บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันผู้บริโภคได้ให้ความสนใจต่อสุขภาพของตนเองมากขึ้น และหันมาให้ความสนใจเกี่ยวกับความปลอดภัยในการบริโภคอาหารกันมากขึ้น ทั้งความปลอดภัยจากเชื้อก่อโรค สารเคมีที่ใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร และที่สำคัญ คือ ยาปฏิชีวนะที่ตกค้างในอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ หรือผลิตภัณฑ์ของเนื้อสัตว์ เนื่องจากไม่มีการหยุดใช้ยาก่อนส่งเนื้อสัตว์ออกไปจำหน่ายเป็นระยะเวลาอย่างเพียงพอ และการใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ติดต่อกันเป็นเวลานานจึงทำให้เกิดการดื้อยา อาจมีการถ่ายทอดไปยังจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ซึ่งก่อให้เกิดโรคต่อผู้บริโภคได้ ดังนั้นในหลายประเทศ โดยเฉพาะประเทศในทวีปยุโรปได้มีการห้ามใช้ยาปฏิชีวนะผสมในอาหารสัตว์เพื่อเป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์ และงดการนำเข้าอาหารจำพวกเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์ของเนื้อสัตว์ที่มียาปฏิชีวนะตกค้าง (อุทัย คันโธ, 2535) ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษากัน คือ การนำจุลินทรีย์มาใช้ โดยเฉพาะจุลินทรีย์จากอาหารหมักประเภทต่างๆ ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับโปรไบโอติกยังได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (food and Drug Administration : FDA) ให้เป็นสารที่มีความปลอดภัยในการใช้ (Generally Recognized As Safe : GRAS) (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่พบในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งจะช่วยในการปรับสภาพของระบบทางเดินอาหาร ให้เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ และช่วยทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นโทษให้ลดลง โดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์อาจมีการสร้างสารปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นตัวช่วยควบคุมจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรค มีการแย่งพื้นที่จับตัวกับเยื่อบุผนังลำไส้เล็ก ทำให้กลุ่มจุลินทรีย์

ที่เป็นเชื้อไม่สามารถมาเกาะ จึงทำให้ไม่มีการแสดงฤทธิ์ของเชื้อโรคออกมา มีการสร้างกรดแลกติก ซึ่งทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น ทำให้มีการย่อยและการใช้ประโยชน์สารอาหารต่างๆดีขึ้น (กิจการ ศุภมาตย์, 2541)

โปรไบโอติกมีคุณสมบัติที่สำคัญ คือ ประการแรก ทนต่อสภาพที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร ซึ่งการมีชีวิตรอดนั้นขึ้นกับความสามารถในการทนต่อ pH ต่ำ โดย pH ในกระเพาะอาหารมีค่าเป็น 2 แต่เมื่อรับประทานอาหารเข้าไป pH จะเพิ่มเป็น 3 ภายหลังจากการย่อยของอาหาร 2-4 ชม. กระเพาะอาหารก็จะว่าง ประการที่ 2 การทนต่อเกลือน้ำดี (bile salt) ในลำไส้เล็ก ซึ่งสร้างจาก cholesterol ภายในตับเก็บไว้ในถุงน้ำดี และจะปล่อยมายังลำไส้เล็กเมื่อมีการย่อยอาหารพวกไขมัน และเกลือน้ำดีจะเป็นตัวที่ช่วยในการขับสารตกค้างในร่างกาย เช่น ยา หรือแร่ธาตุบางตัว พบว่าโปรไบโอติกสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.30 (Erkkila and Petaja, 2000)

จุลินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกจะอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ Lactobacillus และ Bifidobacterium ซึ่งแบคทีเรียทั้งสอง มีคุณสมบัติในการหมักให้กรดแลกติก (Kontula *et al.*, 1998) จึงมีการใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์พวกอาหารหมักดองทั้งประเภทพืชและสัตว์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เพื่อป้องกันการเกิดโรคเรืองแสงที่ระบาดในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio harveyi* (Rengpipat *et al.*, 1998) และใช้ในการควบคุมโรคที่เกิดกับปลาแซลมอนในแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งเกิดจากเชื้อ *V. anguillarum* และ *V. ordalii* (Austin *et al.*, 1995)

การวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากอาหารหมักประเภทต่างๆ เพื่อเป็นแนวทางในการที่จะนำมาปรับปรุงคุณภาพ และเพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคอาหารของผู้บริโภคต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. นิยามโปรไบโอติก

โปรไบโอติก หมายถึง จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่มีประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน (host) มีผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ มีสมบัติในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารและทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้ สามารถผลิตกรดแลกติกและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้ อีกทั้งยังทำให้เกิดสมดุลในระบบการย่อยอาหาร การขับถ่าย ช่วยในการพัฒนาสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ให้ดีขึ้น (นวลจันทร์ พารักษา, 2533; Kontula *et al.*, 1998)

2. คุณสมบัติของโปรไบโอติก

2.1 สามารถสร้างกรดแลกติก ทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น จึงเกิดการย่อย และการใช้ประโยชน์จากสารอาหารต่างๆได้ดีขึ้น (กิจการ ศุภมาตย์, 2544) และปรับสภาพของระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่แบคทีเรียโคลิฟอร์มเจริญได้ยาก (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

