มต้นกระบวนการหมักจนถึงได้เป็นผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป แล้วนำมาตรวจหาปริมาณแบคทีเรียแลกติก ทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติก การยับยั้งเชื้อก่อโรค ตรวจหากรดแลกติก และบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ และนอกจากนี้ยังตรวจปริมาณแร่ธาตุและโครงสร้างของเนื้อเต้าหู้ยี้อีกด้วย

การตรวจเอกสาร

1. ชนิดของเต้าหู้ยี้

เต้าหู้ยี้มีหลายชนิดซึ่งถูกผลิตขึ้นโดยวิธีการและสถานที่ต่างกันดังนี้ (Han *et al.*, 2001)

1.1 แบ่งตามกระบวนการผลิตเต้าหู้ยี้ได้เป็น 4 ชนิดคือ

1.1.1 เต้าหู้ยี้ที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อรา (Mould-fermented sufu) การผลิตเต้าหู้ยี้ชนิดนี้มี 4 ขั้นตอนใหญ่ๆ คือ การเตรียมเต้าหู้ การเตรียม pehtze (อ่านว่า pizi) โดยการเติมเชื้อราบริสุทธิ์บนก้อนเต้าหู้ การเติมเกลือ และการหมัก

1.1.2 เต้าหู้ยี้ที่ได้จากการหมักแบบธรรมชาติ (Naturally fermented sufu) การผลิตเต้าหู้ยี้ชนิดนี้มีขั้นตอนการผลิตคล้ายกับเต้าหู้ยี้ที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อรา แต่การเตรียม pehtze ใช้เชื้อที่มีอยู่ในธรรมชาติแทนเชื้อราบริสุทธิ์

1.1.3 เต้าหู้ยี้ที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรีย (Bacteria-fermented sufu) การผลิตเต้าหู้ยี้ชนิดนี้ ทำได้โดยนำเต้าหู้ไปแช่น้ำเกลือ ปล่อยให้ก้อนเต้าหู้ดูดซับน้ำเกลือประมาณ 2 วันแล้วเติมเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ เช่น *Bacillus* sp. หรือ *Micrococcus* sp. แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-38°C เป็นเวลา 7 วัน นำมาทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 50-60°C เป็นเวลา 12 ชม. แล้วหมักเป็นเวลา 3 เดือน

1.1.4 เต้าหู้ยี้ที่ได้จากการหมักด้วยเอนไซม์ (Enzymatically ripened sufu) เนื่องจากก้อนเต้าหู้ที่ใช้ในการผลิตไม่ได้ผ่านการหมักด้วยจุลินทรีย์มาก่อน ดังนั้นในกระบวนการหมักจึงใช้ระยะเวลาในการหมักค่อนข้างนาน คือ ประมาณ 6-10 เดือน และมีการเติมหัวเชื้อ (koji) เพื่อช่วยในการย่อยสลายสัปสเตรทในกระบวนการหมัก

1. 2 แบ่งตามสี กลิ่นรส ได้ 4 ชนิด

1.2.1 เต้าหู้ยี้แดง (Red sufu) ส่วนผสมหลักของเต้าหู้ยี้แดงประกอบด้วย เกลือ อังกั๊ก ได้มาจากการหมักข้าวด้วยเชื้อราในสกุล *Monascus* spp. เช่น *M. purpureus* ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดกลิ่นเฉพาะ และให้สารสีแดง

1.2.2 เต้าหู้ยี้ขาว (White sufu) ส่วนผสมของเต้าหู้ยี้ขาวเหมือนกับส่วนผสมของเต้าหู้ยี้แดง แต่แตกต่างกันตรงที่เต้าหู้ยี้ขาวไม่ได้เติมอังกั๊ก ซึ่งทำให้เต้าหู้ยี้มีสีเหลืองสว่างทั้งภายในและที่ผิว และเต้าหู้ยี้ขาวมีปริมาณเกลือน้อยกว่าเต้าหู้ยี้แดง

1.2.3 เต้าหู้ยี้เทา (Grey) เต้าหู้ยี้ชนิดนี้มีส่วนผสมของหางนมที่ได้จากการผลิตเต้าหู้เกลือ และพริก จากการที่เต้าหู้ยี้ชนิดนี้มีการเติมหางนมในกระบวนการหมัก ทำให้แบคทีเรียและราเติบโตได้ดี ส่งผลทำให้เต้าหู้ยี้ชนิดนี้มีกลิ่นรสที่ดี

1.2.4 เต้าหู้ยี้ทั่วๆ ไป (0ther sufu) เต้าหู้ยี้ชนิดนี้มีการเติมส่วนผสมหลายชนิดแตกต่างกันไป เช่น ผัก ข้าว เบคอน และแอลกอฮอล์ความเข้มข้นสูง

1.3 แบ่งตามขนาดและรูปร่าง เช่น ขนาดใหญ่ ขนาดเล็ก รูปร่างเป็นสี่เหลี่ยม

2. กระบวนการผลิตเต้าหู้ยี้

2.1 วัตถุดิบ

2.1.1 ถั่วเหลือง ควรมีเปลือกบาง ขั้วเมล็ดไม่มีสีดำ อายุไม่เกิน 6 เดือน ถ้าเก่ามากจะได้เต้าหู้ปริมาณน้อย

2.1.2 สารตกตะกอน แบ่งเป็น 4 ชนิด

2.1.2.1 สารประกอบคลอไรด์ ได้แก่ แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.H_2O$) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) น้ำทะเล สารพวกนี้จะได้ผลิตภัณฑ์มีรสหอม เนื้อแข็งเหมาะในการทำเต้าหู้ทอด ปริมาณที่ใช้ประมาณ 3% ของน้ำหนักถั่วเหลืองแห้ง

2.1.2.2 สารประกอบซัลเฟต ได้แก่ แคลเซียมซัลเฟต ($CaSO_4.2H_2O$) นิยมใช้กันมากและมีราคาถูกที่สุด คนจีนเรียกว่า “เจี๊ยะกอ” จะให้เต้าหู้มีเนื้อนิ่มเหมาะในการทำเต้าหู้อ่อน เต้าฮวย ปริมาณที่ใช้ประมาณ 2% ของน้ำหนักถั่วเหลืองแห้ง ส่วนแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) หรือดีเกลือ เป็นสารสีขาว รสขมเฝื่อน เหมาะในการทำเต้าหู้แข็ง

2.1.2.3 กลูโคโน เดลต้า แลคโตน (Glucono delta lactone) ใช้กันอย่างแพร่หลายมากที่สุดในประเทศญี่ปุ่นโดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำเต้าหู้แบบบรรจุถุงหรือเต้าหู้หลอด ซึ่งใช้ได้ผลดีกว่าตัวตกตะกอนชนิดอื่น แต่มีราคาแพง ปริมาณที่ใช้ในการทำเต้าหู้หลอด 1% ของน้ำหนักถั่วเหลืองแห้ง ให้สี กลิ่น รสชาติ และเนื้อเต้าหู้ยี้ดีที่สุด

2.1.2.4 กรด ที่นิยมใช้มีทั้งกรดอินทรีย์และกรดแร่ เช่น กรดเกลือ กรดมะนาว เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้น้ำผลไม้ในการตกตะกอนอีกด้วย เช่น น้ำส้มคั้น น้ำมะนาว และน้ำสับปะรด ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะกรอบ หักง่าย มีรสเฝื่อนเล็กน้อย

2.2 การผลิตเต้าหู้

2.2.1 การเตรียมน้ำนมถั่วเหลือง (ดัดแปลงจาก ลัดดาวัลย์, 2536)

ล้างเมล็ดถั่วเหลือง เอาเปลือกออกหรือไม่ก็ได้ นำไปแช่น้ำค้างคืน 16 ชม. ที่อุณหภูมิ 20°C เติมน้ำลงในถั่วเหลืองในอัตราส่วนของน้ำ : ถั่วเหลืองเป็น 10 : 1 บดจนละเอียด นำน้ำเต้าหู้ (น้ำนมถั่วเหลือง) ที่ได้ไปต้มนาน 20 นาที กรองผ่านผ้าขาวบางสองชั้นเพื่อเอาตะกอนที่ไม่ละลายน้ำออก ได้เป็นน้ำนมถั่วเหลือง ทำให้เย็น 80-85°C การต้มมีจุดมุ่งหมาย คือ ทำลายสารบางชนิดในถั่วเหลืองที่ทำให้ร่างกายได้ประโยชน์น้อยลง พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการรักษาคุณค่าทางโภชนาการได้

มากที่สุด และไม่ทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสของเต้าหู้เสียไป คือ การใช้ความร้อนประมาณ 93°C 10-15 นาที ทำให้นมมีกลิ่นดีขึ้น เก็บได้นาน สกัดนมได้ง่าย และเปลี่ยนโปรตีนให้อยู่ในรูปที่ตกตะกอนได้ง่าย

2.2.2 การตกตะกอนโปรตีน เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุด เพราะมีปัจจัยและสภาวะหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง อาจมีผลต่อผลิตภัณฑ์ได้แก่ ปริมาณสารที่ตกตะกอนการใช้ปริมาณที่เหมาะสมทำให้ได้หางนมใส ถ้าน้อยเกินไปหางนมจะขุ่นโปรตีนตกตะกอนไม่หมด แต่ถ้าใช้มากเกินไปปริมาตรของเต้าหู้จะลดลงเนื้อแข็งและมีรสขม ความเข้มข้นของนมถั่วเหลืองถ้าข้นมากปริมาณสารที่ใช้ก็มากด้วย อุณหภูมิขณะทำการตกตะกอนถ้าอุณหภูมิสูงจะเกิดปฏิกิริยาเร็ว ถ้าใช้สารตกตะกอนน้อยเต้าหู้ที่ได้มีเนื้อแข็งหยาบ การผสมขณะตกตะกอนต้องไม่แรงมากนักถ้าคนแรงมากตะกอนจะแข็งกระด้างและมีฟองอากาศ

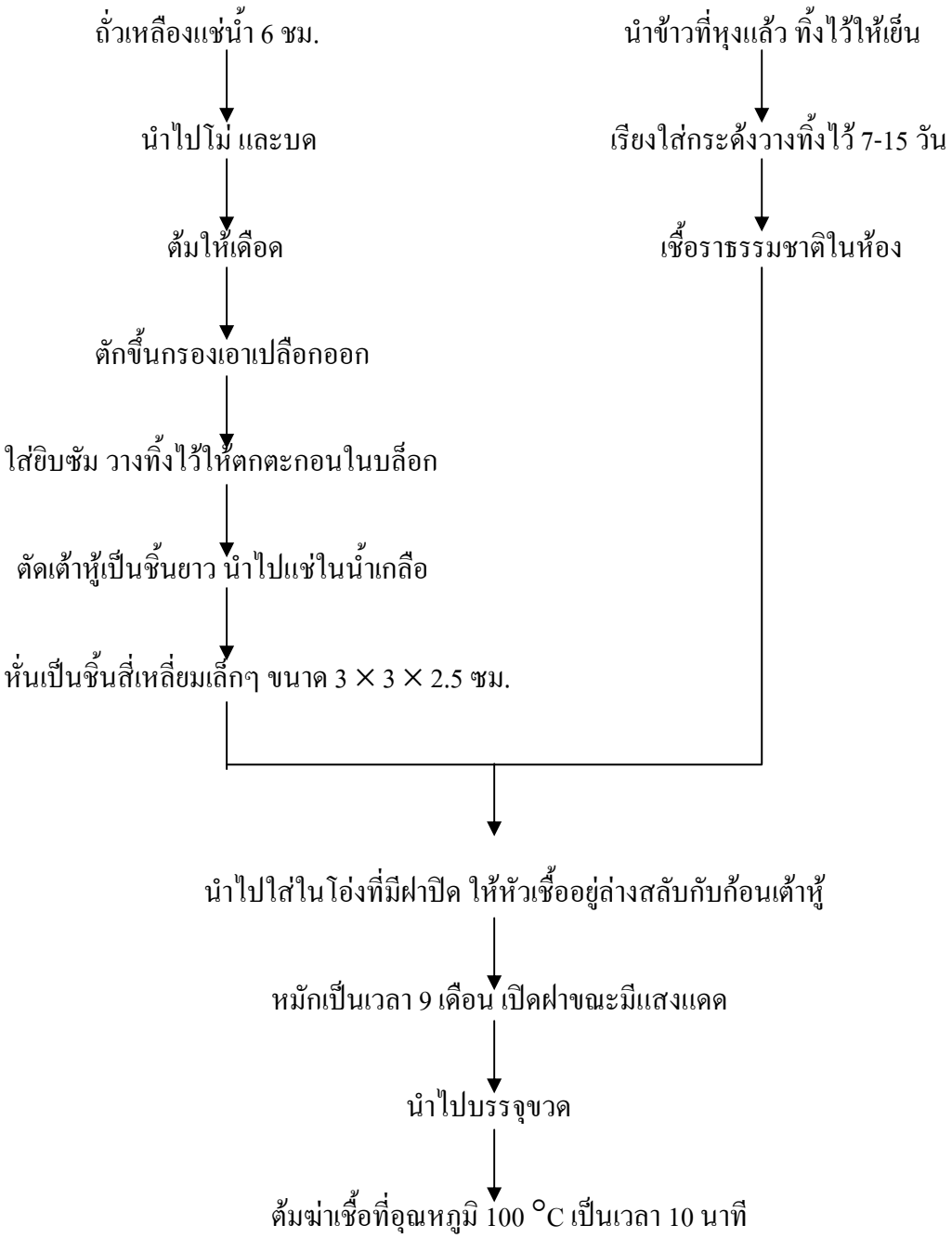
2.2.3 การกำจัดหางนมน้ำใสๆ ที่เหลือจากการจับตัวเป็นก้อนของโปรตีนต้องกำจัดออกไปส่วนหนึ่งก่อนที่จะนำก้อนโปรตีนใส่ลงในแบบพิมพ์ จะทำให้เต้าหู้จับตัวเป็นก้อนได้ดีขึ้นและก่อนเข้าแบบพิมพ์ ทำให้เย็นเหลือ 50°C

2.2.4 การกดทับ ทำให้โปรตีนจับเป็นก้อนแข็ง ลดความชื้น ระยะแรกกดทับด้วยน้ำหนักน้อยประมาณ 2-4 กรัม/ตร.ซม. นาน 20-30 นาที หลังจากนั้นยกแบบพิมพ์แช่ลงน้ำเย็น คว่ำเต้าหู้ออก การแช่น้ำจะช่วยให้การแกะออกจากแบบพิมพ์ได้ง่ายโดยไม่ติดผ้า

2.2.5 การผลิตเต้าหู้ยี้ (ประเสริฐ, 2527) ทำได้โดยนำแผ่นเต้าหู้แล้วก็จะนำมาตัดเป็นก้อนที่มีขนาดตามต้องการ จากนั้นจึงนำไปอบฆ่าเชื้อที่ 100°C เป็นเวลา 10 นาที หรือผึ่งแดดจนหมาดๆ จากนั้นก็นำมาใส่เชื้อรา *Actinomucor elegans* โดยการเอาเต้าหู้ที่เย็นลงแล้วใส่ในถาดโปร่งปรุเพื่อให้มีอากาศถ่ายเทได้ดี และเพื่อให้เชื้อราเติบโตรอบก้อนเต้าหู้ จากนั้นนำไปบ่มเพื่อให้เชื้อเติบโตที่อุณหภูมิประมาณ 20°C เป็นระยะเวลา 3-7 วัน ซึ่งจะมีเส้นใยของเชื้อราขึ้นเต็มโดยรอบ มีลักษณะสีขาวและมีกลิ่นดี ในช่วงนี้เต้าหู้จะมีความชื้นประมาณ 74% โปรตีนที่ไม่ละลาย 11% โปรตีนละลายได้ 1.3% และไขมันประมาณ 4.3% เมื่อได้เต้าหู้ที่มีเชื้อขึ้นพอดีแล้วก็นำเอาเต้าหู้นี้ไปหมักในน้ำเกลือโดยนำเอาเต้าหู้เรียงในถังหมักโดยรอบข้างและเว้นช่องตรงกลางไว้ การเรียงควรเรียงเป็นชั้นๆ และใช้เกลือโรยรอบๆ เป็นระยะๆ จำนวนเกลือที่ใช้เทียบเป็นปริมาณของน้ำเกลือ 12% และใส่เหล้าอุ่นแดง (หรือไวน์แดง) ประมาณ 10% และปิดฝาหมักไว้เป็นระยะเวลา 1.5-2 เดือน สารเติมแต่งที่อาจใช้เพื่อทำให้เต้าหู้ยี้มีรสดีมากขึ้น และใส่ในช่วงหมักได้แก่ พริกแดง ขิง ผงพะโล้ เต้าเจี้ยวบดและข้าวแดงที่เรียกกันว่า อังกั๊ก เพื่อทำเป็นเต้าหู้ยี้ชนิดสีแดง (ทำจากเชื้อ *Monascus purpureus* ให้สารสีแดงของ Monascarubrin,$C_{22}H_{24}O_5$)

3. การผลิตเต้าหู้ยี้ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

การผลิตเต้าหู้ยี้ของโรงงานเต้าหู้ยี้ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้คือ ตัดเต้าหู้แข็งเป็นชิ้นยาว นำไปแช่น้ำเกลือ แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 3 x 3 x 2.5 ซม. แล้วเตรียมหัวเชื้อโดยการน้ำข้าวที่หุงสุก วางทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเกลี่ยบนกระด้งวางทิ้งไว้ประมาณ 7-15 วัน เพื่อให้เชื้อราตามธรรมชาติในห้องเจริญเติบโตได้เต็มที่ นำเต้าหู้และหัวเชื้อเรียงใส่โอ่งที่มีฝาปิด โดยให้ข้าวอยู่ชั้นล่าง วางเรียงสลับกับเต้าหู้ หมักทิ้งไว้ 9 เดือน ระหว่างการหมักเปิดฝาขณะมีแสงแดด เติมน้ำที่ผสมน้ำตาลโตนดเป็นระยะ เมื่อครบ 9 เดือน จะได้เต้าหู้ยี้ที่มี กลิ่น รสดี และมีสีเหลือง นำไปบรรจุขวดแล้วนำไปต้มฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 10 นาที (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ขั้นตอนการผลิตเต้าหู้ยี้ของโรงงานเต้าหู้ยี้ จ. สงขลา

4. บทความวิจัยเกี่ยวกับเต้าหู้ยี้

ในระยะช่วง 10 ปีที่ผ่านมานี้ได้มีนักวิจัยให้ความสำคัญเกี่ยวกับการศึกษารายละเอียดของกระบวนการผลิตเต้าหู้ยี้มากขึ้น ดังบทความปริทัศน์ และบทความวิจัยของ Han และคณะ (2001) (2003) (2004) และ Chung และคณะ.(2005)

Han และคณะ (2001) ได้ศึกษาการผลิตเต้าหู้ยี้ ที่ผลิตในประเทศจีน แล้วได้ทำการแบ่งเต้าหู้ยี้เป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ ตามกระบวนการผลิต สี และกลิ่นรส โดยกระบวนการผลิตสามารถแบ่งเต้าหู้ยี้ได้เป็น เต้าหู้ยี้ที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อรา เต้าหู้ยี้ที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรีย เต้าหู้ยี้ที่ใช้เอนไซม์ในการทำให้สุก และเต้าหู้ยี้ที่ได้จากการหมักแบบธรรมชาติ ส่วนสีของเต้าหู้ยี้ขึ้นอยู่กับส่วนผสม เช่นเต้าหู้ยี้แดง เต้าหู้ยี้ขาว เต้าหู้ยี้เทา และได้ศึกษากระบวนการผลิตเต้าหู้ยี้ องค์ประกอบทางเคมี กรดอะมิโน และสารที่ให้เกิดกลิ่นรสในเต้าหู้ยี้