2.2 สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารได้ดี (Kontula *et al.*, 1998) เช่น *Lactobacillus acidophilus* (ADH) สามารถทนต่อกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์อื่นๆ (Conway *et al.*, 1986) *Lactobacillus gasseri* สามารถรอดชีวิตมากที่ pH 3, 2 และ 1.5 ตามลำดับ (Arihara *et al.*, 1998) Lactobacillus สายพันธุ์ BFE 1058 และ 1061 มีความสามารถในการทนต่อ pH ต่ำได้ดีกว่าสายพันธุ์ BFE 1059 (Toit *et al.*, 1998) และ *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถมีชีวิตรอดได้สูงสุดที่ pH 3 (Erkkila and Petaja, 2000)

2.3 สามารถทนต่อน้ำดีได้เนื่องจากน้ำดีมีหน้าที่ขับสารตกค้างในร่างกาย เช่น ยา หรือแร่ธาตุบางตัว (Kontula *et al.*, 1998) จากรายงานของ Shirota (1962) กล่าวว่า Lactobacillus ที่ทนต่อเกลือน้ำดีได้สูง ได้แก่ *L. bulgaricus, L. fermenti, L. casei, L. acidophilus* และ *L. casei* shirota ทนได้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2, 4, 10, 12 และ 15 ตามลำดับ *Lactobacillus acidophilus* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacilli ซึ่งอยู่ในลำไส้

ของมนุษย์และสัตว์มีสมบัติทนต่อเกลือน้ำดี และมีความสำคัญต่อระบบสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ อาหารเสริมที่มีเซลล์ของ *Lactobacillus acidophilus* จะช่วยปรับปรุงและรักษาสมดุลจุลินทรีย์ในระบบลำไส้ และช่วยรักษาโรคที่เกิดกับลำไส้ด้วย (Brennan *et al.*, 1993) *Lactobacillus reuteri* (BFE 1058) และ *L. johnsonii* (BFE 1061) มีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีมากกว่า *L. johnsonii* (BFE 1059) (Chateau *et al.*, 1994) และ *Lactobacillus* sake (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.30 (Erkkila and Petaja, 2000)

2.4 เมื่อเจริญร่วมกับจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร สามารถออกฤทธิ์ได้ดีในทางเดินอาหารทุกส่วน (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

2.5 สามารถแข่งขันกับเชื้อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้ซึ่งโดยปกติเชื้อโรคจะเข้าเกาะและต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ที่มีการบีบตัวให้อาหารเคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น (peristalsis) (Fuller, 1993) ซึ่งการเกาะเคลือบของโปรไบโอติกที่ผนังทางเดินอาหารนี้จะทำให้การย่อยอาหาร และการดูดซึมเป็นไปอย่างปกติ (Fuller, 1993)

2.6 ไม่ถูกดูดซึมในทางเดินอาหาร (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

2.7 ไม่หลงเหลืออยู่ในเนื้อเยื่อ (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

2.8 สามารถสร้างเอนไซม์ pectinase, β-galactosidase, amylase, protease, lactase และ cellulase มีผลทำให้การย่อย และการใช้ประโยชน์ของสารอาหารต่างๆดีขึ้น (อุทัย คันโธ, 2535)

2.9 สามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อโรคทั้งที่เป็น primary metabolite เช่น กรดอินทรีย์ และ secondary metabolite เช่น hydrogen peroxide และ bacteriocin เป็นต้น (Fuller, 1993)

2.10 การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ ซึ่งสามารถพบได้ใน Lactobacillus ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง gamma globulin, gamma interferon และส่งเสริมกิจกรรมของ macrophage ซึ่งเป็นสาเหตุของการกำจัดเชื้อโรคออกจากร่างกาย (Fuller, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Kaila (1992) มีการนำ *Lactobacillus* sp. (GG) จากผลิตภัณฑ์นมหรือโยเกิร์ตให้ผู้ป่วยโรคท้องร่วงรับประทาน พบว่า ทำให้ร่างกายผู้

ป่วยสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้นถึงร้อยละ 90 เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับประทาน *Lactobacillus* sp. (GG) มีการสร้างภูมิคุ้มกันเพียงร้อยละ 46

2.11 ลดการสังเคราะห์เอมีนที่เป็นพิษในระบบทางเดินอาหารเพื่อเพิ่มการใช้ประโยชน์ของสารต่างๆในร่างกาย (อุทัย คันโธ, 2535)

2.12 ลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon) โดยไปลดเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุของการ เกิดโรคมะเร็ง เช่น β-glucuronidase, azoreductase, nitrate reductase และ β-glucosidase (Kontula *et al.*, 1998) สอดคล้องกับการรายงานของ Gilland (1989) พบว่า นมที่มี *Lactobacillus casei* เป็นส่วนประกอบจะช่วย กระตุ้นการทำงานของ macrophage ในหนูได้ โดยการทดสอบให้หนูกินนมที่มี *L. casei* เป็นส่วนประกอบ หลังจาก 8 วันนำหนูมาฆ่า และตรวจกิจกรรมของเอนไซม์ที่มาจาก macrophage ในการทดลองนี้วัดกิจกรรมของเอนไซม์ lactase dehydrogenase (LDH) พบว่าการบริโภคนมที่มีส่วนประกอบของ *L. casei* จะมีผลในการเพิ่มระดับของ LDH ทำให้ลดการเพิ่มของเซลล์มะเร็งในร่างกายได้

2.13 แย่งอาหารของเชื้อก่อโรค (Fuller, 1993)

2.14 การออกฤทธิ์ของสารยับยั้งคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

2.15 สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีแหล่งอาหารน้อย (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

2.16 เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และสามารถยังชีพอยู่ในลำไส้ได้นานประมาณ 24 ชม. (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