Han และคณะ (2001) ได้ศึกษาความปลอดภัยทางจุลชีววิทยาและคุณภาพของเต้าหู้ยี้ 3 ชนิด จำนวน 23 ตัวอย่าง พบว่าในเต้าหู้ยี้มีปริมาณ NaCl, ethanol, glucose และ fructose ระหว่าง 6.2-14.8%, 0.5-6.3%, 0-6.2% และ 0-4.8% ตามลำดับ พบแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางและในสภาวะที่มีออกซิเจน และแบคทีเรียสร้างสร้างสปอร์จำนวนมาก ($>10^5$ CFU/g) ในตัวอย่างส่วนใหญ่ที่ทำการศึกษา เมื่อบ่งชี้แล้วพบว่า 85% ของแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียกรัมบวก และตรวจพบแบคทีเรียแลกติก 2 ตัวอย่าง จำนวน 10^5 และ 10^7 CFU/g บ่งชี้แล้วเป็นแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Lactobacillus casei* และมี 3 ตัวอย่างที่ตรวจพบ *Bacillus cereus* มากกว่า 10^5 CFU/g และตรวจพบ *Clostridium perfringens* จำนวน $<10^3$ CFU/g มีเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้นที่ตรวจพบประมาณ 10^5 CFU/g แต่ตรวจไม่พบ *Staphylococcus aureus*, Fungi, *Enterobacteriaceae* และ *Listeria monocytogenes.*

Han และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของ NaCl ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายนอก การย่อยสลายโปรตีน และไขมัน ระหว่างกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ พบว่า NaCl มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายนอกของเต้าหู้ยี้ การย่อยสลายโปรตีนและไขมัน โดยเต้าหู้ยี้ที่มีเกลือเป็นส่วนประกอบ 14% (w/w) มีผลต่อการเพิ่มความแข็ง (+100%) ความยืดหยุ่น (+18%) และลดการเกาะติด (-30%) จากการทำ SDS-PAGE ตรวจไม่พบโปรตีนในเต้าหู้ยี้ที่มีเกลือ 80 และ 100 g/kg แต่พบหน่วยย่อยของโปรตีนในเต้าหู้ยี้ที่มีเกลือ 140 g/kg ในเต้าหู้ยี้ที่มีเกลือน้อยกว่า 80 g/kg ตรวจพบอัตราส่วนของ free amino nitrogen (FAN) และ ไนโตรเจนทั้งหมด (TN) เท่ากับ 0.4-0.45, กรดอะมิโนอิสระ (FAA) และ crude protein (CP) เท่ากับ 0.24-0.26 และพบว่าในเต้าหู้ยี้ขาวที่มีส่วนผสมของเกลือ และแอลกอฮอล์เพียงอย่างเดียว มีอัตราส่วนของ FAN/TN และ FAA/CP สูงกว่าในเต้าหู้ยี้แดงที่มีส่วนผสมของอังกั๊กด้วย

Han และคณะ (2004) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ โดยตรวจพบ total counts of mesophilic aerobic bacteria (TMAB), bacterial endospores, *Bacillus cereus*, lactic acid bacteria (LAB), *Enterobacteriaceae* และ fungi บน tofu และมีปริมาณมากขึ้นบน pehtze แล้วลดลงเมื่อเติมเกลือลงไปกระบวนการหมัก โดยในเต้าหู้ยี้ที่มีเกลือ 8% และ 11% พบว่า TMAB และ bacterial endospores ลดลงเหลือประมาณ 10^6 CFU/g *B. cereus* ลดลงเหลือประมาณ 10^3 CFU/g ส่วน LAB ลดลงเหลือน้อยกว่า 10^2 CFU/g แต่เพิ่มขึ้นเป็น 10^9 CFU/g ในเต้าหู้ยี้ที่มีเกลือ 5% ส่วน *Enterobacteriaceae* และ fungi ลดลงจนกระทั่งตรวจไม่พบหลังจากการหมักเป็นเวลา 20 และ 30 วัน

Chung และคณะ (2005) ได้ศึกษาองค์ประกอบที่มีผลต่อกลิ่นรสในเต้าหู้ยี้ 3 ชนิด โดยสกัดสารที่เป็นของเหลวแล้วนำไปวิเคราะห์โดย gas chromatography mass spectrometry (GC-Mass spectrometry) พบว่ามีสารประกอบ 83 ชนิด โดยมี 68 ชนิดที่พบได้ในเต้าหู้ยี้ทั้ง 3 ตัวอย่าง สารหลักที่ให้กลิ่นรสประกอบด้วย alcohol 17 ชนิด, acids 15 ชนิด, esters 16 ชนิด และสารประกอบอื่นๆ ได้แก่ aldehydes 17 ชนิด, alkanes 5 ชนิด, ketones 3 ชนิด และ furans 2 ชนิด

4. แบคทีเรียแลกติก

4.1 ลักษณะโดยทั่วไป

แบคทีเรียแลกติกอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียกรัมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส ต้องการอากาศน้อยๆ (microaerophilic) หรือ facultative anaerobe ต้องการอาหารในการเติบโตซับซ้อน ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน ทนกรด อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตอยู่ระหว่าง 30-44°C pH ที่เหมาะสม 5.5-6.2 นิยมใช้ในกระบวนการผลิตอาหารและผลิตกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในกระบวนการหมัก (du Toit *et al.*, 1998) เซลล์มีรูปร่างกลมหรือเป็นแท่ง บางชนิดเรียงตัวกันสี่เซลล์ เนื่องจากความไม่ซับซ้อนของแบคทีเรียแลกติกจึงทำให้ประสบความสำเร็จในการศึกษาด้าน สรีรวิทยา พันธุศาสตร์ และการประยุกต์ใช้ โดยเป็นแบคทีเรียชนิดแรกที่นำมาใช้ในการผลิตทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตผลิตภัณฑ์นมหมัก ผักดอง เนื้อหมัก (Konings, 2002)

4.2 แหล่งที่พบ

แบคทีเรียแลกติกมักพบในผลิตภัณฑ์นม ธัญพืช ปลา ไวน์ ผลไม้ น้ำผลไม้ และผักดอง (วิลาวัณย์, 2536) และยังพบเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในช่องปาก ทางเดินอาหาร และอวัยวะสืบพันธุ์

4.3 ความต้องการสารอาหาร

แบคทีเรียแลกติกเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงยากเนื่องจากต้องการอาหารที่เหมาะสมสมบูรณ์ในการเติบโต (fastidious microorganism) แบคทีเรียแลกติกสามารถใช้น้ำตาลได้หลายประเภทจาก monosaccharide ประเภท pentose (arabinose ribose และ xylose) เป็นต้น และ hexose (frutose และ mannose) disaccharide (maltotriose) และ polymer (แป้ง) นอกจากนี้ แบคทีเรียแลกติกสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตพวก oligosaccharides เช่น raffinose และ fructooligosaccharide เป็นต้น ซึ่งในระบบทางเดินอาหารไม่มีเอนไซม์ที่จะย่อยคาร์โบไฮเดรตชนิดนี้ได้ แบคทีเรียแลกติกต้องการอาหารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ถ้าในอาหารขาดไนโตรเจนทำให้แบคทีเรียแลกติกเติบโตได้น้อยมาก กรดอะมิโนที่แบคทีเรียแลกติกต้องการ คือ serine และ arginine (Salminen and Wright, 1993) วิตามินที่แบคทีเรียแลกติกใช้ในการเจริญเติบโตได้แก่ thiamine (B1), riboflavin (B2), pyridoxin (B6), cyanocobalamine (B12) และ nicotinic acid

4.4 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติก (Donohue and Salminen, 1996)

แบคทีเรียแลกติกประกอบด้วยแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus, Lactococcus, Enterococcus, Carnobacterium, Leuconostic, Oenococcus, Pediococcus, Tetragenococcus, Vagococcus*, และ *Weissela* โดยแบคทีเรียแลกติกเหล่านี้แบ่งตามการใช้น้ำตาลได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. Homofermentative เป็นแบคทีเรียที่ใช้ (ferment) น้ำตาลกูลโคสผ่าน Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway แล้วสร้างกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก แบคทีเรียแลกติกที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย

1.1 *Pediococcus*

เซลล์รูปกลม มักเรียงตัวเป็นคู่หรือสี่เซลล์ อยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นสายพบน้อย ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ติดสีกรัมบวก เป็นพวกต้องการออกซิเจนเล็กน้อยในการเติบโตไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส หมักน้ำตาลให้กรด 0.5-0.9% ส่วนใหญ่เป็นกรดแลกติก ต้องการอาหารซับซ้อนในการเติบโต พบทั่วไปในอาหารหมักจากพืช แบคทีเรียพวกนี้เติบโตได้ดีในที่มีเกลือ 5.5% และเติบโตได้ลดลงในที่มีเกลือ 10% ตัวอย่างเช่น

1.2 *Pediococcus parvulus*

โคโลนีบนอาหารน้ำมะเขือเทศมีขนาดเล็ก แต่จะมีขนาดใหญ่ขึ้นถ้าเลี้ยงในสภาพ anaerobe บ่มที่ 30°C 48 ชั่งโมง การเติบโตในอาหารเหลวจะดีขึ้นถ้าเติม ซีสเตอีนและทวีน 80 pH ที่เหมาะสมในการเติบโตคือ 6.5 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตคือ 30°C พบแบคทีเรียชนิดนี้ในน้ำผักดอง

1.3 *Pediococcus pentosaceus*

เซลล์รูปกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8-1.0 ไมโครเมตร เมื่อเติบโตบนอาหารกลูโคส เพปโทน ยีสต์ เอกซ์แทรกท์จีลาติน โคโลนีสีขาวขนาดเล็ก ต้องการกรดอะมิโน และสารเร่งการเติบโต เช่น ไบโอติน ไนอะซิน กรดโฟลินิกในการเติบโต pH ที่เหมาะสมในการเติบโต 6.0-6.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโต 28-32°C ไม่ทนความร้อน เซลล์ถูกทำลายที่ 65°C 8 นาที พบในอาหารหมัก เช่น แตงกวา กระหล่ำปลีดอง

1.4 *Tetragenococcus halophilus*

เซลล์รูปกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6-0.8 ไมโครเมตร การเติบโตบนผิวหน้าอาหารแข็ง เติบโตได้ช้ามาก ส่วนในอาหารเหลวก็เช่นกัน ต้องใช้เวลา 4-5 วัน pH ที่เหมาะสมในการเติบโตอยู่ระหว่าง 7 และ 8 ต้องการไรโบฟลาวิน ไพริดอกซิน กรดเพนโททินิก ไดอะซิน กรดโฟลินิกในการเติบโตเติบ โตได้ดีในทีมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 6-8% เติบโตได้ในที่มีเกลือ 18% และอาจทนต่อเกลือความเข้มข้นสูงถึง 20-26% ดังนั้นมักพบในอาหารหมักที่มีความเข้มข้นสูงๆ เช่น เต้าเจี้ยว ซีอิ๊ว น้ำปลา

1.5 *Lactococcus*

ก่อนหน้านี้จัดอยู่ในจีนัส *Streptococcus* เซลล์รูปกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.5 ไมโครเมตร อาจเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นสายโซ่ ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตนม

1.6 *Lactococcus lactis*

เซลล์รูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.5 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่เรียงตัวเป็นคู่หรือโซ่สั้นๆ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตประมาณ 30°C ไม่เติบโตที่อุณหภูมิ 45°C เติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 4% แต่ไม่เติบโตที่ 6% เหมาะที่จะใช้เป็นแบบอย่างในการศึกษาการใช้น้ำตาลของแบคทีเรียแลกติก เนื่องจากมีกลไกการใช้คาร์โบไฮเดรตไม่ซับซ้อน มักพบแบคทีเรียชนิดนี้ในนมและผลิตภัณฑ์นม

1.7 *Lactococcus cremoris*

เซลล์รูปกลมหรือรูปไข่ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6-1.0 ไมโครเมตร มักเรียงตัวเป็นสายยาวโดยเฉพาะในนม อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโต 30°C ไม่เติบโตที่ 40°C สามารถเติบโตที่ 10°C ไม่เติบโตในอาหารที่มีเกลือ 6% บางสายพันธุ์สามารถสลายซิเตรตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ กรดแอซิติล บางสายพันธุ์ผลิตสารคล้ายสารปฏิชีวนะ ต่างจาก *L .lactis* คือไม่สร้างแอมโมเนียจากอาร์จีนีน มักพบในนมดิบและผลิตภัณฑ์นม

1.8 *Lactobacillus*

เซลล์รูปท่อน ติดสีกรัมบวก อาจเปลี่ยนเป็นกรัมลบเมื่ออายุมากขึ้นและมีกรดมากขึ้น โดยทั่วไปไม่เคลื่อนที่ ถ้ามีจะใช้แฟลกเจลลารอบตัว ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส แต่อาจมีบางสายพันธุ์สลายเพอร์ออกไซด์ โดยใช้เอนไซม์ซูโดคาตาเลส ส่วนใหญ่ไม่สร้างสารสี ถ้าสร้างจะมีสีเหลืองส้ม จนถึงสีแดงอิฐ หรือสีสนิม เป็นพวกต้องการอาหารในการเติบโตซับซ้อน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตทั่วไป 30-40°C ช่วงอุณหภูมิในการเติบโต 5-53°C (วิลาวัณย์, 2539) เติบโตได้ในสภาพที่เป็นกรด pH ที่เหมาะสมโดยปกติ 4-5 หรือต่ำกว่า (Buttris, 1997) แบคทีเรียพวกนี้พบในนม ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์เนื้อ น้ำ น้ำเสีย เบียร์ ไวน์ น้ำผลไม้ ผักดอง

1.9 *Lactobacillus acidophilus*

เซลล์รูปท่อน ขนาด 0.6-0.9 x 1.5-6.0 ไมโครเมตรอาจอยู่เดี่ยวๆ หรือเรียงตัวเป็นสาย ไม่เติบโตที่อุณหภูมิ 15°C เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 45°C อุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเติบโต 35-38°C pH ที่เหมาะสมในการเติบโต 5.5-6.0 (วิลาวัณย์, 2536) เคลื่อนที่ได้ สามารถเติบโตได้ในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน โดยทั่วไปพบบริเวณทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ช่องคลอด และผลิตภัณฑ์นม (Buttris, 1997) ต้องการสารเร่งการเติบโต เช่น แคลเซียมเพนโททิเนต กรดโฟลิก ไนอะซีน และไรโบฟลาวิน แยกได้จากอุจจาระของทารก ใช้ในการผลิตนมแอซิโตฟีลัส

1.10 *Lactobacillus delbrueckii*

เซลล์รูปท่อน ขนาด 0.5-0.8 x 2-9 ไมโครเมตร อาจอยู่เดี่ยวๆ หรือ เรียงตัวเป็นสายสั้นๆ ไม่เคลื่อนที่ ไม่เติบโตที่ 15°C เติบโตได้ดีที่ 45°C และสามารถเติบโตได้ที่ 48-52°C ต้องการสารเร่งการเติบโต คือ กรดเพนโททินิกและไนอะซิน บางสายพันธุ์ต้องการไรโบฟลาวิน กรดโฟลิก วิตามิน 12 และไทมิดีน และไม่ต้องการไทอะมีน ไพริดอกซีน ไบโอติน และกรดพาราอะมิโนเบนโซอิก

2. Heterofermentative เป็นแบคทีเรียพวกที่ใช้น้ำตาลกลูโคสผ่าน phosphogluconate pathway หรือ phosphoketolase pathway แล้วให้กรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก เอทธานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ แบคทีเรียแลกติกที่จัดอยู่ในกลุ่มประกอบด้วย

2.1 *Leuconostoc*

เซลล์มีรูปกลมเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว การเรียงตัวของเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยวๆ เป็นคู่ และเป็นสายสั้น กรัมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ พบมากในธัญพืช ผัก ผลไม้ กระหล่ำปลีดอง ผักดอง (Pederson and Albury, 1969) ผลิตกรดแลกติกจากการหมักคาร์โบไฮเดรต เติบโตได้ทั้งสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน โดยทั่วไปไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส ต้องการอาหารที่มีความซับซ้อนในการเติบโต ต้องการกรดอะมิโน เปปไทด์ คาร์โบไฮเดรต วิตามิน (Yang and Woese, 1989) หมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแลกติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตอยู่ระหว่าง 20-30 °C ไม่เป็นโรคกับคนและสัตว์

2.2 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*

เซลล์รูปกลมหรือรีขนาด 0.5-0.7 x 0.7-1.2 ไมโคเมตร มักเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นสายสั้นๆ สร้างสารเมือกเดกซ์แทรนจากน้ำตาลซูโครสได้ดีที่อุณหภูมิ 20-25°C ในอาหารเหลวกลูโคส เซลล์ไม่สามารถอยู่รอดเมื่อให้ความร้อน 55°C นาน 30 นาที ช่วงอุณหภูมิในการเติบโตอยู่ระหว่าง 10-37°C อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโต 20-30°C (วิลาวัณย์, 2536) เติบโตได้ในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน ต้องการปัจจัยในการเติบโตที่ซับซ้อน และกรดอะมิโน (Reiter and Oram, 1982) มักพบในสารละลายน้ำตาล ผลไม้ ผัก นม และผลิตภัณฑ์นม

2.3 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*

เซลล์รูปกลม หรือรูปรีขนาด 0.5-0.7 x 0.7-1.2 ไมโครเมตรมักเรียงตัวเป็นคู่หรือสายสั้นๆ สามารถสร้างเมือกเดกซ์แทรนจากน้ำตาลซูโครสได้เช่นกันแต่ไม่ดีเท่า *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ช่วงอุณหภูมิในการเติบโตอยู่ระหว่าง 10-37°C อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโต 20-30°C พบในผัก ผลไม้ นม และผลิตภัณฑ์นม

2.4 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*

เซลล์รูปกลมหรือรีขนาด 0.8-1.2 ไมโครเมตร โดยทั่วไปมักเรียงตัวเป็นสายยาวส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครส สามารถสลายซิเตรตเป็นแอซิเตต คาร์บอนไดออกไซด์ แอซิโตอิน และไดแอซิติลช่วงอุณหภูมิในการเติบโต 10-30°C อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโต 18-25 °C พบในนมและผลิตภัณฑ์นม

2.5 *Lactobacillus plantarum*

เซลล์รูปท่อนตรง ขนาด 0.9-1.2 x 3-8 ไมโครเมตร อาจอยู่เดี่ยวๆ เรียงตัวเป็นคู่หรือสายสั้นๆ เติบโตที่อุณหภูมิ 15°C ไม่เติบโตที่ 45°C อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตโดยทั่วไป 30-36°C ต้องการแคลเซียมเพนโททิเนต ไนอะซีน ในการเติบโต แยกได้จากผลิตภัณฑ์นม ผักดอง ผลิตภัณฑ์มะเขือเทศเน่าเสีย ปาก ลำไส้ และอุจจาระคน

4.5 โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก

4.5.1 นิยามโปรไบโอติก

Salminen (2001) ให้คำนิยามโปรไบโอติก คือ อาหารเสริมที่เป็นจุลินทรีย์มีชีวิต มีประโยชน์ต่อมนุษย์ โดยทั่วไปแล้วปรไบโอติกจะทำงานร่วมกับแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ แบคทีเรียที่นิยมใช้เป็นโปรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium*

Ljungh และ Wadstrom (2006) ให้คำนิยามโปรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิต เข้าไปในร่างกายโดยการกิน และยังคงจำนวนเดิมในระบบทางเดินอาหาร มีประโยชน์ต่อสุขภาพผู้บริโภค จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก นอกจากแบคทีเรียแลกติกแล้วยังมียีสต์ เช่น *Saccharomyces boulardii* และแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น *Bacillus* sp. และ *Clostridium butyricum*