2.17 ไม่สามารถสร้างสารพิษ (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

16) ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หรือดื้อยา (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

17) สามารถเจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิกว้าง คือ 20-60 °C (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

18) สร้างสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น folate ช่วยสร้างเม็ดเลือดแดง และวิตามินบี 2 ที่ช่วยบำรุงเส้นผมและเล็บ (Fuller, 1993)

19) ลดระดับของ cholesterol ในเลือด (กิจการ ศุภมาตย์, 2544) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Buke and Gilland (1990) โดยมีการใช้เชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ควบคุมระดับ cholesterol ได้ เนื่องจากจะช่วยดูดซึม cholesterol ในลำไส้ได้ โดยแยกเชื้อ *L. acidophilus* จากอุจจาระของอาสาสมัคร 9 คน พบว่า *L. acidophilus*

(O16) จะดูดซึม cholesterol ได้มากที่สุด คือ 50.9 μg/ml และ D5 จะดูดซึมได้น้อยที่สุด คือ 28 μg/ml

3. จุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหาร (นวลจิรา ภัทรรังรอง, 2538)

ในระบบทางเดินอาหารมีจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora หรือ normal microbiota) แตกต่างกันหลายชนิด แต่จุลินทรีย์สามารถผ่านกระเพาะอาหารเข้าไปในลำไส้ได้ โดยปกติลำไส้เล็กส่วนบนจะมีจุลินทรีย์ไม่มาก เช่น Streptococcus, Lactobacillus และยีสต์ มีจำนวน 10^1-10^2 CFU/ml แต่บริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) จะมีเชื้อ 10^6-10^8 CFU/ml โดยเป็นแบคทีเรีย family Enterobacteriaceae และ Bacteriodes เด็กทารกหลังจากคลอดได้ไม่กี่ชั่วโมงสามารถพบ normal flora ที่ผิวหนัง เช่น Staphylococcus และ Corynebacterium เป็นต้น และแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ เช่น Bifidobacterium, Clostridium, Lactobacillus และ Streptococcus เมื่อเวลาผ่านไป normal flora จะเปลี่ยนแปลงไป คือ ในลำไส้ของผู้ใหญ่ส่วนใหญ่เป็นสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobe condition) ได้แก่ Bacteroides, Clostridium, Peptostreptococcus, Bifidobacterium และ Eubacterium เป็นต้น โดยมีจำนวนมากกว่ากลุ่มที่ต้องการออกซิเจน (aerobe) ในอัตราส่วน 1000 : 1 แบคทีเรียในกลุ่มที่ต้องการออกซิเจน ได้แก่ *Escherichia coli* สมาชิกอื่นๆใน family Enterobacteriaceae, Enterococcus และ Streptococcus จำนวนแบคทีเรียต่อกรัมของอุจจาระที่อยู่ในลำไส้จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อใกล้กับลำไส้ใหญ่ส่วนท้าย (sigmoid colon) ร้อยละ 80 ของอุจจาระแห้งของคนปกติ จะมีแบคทีเรีย 10^{11}-10^{12} CFU/g เมื่อได้รับยาปฏิชีวนะจะพบเชื้อจุลินทรีย์ฉวยโอกาส (opportunistic microorganism) ในลำไส้ใหญ่ เช่น *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans* และ แบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยา จำนวนเชื้อในแต่ละบริเวณของระบบทางเดินอาหาร ดังแสดงใน (ตาราง 1)

ตาราง 1 จำนวนจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์

ระบบทางเดินอาหาร	จุลินทรีย์ [1]	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต่อ ml
กระเพาะอาหาร	Streptococcus Lactobacillus	10^1-10^2
ลำไส้เล็กส่วน duodenum และ jejunum	จุลินทรีย์เหมือนกับ กระเพาะอาหาร	10^2-10^4
ลำไส้เล็กส่วน ileum	Bateroides Clostridium Streptococcus Lactobacillus	10^6-10^8
ลำไส้ใหญ่	Bacteroides Eubacterium Peptococcus Bifidobacterium Streptococcus Fusobacterium	10^{11}-10^{12}

[1] จุลินทรีย์สปีชีส์หลักที่แยกได้จากตำแหน่งที่ต่างกันในระบบทางเดินอาหาร

ที่มา : Salminen and Wright (1993)

4. ชนิดของแบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria)

4.1 ลักษณะโดยทั่วไป

แบคทีเรียแลกติกสามารถย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลม หรือเป็นรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์ catalase (Axelsson, 1993) สร้างกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมักคาร์โบไฮเดรตได้พลังงานจากน้ำตาล และสารที่

มีโครงสร้างคล้ายน้ำตาล โดยได้จากกระบวนการ substrate-level phosphorylation การเลี้ยงเชื้อในอาหารธรรมดาค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อมีความต้องการอาหารที่ซับซ้อน เช่น วิตามินต่างๆ amino acid pyrimidine สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในบริเวณที่มีออกซิเจน ไม่มีออกซิเจน และมีออกซิเจนน้อย อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53°C อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40°C ช่วง pH ที่เหมาะสม 5.58-6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่ pH≤5 อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลาง หรือเป็นด่าง (Salminen and Wright, 1993)

4.2 แหล่งที่พบ

แบคทีเรียแลกติกสามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ผลิตภัณฑ์ข้าว ผลิตภัณฑ์จากเนื้อและปลา ไวน์ ผลไม้ และน้ำผลไม้ อีกทั้งยังเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในช่องปาก ทางเดินอาหาร และอวัยวะสืบพันธุ์ (Salminen and Wright, 1993)

4.3 ความต้องการสารอาหารของแบคทีเรียแลกติก

แบคทีเรียแลกติกเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องการอาหารพิเศษหรือเฉพาะในการเจริญเติบโต (fastidious microorganism) มีความต้องการสารอาหารต่างๆ เช่น

คาร์โบไฮเดรต (Salminen and Wright, 1993)

แบคทีเรียแลกติกสามารถใช้น้ำตาลได้หลายประเภทจาก monosaccharide ประเภท pentose เช่น arabinose, ribose และ xylose เป็นต้น และ hexose เช่น fructose และ mannose disaccharide เช่น maltose trisaccharide เช่น maltotriose polymer เช่น แป้ง

นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตพวก oligosaccharides เช่น raffinose และ fructooligosaccharide เป็นต้น ซึ่งในระบบทางเดินอาหารไม่มีเอนไซม์ที่จะย่อยคาร์โบไฮเดรตชนิดนี้ได้

ในกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตได้ผลิตผล 2 แบบ คือ homofermentative ได้กรดแลกติกเพียงอย่างเดียว และ heterofermentative ได้กรดแลกติก กรดอะซิติก เอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

ไนโตรเจน (Salminen and Wright, 1993)

แบคทีเรียแลกติกสามารถเติบโตได้ดีในอาหารที่มีสารอาหารมาก หลายสายพันธุ์ต้องการกรดอะมิโนหลายชนิด และจะเจริญได้น้อยมากหากไม่มีแหล่งไนโตรเจน กรดอะมิโนที่แบคทีเรียแลกติกต้องการ เช่น serine และ arginine เป็นต้น

วิตามิน (Salminen and Wright, 1993)

วิตามินที่แบคทีเรียแลกติกใช้ในการเจริญเติบโต ได้แก่ thiamine (B1), riboflavine (B2), pyridoxin (B6), folic acid (B9), cyanocobalamine (B12) และ nicotinic acid โดยที่ Bifidobacterium และ *B. infantis* สามารถสังเคราะห์วิตามิน B1, B2, B6, B9 และ B12 ได้เป็นจำนวนมาก ส่วน *B. brevis* and *B. longum* สามารถสังเคราะห์วิตามิน B12, B6, B9 และ B12 ได้เป็นจำนวนน้อย และ *B. adolescentis* ไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินดังกล่าวข้างต้น นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกบางสายพันธุ์ยังต้องการ nicotinic acid, pantothenic acid, biotin, riboflavin และ folinic

4.4 การจัดจำแนก

แบคทีเรียแลกติก ประกอบด้วยแบคทีเรียสกุล Aerococcus, Carnobacterium, Leuconostoc, Lactococcus, Oneococcus, Enterococcus, Bifidobacterium, Propionibacterium, Lactobacillus, Weissella, Vagococcus, Tetragenococcus, Streptococcus และ Pediococcus

การจัดกลุ่มแบคทีเรียแลกติกสกุลต่างๆขึ้นอยู่กับรูปร่างลักษณะ รูปแบบการหมักน้ำตาลกลูโคส การใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ การผลิตกรดแลกติก การเจริญในที่มีเกลือเข้มข้นสูง และการทนเกลือหรือด่าง (Axelsson, 1993)

แบคทีเรียแลกติกจัดจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามกระบวนการและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก คือ homofermentative และ heterofermentative

1) **Homofermentative** หมายถึง แบคทีเรียพวกที่หมักน้ำตาลกลูโคส (hexose) โดยทำการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวต อาศัยเอนไซม์อัลโดเลสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แล้วให้กรดแลกติกประมาณ ≥ร้อยละ 80 โดยผ่าน glycolysis pathway (Embden-Meyerhof pathway) ดังแสดงใน (ภาพประกอบ 1) ซึ่งเป็นแบคทีเรียสกุล *Pediococcus, Streptococcus* และ *Lactobacillus* บางชนิด เช่น

Pediococcus (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

เซลล์เป็นรูปกลม เรียงตัวเป็นคู่หรือสี่เซลล์ติดกัน (tetrad) เคยมีการเข้าใจว่ามีการแบ่งระนาบเดียวให้เซลล์เป็นโซ่ยาวแล้วเรียงตัวใหม่เป็นสี่เซลล์ เป็นพวกที่สามารถเติบโตได้ทั้งบริเวณที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) หมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแลกติกไม่ให้ก๊าซ ไม่ทำให้เกิดโรคในพืชหรือสัตว์ มักพบในอาหารหมัก ไม่ค่อยพบในนม และผลิตภัณฑ์นม ตัวอย่างเช่น