Parvez และคณะ (2006) ให้คำนิยามโปรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิต บริโภคแล้วก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ โดยมีคุณสมบัติเป็นแหล่งอาหาร ทำให้เกิดสมดุลภายในทางเดินอาหาร และระบบภูมิคุ้มกัน ส่งเสริมการเจริญเติบโต และการทำงานของแบคทีเรียในลำไส้ มีการทำงานร่วมกันระหว่างโปรไบโอติก และพรีไบโอติก ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่แบคทีเรียชนิดอื่นไม่สามารถใช้ได้

Ouwehand และคณะ (2002) ให้คำนิยามโปรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิต เข้าสู่ร่างกายโดยการกิน มีประโยชน์ต่อสุขภาพผู้บริโภค มีผลเฉพาะที่ หรือระหว่างเดินทางไปยังระบบทางเดินอาหาร โดยทั่วไปแล้วร่างกายควรได้รับโปรไบโอติกอย่างน้อย 10^9 CFUต่อวัน จุลินทรีย์ที่นิยมใช้เป็นโปรไบโอติก (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกและประโยชน์ต่อมนุษย์

Genus	Species	Example strains	Health benefit
Lactobacillus	*acidophilus*	La5	- Reduced antibiotic associated diarrhoea
	casei	Shirota	- Shortening of rotavirus diarrhoea
			- Reduced recurrence of superficial bladder cancer
			- Immune modulation
	crispatus		- Improved oral vaccination
	fermentum	KLD	- Reduced colonisation by *Helicobacter*
	johnsonii	La1	*pylori*
	paracasei	F19	- Relief of irritable bowel syndrome
	plantarum	299v	- Reduction of LDL-cholesterol
	reuteri	SD2112	- Shortening of rotavirus diarrhoea
	rhamnosus	GG	- Shortening of rotavirus diarrhoea
			- Immune modulation
			- Relief of inflammatory bowel disease
			- Treatment and prevention of allergy
	salivarius	UCC118	- Reduced symptoms of inflammatory bowel disease
Bifidobacterium	*Breve*		- Reduced symptoms of irritable bowel disease
	longum	BB536	- Treatment of allergy
	lactis	Bb12	- Shortening of rotavirus diarrhea
			- Reduced incidence of travellers diarrhoea
			- Improved oral vaccination
Propionibacterium	*freudenreichii*	JS	
Bacillus	*subtilis*		
	cereus	toyoi	
Escherichia	*coli*	Nissle 1917	Fewer relapses of inflammatory bowel disease
Enterococcus	*faecium*	SF68	
Saccharomyces	*cerevisiae*	*boulardii*	Fewer relapses of inflammatory bowel disease

ที่มา : Ouwehand และคณะ (2002)

2.5.2 คุณสมบัติหลักของโปรไบโอติก

2.5.2.1 ทนกรด

ก่อนเข้าสู่ลำไส้ ขั้นแรกโปรไบโอติกแบคทีเรียต้องผ่านกระเพาะอาหาร ซึ่งมีการหลั่งกรดไฮโดรคลอริกและเอนไซม์ ในแต่ละวันกระเพาะอาหารมีการหลั่งกรดมากกว่า 2 ลิตรต่อวัน ส่งผลให้ภายในกระเพาะอาหารมี pH ต่ำกว่า 1.5 เพื่อเป็นการป้องกันแบคทีเรียเข้าสู่ลำไส้ (Morelli, 2000) จากการทดสอบความสามารถในการทนกรดของ *Lactobacillus* จากแหล่งต่างๆ หลายสายพันธุ์ และ *Bifidobacterium* ซึ่งแยกได้จากลำไส้ตอนปลาย พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากลำไส้ของมนุษย์สามารถมีชีวิตรอดในสภาพ pH เป็นกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ทั่วๆ ไป (Dunne *et al.*, 2001)

2.5.2.2 ทนเกลือน้ำดี

ความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มีเกลือน้ำดีเป็นคุณสมบัติที่สำคัญยิ่งในในการคัดเลือกโปรไบโอติก (Morelli, 2000) เกลือน้ำดีถูกสังเคราะห์ขึ้นที่ตับจากคอเรสเตอรอลแล้วหลั่งไปยังลำไส้เล็กตอนต้น ประมาณ 500-700 มิลลิลิตรต่อวัน (Dunne *et al.*, 2001) ความสามารถในการทนเกลือน้ำดีของ *Lactobacilli* ที่แยกจากลำไส้ ถึงแม้เป็นชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์มีความสามารถในการทนแตกต่างกัน จากการทดสอบความสามารถในการทนเกลือน้ำดีของ *Lactobacillus acidophilus* สองสายพันธุ์ที่แยกจากลำไส้ของลูกวัว พบว่าทั้งสองสายพันธุ์ทนเกลือน้ำดีได้แตกต่างกันเมื่อทดสอบในห้องทดลอง แต่เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกทั้งสองสายพันธุ์มาผสมในอาหารลูกวัว พบว่าทั้งสองสายพันธุ์สามารถช่วยเพิ่มจำนวน *Lactobacilli* ในลูกวัว และพบว่าจำนวนของ *Lactobaciili* ในลูกวัวที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติกทั้งสองสายพันธุ์มีจำนวนมากกว่า *Lactobacilli* ในลูกวัวที่ให้อาหารโดยไม่ได้ผสมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญ (Gilliland and Speck, 1977; Morelli, 2000)

2.5.2.3 เกาะติดผนังลำไส้

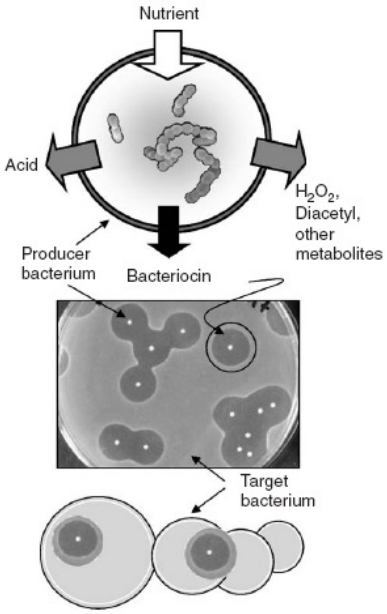
ระบบทางเดินอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งลำไส้เล็กมีแรงขับเคลื่อนบีบอัด และมีการไหลเวียนของน้ำย่อยตลอดเวลา ทั้งนี้เพื่อล้างและขับแบคทีเรียที่ปนเปื้อนเข้ามา ดังนั้นความสามารถในการเกาะติดผนังลำไส้ของโปรไบโอติกจึงเป็นคุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญ ในการเพิ่มโอกาสการอยู่รอดและอาศัยอยู่ภายในลำไส้ จากการศึกษาแบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus* ที่แยกจากสัตว์ในการเกาะติดเซลล์ผนังลำไส้ในห้องปฏิบัติการ พบว่าแบคทีเรียแลกติกสามารถเกาะติดเซลล์ผนังลำไส้ได้จำนวนมาก แต่เมื่อนำมาทดสอบในสัตว์ทดลองพบว่าความสามารถในการเกาะติดผนังลำไส้ของแบคทีเรียแลกติกลดลงทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะภายในห้องปฏิบัติการและสภาวะแวดล้อมภายในร่างกายนั้นแตกต่างกัน (Morelli, 2000) การเกาะผนังลำไส้ของแบคทีเรีย

แลกติก มีความสำคัญในการทำให้เกิดสมดุลของแบคทีเรียภายในลำไส้ โดยโปรไบโอติกแบคทีเรียจะไปแย่งจับผนังลำไส้ นอกจากนี้โปรไบโอติกยังช่วยซ่อมแซมเยื่อเมือกที่ถูกทำลาย

2.5.2.4 มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ (Ouwehand *et al.*, 2002) โปรไบโอติกที่ดีควรมีคุณสมบัติ 3 ประการ คือไม่มีการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม ให้ผลผลิตปริมาณมาก ทนออกซิเจน

2.5.2.5 ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

โปรไบโอติกแบคทีเรียผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนเข้าไปในร่างกายมนุษย์ (Dunne *et al.*, 2001) สารยับยั้งเชื้อก่อโรค ได้แก่ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 สารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติก

ที่มา: Deegan และคณะ (2006)

ก. กรดอินทรีย์ (Organic acid)

ชนิดและปริมาณกรดขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลกติก ส่วนประกอบของอาหาร สภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ (Lindgren and Dobrogosz, 1990) การยับยั้งเชื้อของกรดอินทรีย์เกิดขึ้นเนื่องจากการการลดลงของ pH และกรดที่ไม่แตกตัว โดยการลดลงของ pH ทำให้ cytoplasm มีสภาพเป็นกรด ในขณะที่กรดไม่แตกตัวจะเข้าไปใน cytoplasm ทำให้เสียสมดุลโปรตอนภายในและภายนอกเซลล์ หรือทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียความสามารถในการควบคุมการเข้าออกของสาร ซึ่งมีผลมาจากการทำลายระบบขนส่งสาร (Russell and Diez-Gonzalez, 1998; Ammor *et al.*, 2006; Makras, 2006) ในกระบวนการหมักของแบคทีเรียแลกติกจะผลิตกรดแลกติกเป็นหลัก มีทั้งรูปที่แตกตัวและไม่แตกตัวขึ้นกับ pH ของสภาพแวดล้อม

ข. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

แบคทีเรียแลกติกผลิต H_2O_2 ในสภาวะที่มีออกซิเจนโดยเอนไซม์ flavoprotein oxidase หรือ nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) peroxidase การยับยั้งเชื้อของ H_2O_2 เกิดขึ้นเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของ sulfhydryl group แล้วส่งผลให้เอนไซม์หลายชนิดถูกทำลาย และจากการเกิดปฏิกิริยา peroxidation ของ membrane lipid ส่งผลให้รูที่เยื่อหุ้มเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น หรือ H_2O_2 อาจเป็นสารตัวกลางในการผลิต bactericidal free radicals เช่น superoxide (O^-_2) และ hydroxyl (OH^-) ซึ่งสามารถทำลาย DNA ของแบคทีเรียก่อโรค (Byczkowski and Gessner, 1988; Ammor *et al.*, 2006)