Pediococcus pentosaceus

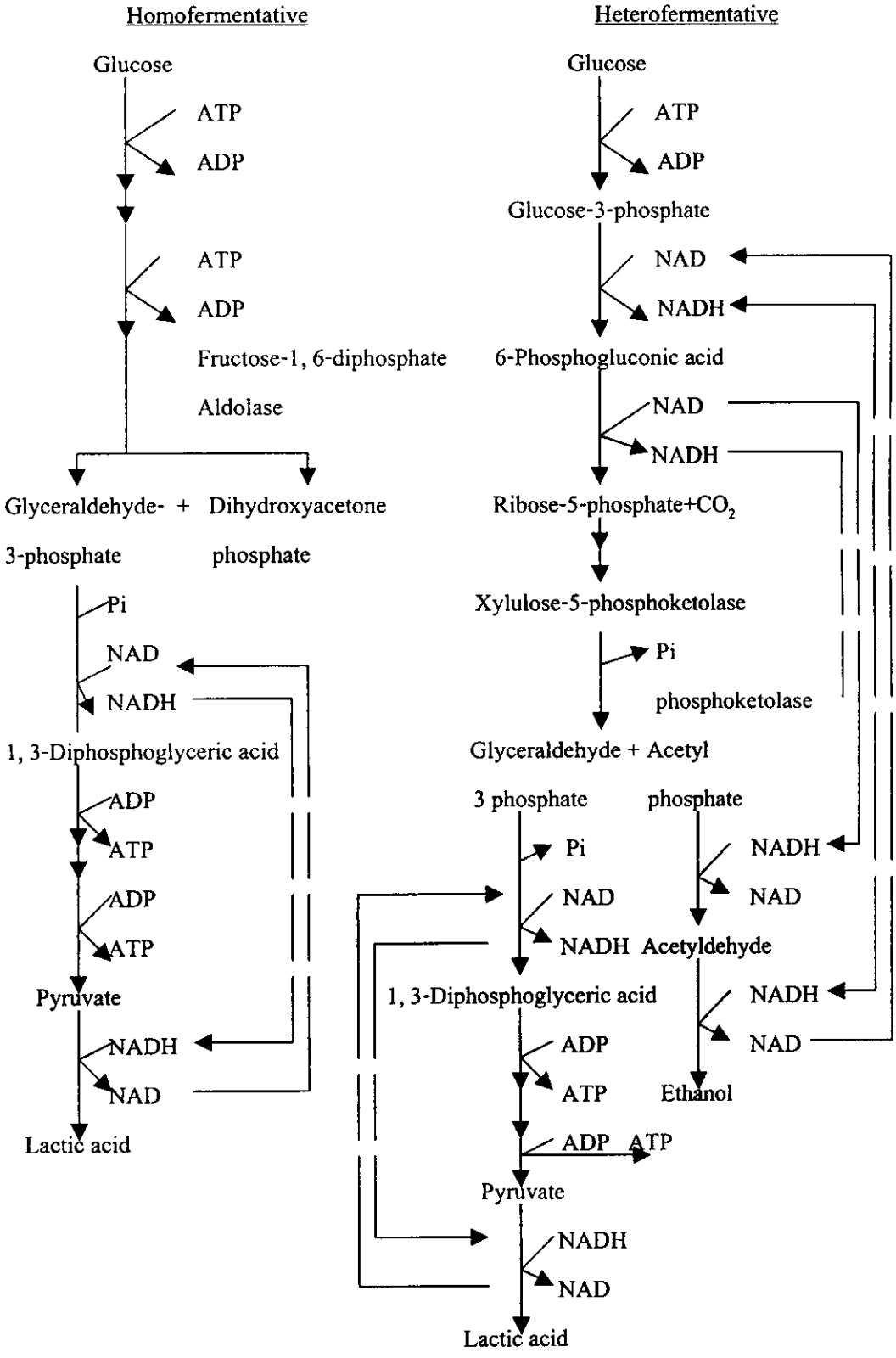
เซลล์เป็นรูปกลมหรือรีมีขนาด 0.8-1.0 ไมโครเมตร เมื่อเติบโตบนอาหาร glucose, peptone yeast extract โคโลนีสีขาวขนาดเล็กมาก ต้องการกรดอะมิโนและสารเร่งการเจริญเติบโต เช่น biotin, niacin, folic acid ในการเจริญเติบโต ไม่ทนความร้อน เซลล์ถูกทำลายที่ 65°C 8 นาที มักพบในอาหารหมัก เช่น แตงกวาดอง

Pediococcus acidilactici

เซลล์เป็นรูปกลมหรือรีมีขนาด 0.6-1.0 ไมโครเมตร ต้องการกรดอะมิโนและสารเร่งการเจริญเติบโต เช่น riboflavin, pyridoxin, pentatonic acid ในการเจริญเติบโต อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต 40°C อุณหภูมิสูงสุด 52°C ทนความร้อนได้ดีกว่า *Pediococcus pentosaceus* คือเซลล์ถูกทำลายที่ 70°C 10 นาที มักพบในอาหารหมัก เช่น กะหล่ำปลีดอง

Pediococcus halophilus

เซลล์เป็นรูปกลมมีขนาด 0.6-0.8 ไมโครเมตร การเจริญเติบโตบนผิวหน้าอาหารแข็งเจริญเติบโตได้ช้ามาก ส่วนในอาหารเหลวก็เช่นกัน ต้องใช้เวลา 4-5 วัน pH ที่



ภาพประกอบ 1 วิถีทางการใช้กลูโคสของแบคทีเรียแลกติกพวก homofermentative heterofermentative (Axelsson, 1993)

เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 7 และ 8 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบ เช่น riboflavin, niacin, folic acid เจริญเติบโตได้ดีในที่ ที่มี NaCl ร้อยละ 6-8 เติบโตได้ดีในที่ที่มีเกลือร้อยละ 18 และอาจทนต่อเกลือความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 20-26 อุณหภูมิ 40°C มักพบในอาหารหมักที่มีเกลือความเข้มข้นสูงๆ เช่น เต้าเจี้ยว ซีอิ้ว น้ำปลา