ค. คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)

คาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์หลักของ heterofermentative lactic acid bacteria กลไกการยับยั้งเชื้อของ CO_2 ปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อย่างไรก็ตาม CO_2 อาจมีบทบาทในการเพิ่มสภาวะไร้ออกซิเจน ซึ่งส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ enzymatic decarboxylation และทำให้เกิดการสะสมของ CO_2 บริเวณ membrane lipid bilayer แล้วเป็นสาเหตุทำให้การควบคุมการเข้าออกสารมีความผิดพลาด

ง. ไดอะซิทิล (Diacetyl)

ไดอะซิทิล เป็น aroma component ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับกลิ่นรสของเนยผลิตโดยการใช้ซิเตรตของแบคทีเรียแลกติก ซึ่งมีผลยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียกรัมลบ โดยมีผลต่อ arginine utilization (Ammor *et al.*, 2006) พบว่าแบคทีเรียกรัมลบไวต่อไดอะซิทิลมากกว่าแบคทีเรียกรัมบวก โดยใช้เพียง 200 μg/ml และไดอะซิทิลความเข้มข้น 344 μg/ml สามารถยับยั้ง *Listeria, Salmonella, Yersinia, Escherichia coli* และ *Aeromonas* (Jay, 1982)

จ. แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคเทอริโอซินเป็นสารประเภทโปรตีน สังเคราะห์จากไรโบโซมของแบคทีเรียหลายชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียแลกติก (Klaenhammer *et al.*, 2002) มีความสามารถในการยับยั้งและฆ่าเชื้อก่อโรคทั้งกรัมบวกและกรัมลบ โดยส่วนใหญ่ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (Jamuna and Jeevaratnam, 2004; Campos *et al.*, 2006) ในปัจจุบันได้มีการเพิ่มความสนใจใช้แบคเทอริโอซินในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมากขึ้น เนื่องจากมีความปลอดภัยสูง และเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้ยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคเทอริโอซินที่ได้มาจากแบคทีเรียในอาหารหมัก ซึ่งแบคเทอริโอซินสามารถเพิ่มอายุการเก็บรักษาของอาหารได้นานขึ้น โดยจะยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียและแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Pediococcus acidilactici* และ *Pediococcus pentosaceus* ที่แยกได้จากชีสผลิต pediocin ที่สามารถยับยั้ง *Lactobacillus lactis* NCDO 176 (Gurira and Buys, 2005), *Enterococcus faecium* OQ31 ที่แยกได้จาก Mexican-style cheese ผลิต enterocin ที่สามารถลดการเจริญของ *L. monocytogenes* (Alvarado *et al.*, 2005), *Leuconostoc mesenteroides* sub sp. *dextranicum* ST 99 ที่แยกได้จากกระบวนการหมักเบียร์ผลิต mesenteriocin ST99 ซึ่งสามารถยับยั้ง *Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis, Lactobacillus* spp., *Lactococcus lactis* sub sp. *cremoris, Listeria innocoa, Staphylococcus aureus* และ *Streptocuccus thermophilus* (Todorov and Dicks, 2004), *Lactococcus lactis* ที่แยกจาก Tunisian cheese ผลิต Lactococcin MMT24 ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียแลกติกที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ได้แก่ *Lactobacillus* ssp. และ *Lactobacillus lactis* (Ghrairi *et al.*, 2005) *Lactobacillus salivarius* ผลิต bacteriocin OR-7 ยับยั้ง *Campylobacter jejuni* ในลำไส้ (Stern *et al.*, 2006) และแบคเทอริโอซิน ของ *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei* ที่แยกได้จากอาหารหมักสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้กว้างทั้งกรัมบวกและกรัมลบ เช่น *Staphylococcus aureus, Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Clostridium perfringens* และ *Vibrio parahaemolyticus* (Jamuna and Jeevaratnam, 2004)

แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรัมลบ เช่น colicin ซึ่งผลิตจาก *E. coli* จะมีขนาดใหญ่ เป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างซับซ้อน มีขนาดประมาณ 29-90 kDa โครงสร้างโปรตีนเกี่ยวกับการเกาะจับ การโยกย้าย (translocation) และมีกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อ ซึ่ง colicin จะจับกับ receptor ที่จำเพาะบน outer membrane ของเซลล์เป้าหมาย ส่วนแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรัมบวก มีขนาดเล็ก ประมาณ 3-6 kDa โดยแบ่งเป็น 2 class คือ lantibiotic bacteriocin และ non-lantibiotic bacteriocin แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรัมบวกส่วนใหญ่เป็นสารที่มีผลต่อการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเพิ่มการผ่านเข้าออกของสาร (Soomro *et al.*, 2002)

แบคเทอริโอซินแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งพิจารณาจากจุลินทรีย์ที่ผลิต การส่งออกนอกเซลล์ กิจกรรมในการยับยั้งเชื้อ (Soomro *et al.*, 2002; Deegan *et al.*, 2006) แต่นักวิจัยบางกลุ่มแบ่งแบคเทอริโอซินออกเป็น 3 กลุ่ม (ตารางที่ 2) (Klaenhammer *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2006) ได้แก่

ตารางที่ 2 ตัวอย่างแบคเทอริโอซินในแต่ละ class

Bacteriocins	**Producer**
Class I-type A lantibiotics	
nisin	*Lactococcus lactis*
lactocin S	*Lactobacillus sake*
epidermin	*Staphylococcus epidermidis*
gallidermin	*Staphylococcus gallinarum*
lacticin 481	*L. lactis*
Class I-type B lantibiotics	
mersacidin	*Bacillus subtilis*
cinnamycin	*Streptomyces cinnamoneus*
ancovenin.	*Streptomyces* ssp.
duramycin	*S. cinnamoneus*
actagardin	*Actinoplanes* ssp.
Class IIa	
pediocin PA-1/AcH	*Pediococcus acidilactici*
sakacin A	*L. sake*
sakacin P	*L. sake*
leucocin A-UAL 187	*Leuconostoc gelidum*
mesentericinY105	*Leuconostoc mesenteroides*
enterocin A	*Enterococcus faecium*
divercin V41	*Carnobacterium divergens*
lactococcin MMFII	*L. lactis*

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Bacteriocins	**Producer**
Class IIb	
lactococcin G	*L. lactis*
lactococcin M	*L. lactis*
lactacin F	*Lactobacillus johnsonii*
plantaricin A	*Lactobacillus plantarum*
plantaricin S	*L. plantarum*
plantaricin EF	*L. plantarum*
plantaricin JK	*L. plantarum*
Class IIc	
acidocin B	*Lactobacillus acidophilus*
carnobacteriocin A	*Carnobacterium piscicola*
divergicin A	*C. divergens*
enterocin P	*E. faecium*
enterocin B	*E. faecium*
Class III	
helveticin J	*Lactobacillus heleveticus*
helveticin V-1829	*L. helveticus*

ที่มา: Chen และ Hoover (2003)

กลุ่มที่ 1 Class I : Lantibiotics

Lantibiotic มาจาก Lanthionine-containing antibiotic เป็นเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน lanthionine (Lan), α-methyllanthionine (MeLan), dehydroalanine และ dehydrobutyrin แบคเทอริโอซินใน class นี้มีขนาดเล็ก <5 kDa ทนร้อน (Deegan *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2006) แบคเทอริโอซินใน class นี้แบ่งย่อยตามองค์ประกอบทางเคมีและกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อเป็น 2 subclass คือ

Subclass Ia : แบคเทอริโอซินใน subclass นี้เป็นเปปไทด์ที่มีขนาดยาว ยืดหยุ่นโค้งงอ มีประจุบวก กลไกการยับยั้งเชื้อของแบคเทอริโอซินใน subclass นี้ คือ ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย แบคเทอริโอซินที่จัดอยู่ใน subclass นี้ เช่น nisin ที่ผลิตจาก *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* ซึ่งได้รับอนุญาตจาก Food and Drug Administration (FDA) ให้ใช้ nisin ในอาหารได้ ชื่อทางการค้าของ nisin คือ Nisaplin™ สามารถยับยั้งแบคทีเรียกรัมบวกได้อย่างกว้างขวาง เช่น *Listeria monocytogenes* ที่ปนเปื้อนในอาหารกระป๋อง ผลิตภัณฑ์นม กระบวนการผลิตชีส นอกจากนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ เช่น *Bacillus* และ *Clostridium* (Deegan *et al.*, 2006)

Subclass Ib : แบคเทอริโอซินใน subclass นี้เป็นเปปไทด์ที่มีลักษณะเป็นทรงกลม โครงสร้างแข็ง ไม่ยืดหยุ่น มีประจุลบหรือไม่มีประจุ กลไกในการยับยั้งเชื้อของแบคเทอริโอซินใน subclass นี้ คือ รบกวนการทำงานของเอนไซม์ของแบคทีเรียก่อโรค (Deegan *et al.*, 2006)

กลุ่มที่ 2 Class II : แบคเทอริโอซินใน class นี้มีขนาดเล็ก <10 kDa แบ่งเป็น class ย่อยๆ ได้ 2 subclass คือ

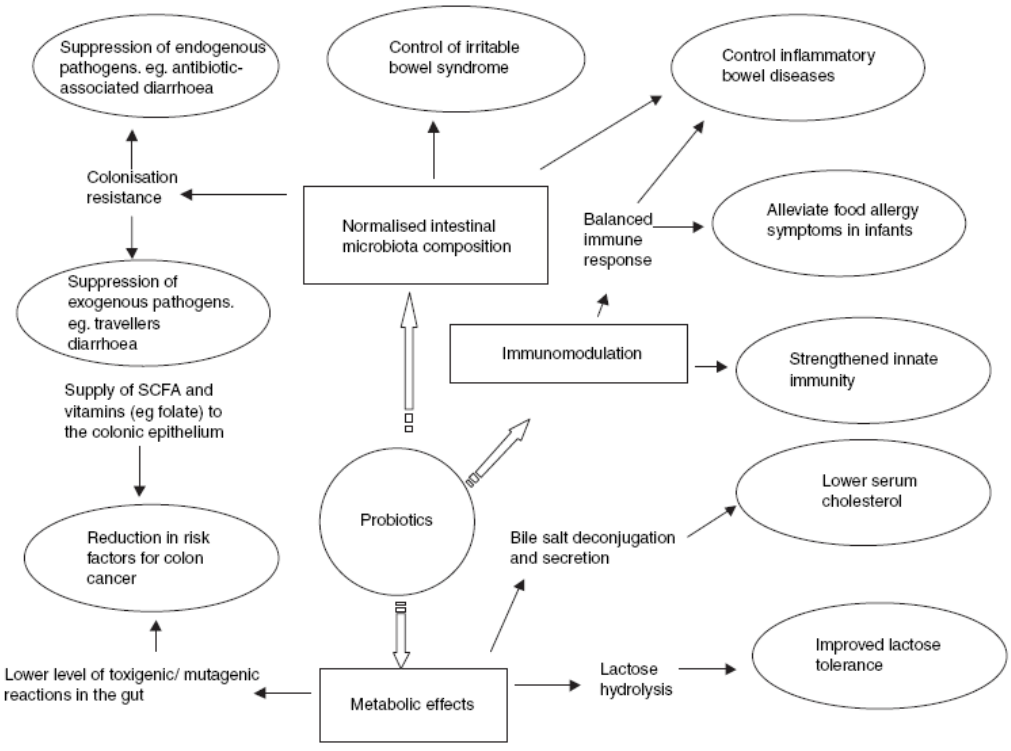
Subclass IIa : แบคเทอริโอซินใน subclass นี้ เป็น Pediocin-like peptide มีความสามารถในการยับยั้ง *Listeria* เปปไทด์ประกอบด้วย conserved N-terminal, cysteines 2 ตัว ที่เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ แบคเทอริโอซินที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ Pediocin PA-1(AcH), Leucocin A, Sakacins A และ P และ Enterocin A แบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากมีกิจกรรมการยับยั้ง *Listeria* ได้สูง และได้รับความสนใจมากว่าแบคเทอริโอซิน class I เช่น nisin เนื่องจากว่ามีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อไม่กว้าง ดังนั้นจึงไม่ยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้เป็นหัวเชื้อในการหมัก

Subclass IIb : แบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเปปไทด์ 2 สาย คือ 1 สาย มีขนาดเล็กไม่มีกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อและลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ทั้งสองสายไม่เหมือนกัน (Deegan *et al.*, 2006) แบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ ได้แก่ lactococcins G และ F และ lactacin F (Klaenhammer *et al.*, 2002; O'Sullivan *et al.*, 2002)

กลุ่มที่ 3 Class III : แบคเทอริโอซินใน class นี้ไม่เหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์ใช้ยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหาร เนื่องจากเป็นเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ >30 kDa ไม่ทนร้อน (Lin *et al.*, 2006)

2.5.3 ประโยชน์ของโปรไบโอติก (รูปที่ 3)

ในปัจจุบันมีการนำโปรไบโอติกมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมากมายหลายชนิด เช่น บทบาทของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกในนมหมัก คือ ถนอมและรักษาสภาพของนมโดยการผลิตกรดแลกติกและสารชนิดอื่นๆ เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคที่อาจปนเปื้อนในกระบวนการหมักนม นอกจากนี้ยังผลิตสาร flavour compounds เช่น acetaldehyde ในโยเกิร์ตและชีส การเพิ่มสารอาหาร เช่น free amino acids และสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นสำหรับร่างกาย มีคุณสมบัติในการรักษาหรือป้องกันโรคมะเร็ง ควบคุมปริมาณคอเรสเตอรอล เพิ่มความสามารถในการย่อยสลายแลกโตสในน้ำนมเป็นต้น (Parvez *et al.*, 2006)



รูปที่ 3 ประโยชน์ของการบริโภคโปรไบโอติก

ที่มา: Parvez และคณะ (2006)

2.6. การประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลกติก (วิเชียร, 2534)

2.6.1ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยการผลิตจากแบคทีเรียแลกติกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเคมี และอาหารมาช้านาน โดยใช้ในการปรับความเป็นกรด นอกจากนี้ยังใช้ในการถนอมอาหารเช่น อาหารหมักดอง

2.6.2 การปรับปรุงไวน์ แบคทีเรียสามารถกำจัดกรดมาลิกที่ผสมอยู่ในไวน์แดงและไวน์ขาวให้น้อยลงได้ เนื่องจากกรดมาลิกทำให้ไวน์มีรสชาติไม่ดี

2.6.3 การผลิตหญ้าหมัก (sliage) ซึ่งเป็นอาหารของสัตว์โดยใส่แบคทีเรียแลกติกในการหมักทำให้หญ้าหมักมี pH ต่ำซึ่งสามารถเก็บไว้ได้นาน

2.6.4 การป้องกันโรคเรืองแสงในกุ้ง โดยใช้แบคทีเรียแลกติกเพื่อป้องกันโรคเรืองแสงที่ระบาดในกุ้งกุลาดำ ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio harveyi*

3. เอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteolytic enzyme)

เอนไซม์ย่อยโปรตีน (protease) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการย่อยอาหาร เช่น เปปซิน ทริปซิน ไคโมทริปซิน เปปติเดส โปรติเอส ทำให้โปรตีนสูงค่าขึ้น และได้นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหมักและอุตสาหกรรมอื่นๆ หลายประเภท (ปราณี, 2543) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์ด้วยน้ำ แบ่ง 2 กลุ่ม

1. เปปทิเดส (Peptidase) เป็นเอนไซม์ที่เร่งการตัดพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณปลายสายเปปไทด์ (exocleaving peptidase) ได้แก่อะมิโนเปปทิเดส (aminopeptidase) ไดเปปทิเดส (dipetidase) และ คาร์บอกซิเปปทิเดส (carboxy peptidase)

2. โปรติเนส (Proteinase) เป็นเอนไซน์ที่เร่งปฏิกิริยาการตัดพันธะเปปไทด์ภายในสายเปปไทด์ (endoclearing peptidase) ได้แก่ ซีรีนโปรติเนส (serine proteinase) ซีสเตฮีนโปรติเนส (cysteine proteinase) แอซิดโปรติเนส (acid proteinase) และมาทาลโลโปรติเนส

4. เอนไซม์ย่อยแป้ง (Amylolytic enzyme)

เอนไซม์ย่อยแป้งสามารถพบในน้ำลาย ตับอ่อน ข้าวมอลต์ ข้าวบาเลย์และจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ (ชาคริยา, 2544) แบ่งออกเป็น 5 ชนิด คือ อัลฟาอะไมเลส (α-amylase) เบต้าอะไมเลส (β-amylase) โดยทั้งสองชนิดนี้สามารถย่อยสลายพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ α–(1,4), กลูโคอะไมเลส (γ– amylase) จะย่อยพันธะ α –(1,4) ได้ดีกว่าการย่อยพันธะ α –(1,6) และ α – (1,3) ส่วนพรูลาเสส (prulalase) และไอโซอะไมเลส (isoamylase) จะย่อยพันธะ α – (1,6) (ปราณี, 2543)

5. เอนไซม์ย่อยไขมัน (Lipolytic enzyme)

การย่อยสลายไขมันส่วนใหญ่มักอยู่ในรูปไตรกลีเซอร์ไรด์ จุลินทรีย์ใช้เอนไซม์ไลเปสสลายไขมันเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน โดยกลีเซอรอลเปลี่ยนต่อไปเป็น dihydroxyacetonephosphate ซึ่งเป็นตัวกลางในกระบวนการ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway (วิลาวัณย์, 2539)

6. Food borne pathogens

6.1 *Staphylococcus aureus* (สุมณฑา, 2545)

เป็นแบคทีเรียกรัมบวก มีลักษณะกลม (cocci) อยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น สร้างสารพิษซึ่งขับออกนอกเซลล์ เรียกว่า เอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ได้แก่ สารพิษที่ชักนำให้เกิดการหลั่งของเหลวขึ้นภายในลำไส้หรือทางเดินอาหาร เป็นผลให้เกิดอาการท้องเดิน ในอดีตโรคอาหารเป็นพิษจำกัดอยู่เฉพาะสปีชีเดียว คือ *S. aureus* แต่ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่าเชื้อสายพันธุ์อื่นก็สร้างสารพิษขึ้นด้วย แต่เนื่องจากการตรวจสอบเชื้อชนิดนี้อาศัยสมบัติการสร้างเอนไซม์โคแอกูเลส (coagulase) และเทอร์โมนิวคลีเอส (thermonuclease เขียนย่อว่า TNase) ของแบคทีเรียเป็นสำคัญ และการใช้เทคนิคนี้ในการตรวจวิเคราะห์ จึงมุ่งไปที่ *S. aureus* เพียงสปีชีเดียว หลังจากเทคนิคการตรวจหาเอนเทอโรทอกซินในอาหารได้พัฒนาขึ้น ทำให้สามารถตรวจพบเชื้อสปีชีอื่นที่สร้างเอนเทอโรทอกซินด้วย แต่มีโอกาสเกิดขึ้นน้อยกว่า *S. aureus* มาก

ในอาหารพบ *S. aureus* ประมาณ 18 สปีชี แต่มีเพียง 6 สปีชี เท่านั้นที่สร้างเอนไซม์โคเอกูเลส ส่วนมากสปีชีที่สร้างเอนไซม์โคแอกูเลสจะสร้างเอนไซม์ TNase ด้วยตามปกติคาดว่าพบ *S. aureus* ในอาหารเพียงเล็กน้อยโดยเฉพาะอาหารที่มีนมและเนื้อสัตว์เป็นส่วนประกอบ และอาหารที่ผ่านการสัมผัสและเคลื่อนย้ายด้วยมือมนุษย์ รวมทั้งอาหารที่ไม่ได้ทำให้สุกก่อนบริโภค