Streptococcus (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

โดยปกติเป็นเซลล์รูปกลม หรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 2 ไมโครเมตร มักเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นสายเมื่อเติบโตในอาหารเหลว เป็นพวกที่สามารถเติบโตได้ทั้งบริเวณที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) บางชนิดต้องการก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มเติมในเติบโต เมื่อหมักคาร์โบไฮเดรตให้กรดแลกติกเป็นสารอาหารหลัก ไม่ให้ก๊าซ บางชนิดสามารถหมักกรดอินทรีย์ได้ เช่น malic acid, citric acid และ amino acid เช่น serine, arginine คะตาเลสให้ผลลบ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตปกติประมาณ 37°C ส่วนอุณหภูมิสูงสุดและอุณหภูมิต่ำสุดในการเจริญเติบโตแตกต่างกันในแต่ละชนิด ตัวอย่างเช่น

Streptococcus lactis

เซลล์รูปไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่เรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นสายสั้นๆ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตประมาณ 30°C ไม่เติบโตที่อุณหภูมิ 45°C เติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี NaCl ร้อยละ 4 ไม่เติบโตที่ร้อยละ 6 บางสายพันธุ์สร้างสารปฏิชีวนะ nisin ซึ่งมีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด มักพบแบคทีเรียชนิดนี้ในนมและผลิตภัณฑ์นม

Streptococcus lactis subsp. *diacetyllactis*

ลักษณะโดยทั่วไปเหมือน *S. lactis* แต่ *S. lactis* สายพันธุ์นี้สามารถหมัก citrate ให้ carbon dioxide, acitoin และ diacetyl

Streptococcus cremoris

เซลล์รูปกลมหรือรูปไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6-1.0 ไมโครเมตร มักเรียงตัวเป็นสายยาวโดยเฉพาะในนม อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตประมาณ

30°C ไม่เติบโตที่อุณหภูมิ 40°C สามารถเติบโตที่อุณหภูมิ 10°C ไม่สามารถเติบโตในอาหารที่มีเกลือร้อยละ 6 บางสายพันธุ์สามารถสลาย citrate เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ acitic acid และ diacetyl บางสายพันธุ์ผลิตสารคล้ายสารปฏิชีวนะ ต่างจาก *S. lactis* คือ ไม่สร้างarginine มักพบในนมดิบและผลิตภัณฑ์นม

Streptococcus thermophilus

เซลล์รูปกลมหรือรูปไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7-0.9 ไมโครเมตร มักเรียงตัวเป็นสายยาวเติบโตในอาหารที่มีเกลือร้อยละ 2.5 แต่ที่ร้อยละ4 ไม่สามารถเติบโต อุณหภูมิต่ำสุดสำหรับการเจริญเติบโต 19-21°C อุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเจริญเติบโต 52°C เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C อยู่รอดที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที มักพบในนมและผลิตภัณฑ์นม เช่น เนยแข็งสวิส โยเกิร์ต

Lactobacillus (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

เซลล์รูปท่อนยาว ท่อนสั้น coccobacilli มักเรียงตัวเป็นสาย ติดสีแกรมบวก และจะติดสีแกรมลบเมื่ออายุมากขึ้นและอยู่ในสภาพที่เป็นกรด เป็นพวกที่ทนกรด (aciduric) อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลาง หรือเป็นด่าง เป็นพวก microaerophilic มักพบในผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์ธัญพืช ผลิตภัณฑ์เนื้อ ปลา ไวน์ เบียร์ ผลไม้ น้ำผลไม้ ผักดอง และบริเวณเนื้อเยื่อในท่อทางเดินอาหารและช่องคลอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ตัวอย่างเช่น

Lactobacillus acidophilus

เซลล์เป็นรูปท่อน ขนาด 0.6-0.9 x 1.5-6 ไมโครเมตร อาจอยู่เดี่ยวๆหรือเรียงตัวเป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ ต้องการสารเร่งการเจริญเติบโต เช่น calciumpentotinate, folic acid, niacin และ riboflavin แยกได้จากอุจจาระของทารก

Lactobacillus delbrueckii

เซลล์เป็นรูปท่อน ขนาด 0.5-0.8 x 2-9 ไมโครเมตร อาจอยู่เดี่ยวๆหรือเรียงตัวเป็นสายสั้นๆไม่เคลื่อนที่ ต้องการสารเร่งการเจริญเติบโต คือ pentotinic acid และ niacin บางสายพันธุ์ต้องการ riboflavin, folic acid, vitamin B 12 และ thaimine และไม่

ต้องการ thaimine, pyridoxin, biotin และ para aminobenzoic acid แบ่งได้เป็น 3 ชนิดย่อย คือ

Lactobacillus delbrueckii subsp. *delbrueckii*

แยกได้จากผักดองที่หมักที่อุณหภูมิสูงๆ (40-53°C)

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*

แยกได้จากโยเกิร์ต และเนยแข็ง

Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis*

แยกได้จากนม เนยแข็ง ยีสต์ขนมปัง และธัญพืช

2) Heterofermentative หมายถึง แบคทีเรียพวกที่หมักน้ำตาลกลูโคส แล้วให้คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 20-25 กรดแลกติกร้อยละ 50 กรดอะซิติก และเอธานอลร้อยละ 20-25 โดยผ่าน phosphoglyconate pathway หรือ phosphoketolase pathway ดังแสดงใน (ภาพประกอบ 1) ซึ่งเป็นแบคทีเรียสกุล Leuconostoc และ Lactobacillus บางชนิด เช่น

Leuconostoc (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

เซลล์อาจเป็นรูปกลม แต่โดยมากมักเป็นรูปรี โดยเฉพาะเมื่อเติบโตในอาหารแข็ง การเรียงตัวมักเป็นคู่หรือเป็นสาย เป็นพวกที่สามารถเติบโตได้ทั้งบริเวณที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เมื่อเติบโตในอาหารแข็งโคโลนีมีขนาดเล็กมาก โดยมากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมักน้อยกว่า 1 มม. มักต้องการกรดอะมิโน และสารเร่งการเจริญเติบโต ทุกชนิดต้องการ nicotinic acid, thiamine, biotin และ pentotinic acid หมักน้ำตาลกลูโคสให้ lactic acid, ethanol และ carbondioxide ตัวอย่างเช่น

Leuconostoc mesenteroides

Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides*

เซลล์เป็นรูปกลมหรือรีมีขนาด 0.5-0.7 x 0.7-1.2 ไมโครเมตร มักเรียงตัวเป็นคู่หรือสายสั้นๆ สามารถสร้างเมือกเดกซ์แทรนจากน้ำตาลซูโครสได้ดีที่อุณหภูมิ 20-25°C

ในอาหารเหลวกลูโคสเซลล์ไม่สามารถอยู่รอดได้เมื่อให้ความร้อน 55°C นาน 30 นาที มักพบในสารละลายน้ำตาล ผัก ผลไม้ นม และผลิตภัณฑ์นม

Leuconostoc mesenteroides subsp. *dextranicum*

เซลล์เป็นรูปกลมหรือรีมีขนาด 0.5-0.7 x 0.7-1.2 ไมโครเมตร มักเรียงตัวเป็นคู่หรือสายสั้นๆ สามารถสร้างเมือกเด็กซ์แทรนจากน้ำตาลซูโครสได้เช่นกัน แต่ไม่ดีเท่า *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* มักพบในผัก ผลไม้ นม และผลิตภัณฑ์นม

Leuconostoc mesenteroides subsp. *cremoris*

เซลล์เป็นรูปกลมหรือรีมีขนาด 0.8-1.2 ไมโครเมตร มักเรียงตัวเป็นสายยาว ส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครส สามารถละลาย citrate เป็น acitate, carbondioxide acitone และ diacetyl มักพบในนม และผลิตภัณฑ์นม

Leuconostoc lactis

เซลล์เป็นรูปกลมหรือรีมีขนาด 0.5-0.7 x 0.7-1.2 ไมโครเมตร ทนต่อความร้อนได้ดีกว่าชนิดอื่นๆ โดยปกติสามารถอยู่รอดที่อุณหภูมิ 60°C 30 นาที มักพบในนม และผลิตภัณฑ์นม

Lactobacillus (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

ตัวอย่าง *Lactobacillus* ที่เป็นกลุ่ม heterofermentative ได้แก่

Lactobacillus plantarum

เซลล์เป็นรูปท่อน ขนาด 0.9-1.2 x 3-8 ไมโครเมตร มักอยู่เดี่ยวๆหรือเรียงตัวเป็นคู่ ต้องการ calciumpentotinate, niacin ในการเจริญเติบโต แยกได้จากผลิตภัณฑ์นม ผัก ดอง ผลิตภัณฑ์มะเขือเทศเน่าเสีย ช่องปาก และอุจจาระคน

Lactobacillus casei

เซลล์เป็นรูปท่อน ขนาด 0.7-1.1 x 2.0-4.0 ไมโครเมตร ต้องการสารเร่งการเจริญเติบโต เช่น ไรโบฟลาวิน กรดโฟลิก แคลเซียมแพนโททิเนต ไนอะซิน แยกได้จากนม เนย ผลิตภัณฑ์นม มี 4 กลุ่มย่อย คือ

Lactobacillus casei subsp. *casei*

Lactobacillus casei subsp. *pseudoplantarum*

Lactobacillus casei subsp. *rhamnosus*

Lactobacillus casei subsp. *toleran*

Lactobacillus fermentum

เซลล์เป็นรูปท่อน ขนาด 0.5-0.9ไมโครเมตร มักอยู่เดี่ยวๆหรือเรียงตัวเป็นคู่ ต้องการ calciumpentotinate, niacin, thiamine ในการเจริญเติบโต แยกได้จากยีสต์ขนมปัง ผลิตภัณฑ์นม ผักกาดดอง น้ำทิ้ง ปาก และอุจจาระคน

Lactobacillus brevis

เซลล์เป็นรูปท่อน ขนาด 0.7-1.0 x 2-4 ไมโครเมตร มักอยู่เดี่ยวๆหรือเรียงตัวเป็นคู่ ต้องการ calciumpentotinate, niacin, thiamine และfolic acid ในการเจริญเติบโต แยกได้จากนม เนยแข็ง กะหล่ำปลีดอง ลำไส้ ปาก และอุจจาระคน

นอกจากนี้ Lactobacillus จัดจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม (Axelsson, 1993) ตามการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ คือ

1) Streptobacterium เชื้อกลุ่มนี้สามารถเติบโตได้ที่ 15°C อาจเติบโตได้ที่ 45 °C หรือไม่สามารถเติบโตได้ที่ 45 °C

2) Thermobacterium เชื้อกลุ่มนี้สามารถเติบโตได้ที่ 45°C แต่ไม่สามารถเติบโตได้ที่ 15°C และอาจจัดจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม (De vuyst and Vandamme, 1994) ตามลักษณะการใช้อาหาร และการสร้างสาร คือ

1) Facultative heterofermentative lactobacilli เชื้อกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาล hexose และน้ำตาล pentose ได้ ไม่เกิดก๊าซ
2) Obligately heterofermentative lactobacilli เชื้อกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาล hexose แต่ไม่หมักน้ำตาล pentose เกิดก๊าซ
3) Obligately homofermentative lactobacilli เชื้อกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาล hexose แต่ไม่หมักน้ำตาล pentose ไม่เกิดก๊าซ