6.2 *Bacillus cereus*

B. cereus จัดเป็น facultative anaerobe คือ เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ ติดสีกรัมบวก รูปร่างเป็นแท่ง เซลล์มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรียทั่วไป ไม่ทนกรด เกิดสปอร์ตรงกลางเซลล์ จึงทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม พบการกระจายทั่วไปในธรรมชาติ อาการของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *B. cereus* คือ

1. อาการท้องร่วง (Diarrheal syndrome) มีอาการคล้ายกับโรคอาหารเป็นพิษที่

เกิดจาก *Clostridium perfringens* อาการเกิดขึ้นประมาณ 8-10 ชม.หลังบริโภคอาหารที่มีสารพิษ และจะหายไปภายใน 12-24 ชม. อาการที่เกิดขึ้น คือ ปวดท้อง ถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำ และปวดแสบอันเนื่องจากการถ่ายเบ่ง ส่วนอาการคลื่นไส้และอาเจียนนั้นมักไม่เกิดขึ้น

2. อาการอาเจียน (Emetic syndrome) มีอาการคล้ายกับโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus* ระยะเวลาเกิดอาการสั้นกว่า คือเกิดภายใน 1-5 ชม. ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน เป็นอยู่ประมาณ 6-24 ชม.

6.3 *Listeria monocytogenes*

เป็นแบคทีเรียกรัมบวก รูปร่างเป็นแท่ง ผอมเล็ก ไม่สร้างสปอร์ และเติบโตได้ทั้งในที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) เติบโตในช่วงอุณหภูมิกว้าง ตั้งแต่ 0 จนถึง 42°C แพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ อาจพบในผักเน่าเปื่อย ดิน มูลสัตว์ น้ำเสีย หญ้าหมัก และแหล่งน้ำ โดยทั่วไปที่ใดก็ตามที่พบแบคทีเรียแลกติก ย่อมมีโอกาสพบเชื้อ *L. monocytogenes* โดยเฉพาะนมดิบ เมื่อย้อมสีกรัม บางครั้งอาจเห็นมีลักษณะคล้ายอักษรจีน สร้างเอนไซม์คาตาเลส แต่ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส เคลื่อนที่โดยมี flagella รอบตัว (peritrichous flagella) *L. monocytogenes* สามารถแพร่มากับอาหารมาสู่คน โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์นมและเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค Listeriosis ความรุนแรงของโรคขึ้นกับพยาธิสภาพของผู้ได้รับเชื้อ ผู้ที่ไวต่อเชื้อหรือกลุ่มเสี่ยงมักมีอัตราการตายสูง ได้แก่หญิงมีครรภ์ ผู้ที่เป็นเนื้องอก ผู้เป็นโรคพิษสุราเรื้อรัง และผู้เป็นโรคภูมิคุ้มกันบ่งพร่อง

6.4 *Escherichia coli*

เป็นแบคทีเรียกรัมลบ รูปร่างเป็นแท่งสั้น ไม่สร้างสปอร์ บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากนอกลำไส้สร้างแคปซูลได้ เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน faecal coliform คือ เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ ให้ผลการทดสอบ IMViC เป็น ++-- คือ สามารถใช้ทริปโตเฟนให้อินโดล และให้ผลบวกกับเมทิลเรดแต่ไม่สร้างอะซิติลเมทิลคาร์บินัล (acetyl methyl carbinol) และไม่ใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังมีไลซีนดีคาร์บอกซิเลส (lysine decarboxylase) และสามารถใช้อะซิเตต (acetate) เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (นงลักษณ์, 2547) *E. coli* สามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม โดยอาศัยปัจจัยการก่อโรค กลไกการก่อโรค ลักษณะอาการ และความแตกต่างของ O:H serotypes ได้แก่ Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) และ Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) การอยู่รอดและการเจริญเติบโตของ *E. coli* ในอาหารขึ้นกับปัจจัยภายใน (intrinsic

factor) เช่น ความสัมพันธ์ของเชื้อกับอาหาร และปัจจัยภายนอก เช่น อุณหภูมิ, pH และค่า water activity (Aw) (Chung *et al.*, 2006)

ปัจจัยในการทำให้เกิดโรค

การที่ *E. coli* ทำให้เกิดโรคได้เนื่องจากมีไวรูเลนซ์แฟกเตอร์ (virulence factors) หลายชนิดที่ไม่พบใน *E. coli* ที่เป็นเชื้อประจำถิ่น อย่างน้อยที่สุดจะต้องมีปัจจัยอย่างใดอย่างหนึ่ง คือ มีความสามารถที่จะเกาะติดกับเซลล์บางชนิดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม สามารถที่จะบุกรุกและเข้าไปเจริญในเซลล์ของเยื่อบุผิวลำไส้ สามารถในการสร้างเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ที่ทำให้ร่างกายสูญเสียน้ำและของเหลว จึงเกิดอาการท้องร่วง การสร้างไซโททอกซิน (cytotoxin) ที่ไปขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีน จึงทำให้เกิดการตกเลือดที่ลำไส้ (hemorrhagic colitis) และการมีแคปซูลที่ป้องกันไม่ให้ถูกเม็ดเลือดขาวจับกิน ดังนั้นเมื่อได้รับเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคจะทำให้เกิดอาการท้องร่วง (gastroenteritis) ทางเดินปัสสาวะอักเสบ (urinary tract infections) โลหิตเป็นพิษ (septicemia) และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (neonatal meningitis)

วัตถุประสงค์

1. ตรวจหาปริมาณแบคทีเรียแลกติกในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้
2. ตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่อาจก่อโรคในอาหาร
3. คัดแยกชนิดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก
4. ตรวจหาแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน
5. บ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้
6. ตรวจคุณภาพของเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปในด้านปริมาณแร่ธาตุและโครงสร้างของเต้าหู้ยี้ก่อนและหลังหมัก

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 400 หน้า.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพ : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.454 หน้า

Alvarado, C., Garcia-Almendarez, B.E., Martin, S.E. and Regalado, C. 2005. Anti-Listeria monocytogenes bacteriocin-like inhibitory substances from Enterococcus faecium UQ31 isolated from artisan Mexican-style cheese. Curr Microbiol. 51: 110-115.

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. and Chevallier, I. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control 17 454-461.

Byczkowski, J.Z. and Gessner, T. 1988. Biological role of superoxide ion-radical. Int J Biochem. 20: 569-580.

Campos, C.A., Rodrı´guez, O., Calo-Mata, P., Prado, M. and Barros-Vela´zquez, J. 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from Lactococcus lactis, Enterococcus faecium and Enterococcus mundtii strains isolated from turbot (Psetta maxima) Food Research International. 39: 356-364.

Chung, H.J., Bang, W. and Drake, M.A. 2006. Stress Response of Escherichia coli COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY. 5:

Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. International Dairy Journal. 16: 1058-1071.

du Toit, M., Franz, C.M., Dicks, L.M., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., Ahrens, F. and Holzapfel, W.H. 1998. Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. Int J Food Microbiol. 40: 93-104.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F. and Collins, J.K. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. Am J Clin Nutr. 73: 386S-392S.

Ghrairi, T., Frere, J., Berjeaud, J.M. and Manai, M. 2005. Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by Lactococcus lactis isolated from rigouta cheese. Int J Food Microbiol. 105: 389-398.

Gilliland, S.E. and Speck, M.L. 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. Appl Environ Microbiol. 33: 15-18.

Han, B.Z., Rombouts, F.M. and Nout, M.J. 2001. A Chinese fermented soybean food. Int J Food Microbiol. 65: 1-10.

Jamuna, M. and Jeevaratnam, K. 2004. Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins. J Gen Appl Microbiol. 50: 79-90.

Jay, J.M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. Appl Environ Microbiol. 44: 525-532.

Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., van de Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Hols, P., Hutkins, R., Kleerebezem, M., Kok, J., Kuipers, O., Lubbers, M., Maguin, E., McKay, L., Mills, D., Nauta, A., Overbeek, R., Pel, H., Pridmore, D., Saier, M., van Sinderen, D., Sorokin, A., Steele, J., O'Sullivan, D., de

Vos, W., Weimer, B., Zagorec, M. and Siezen, R. 2002. Discovering lactic acid bacteria by genomics. Antonie Van Leeuwenhoek. 82: 29-58.

Konings, W.N. 2002. The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. 82: 3-27.

Lin, W.H., Hwang, C.F., Chen, L.W. and Tsen, H.Y. 2006. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. Food Microbiol. 23: 74-81.

Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiol Rev. 7: 149-163.

Makras, L.a.D.V., L. 2006. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. International Dairy Journal. 16: 1049-1057.

Morelli, L. 2000. In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. Curr Issues Intest Microbiol. 1: 59-67.

O'Sullivan, L., Ross, R.P. and Hill, C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. Biochimie. 84: 593-604.

Ouwehand, A.C., Salminen, S. and Isolauri, E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. Antonie Van Leeuwenhoek. 82: 279-289.

Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S. and Kim, H.Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. J Appl Microbiol. 100: 1171-1185.

Russell, J.B. and Diez-Gonzalez, F. 1998. The effects of fermentation acids on bacterial growth. Adv Microb Physiol. 39: 205-234.

Soomro, A.H., Masud, T. and Anwaar, K. 2002. Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health – A Review. Pakistan Journal of Nutrition. 1: 20-24.

Stern, N.J., Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Pokhilenko, V.D., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E. and Seal, B.S. 2006. Isolation of a Lactobacillus salivarius strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to Campylobacter jejuni in the chicken gastrointestinal system. Antimicrob Agents Chemother. 50: 3111-3116.

Todorov, S.D. and Dicks, L.M. 2004. Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum ST99 isolated from boza. J Ind Microbiol Biotechnol. 31: 323-329.