เชื้อทั้ง 2 กลุ่ม ประกอบด้วยสปีชีส์ต่างๆ ดังแสดงใน (ตาราง 2)

ตาราง 2 สปีชีส์ของ Lactobacillus ในกลุ่มต่างๆ

แบ่งตามลักษณะการใช้น้ำตาล และการสร้างสารยับยั้ง	
homofermentative	heterofermentative
Obligately homofermentative lactobacilli - *Lactobacillus acidophilus, L. ruminis L. delbrueckii, L. helveticus, L. jensenii,* และ *L. amylovorus*	Facultatively heterofermentative lactobacillli - *L. plantarum, L. pentosus, L. casei, L. sake* และ *L.rhamnosus* Obligately heterofermentative lactobacilli - *L. brevis, L. buchneri, L. bifermentans, L. cinfusus* และ *L. hilgardii*
แบ่งตามการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ	
เติบโตที่ 15°C	ไม่เติบโตที่ 15°C
Streptobacterium - *L. casei* และ *L. plantarum*	Thermobacterium - *L. helveticus, L. bulgaricus, L. lactis, L. jugurti, L. acidophilus, L. leichmannii, L. delbrueckii* และ *L. salivarius*

ที่มา : ดัดแปลงจาก Axelsson (1993)

5. การผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติก (อรวินท์ เลาหรัชตนันท์, 2532)

แบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นที่ทำให้อาหารเน่าเสีย หรือจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร สารเหล่านี้ได้แก่

กรดแลกติก

แบคทีเรียแลกติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลในอาหารให้เป็นกรดแลกติก ทำให้ pHของอาหารลดลง มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ทำให้อาหารเน่าเสีย นอกจากนี้สามารถใช้ในทางเภสัชกรรม และอุตสาหกรรมเคมีอื่นๆอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Torriani *et al.*, (1997) ซึ่งมีการทดสอบกรดแลกติกที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในผักสลัด พบว่าถ้าเติมกรดแลกติกร้อยละ 1 ลงไปจะมีผลในการทำลายแบคทีเรียเกือบทุกกลุ่มที่ใช้ทดสอบ แต่ยับยั้งแบคทีเรียทั้งหมดและ faecal coliform ได้เพียงบางส่วน และเมื่อเติมกรดแลกติกร้อยละ 0.5 ลงไป จะไม่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในผัก

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นสารที่ได้จากกระบวนการแมทาบอลิซึม ในระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรียพวก Lactobacillus และจะสะสมเพิ่มขึ้นในอาหาร เนื่องจาก Lactobacillus ไม่มีเอนไซม์ catalase ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย H_2O_2 ในน้ำนมดิบ H_2O_2 สามารถทำปฏิกิริยากับไทโอไซยาเนตมี lactoperoxidase เป็นตัวเร่ง ได้ผลิตผลที่ยับยั้งจุลินทรีย์อื่น และยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร Gilland and Speck (1977) พบว่า H_2O_2 ที่สร้างจาก *L. acidophilus* สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้

ไดอะซิทิล (Diacetyl)

เป็นผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการแมทาบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดแลกติก diacetyl เป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก และมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วย ที่ความเข้มข้น 200 μg/ml ยับยั้งการเจริญของยีสต์และแบคทีเรีย ที่ความเข้มข้น 300 μg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก ส่วนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกจะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นสูงกว่า 350 μg/ml

แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

Bacteriocin คือ สารโปรตีน มีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียได้รวดเร็วผลิตจากแบคทีเรีย เช่น *Lactobacillus fermentum, L heveticus, L. acidophilus, L. plantarum, Pediococcus acidilactici* และ *P. pentosaceus*

bacteriocin จะมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ bacteriocin ที่ผลิตจาก Lactobacillus ที่เรียกว่า nisin มีการนำไปใช้ในการถนอมอาหารมากที่สุด จากการรายงานที่ผ่านมาเกี่ยวกับการสร้าง bacteriocin ได้แก่ *L. acidophilus* มีการสร้าง acidophilin และ lactocidin ซึ่งเป็น bacteriocin ยับยั้ง *S. aureus* แบคทีเรียแกรมบวก enteropathogen และแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ (Wood and Hodge, 1985) *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* T140 สร้าง bacteriocin คือ salivacin 140 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Stphylococcus aureus, Yersinia enterocolitica* และ *Listeria monocytogenes* (Arihara *et al.*, 1998) *Lactobacilllus salivarius* subsp. *salivarius* CRL 1328 สร้าง bacteriocin ซึ่งสามารถทนต่อความร้อน และสามารถฆ่าเชื้อก่อโรคในระบบสืบพันธุ์ เช่น *Neisseria gonorrhoeae* (Ocana, 1999)

รูทีรีน (Ruterin)

รูทีรีนเป็นสารที่ไม่ใช่โปรตีน แต่เป็น β-hydroxy propionaldehyde ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายได้ดีที่ pH ปานกลาง ได้จากแบคทีเรียพวก *Lactobacillus reuterin* รูทีรีนสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ยีสต์ รา โปรโตซัว และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น Salmonella, Staphylococcus, Listeria และ Clostridium

Central Library
Prince of Songkla University

6. การประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลกติก (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534)

จุลินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติก จะอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ Lactobacillus, Streptococcus, Pediococcus และ Bifidobacterium เป็นต้น ซึ่งมีสมบัติในการหมักให้สารยับยั้ง เช่น กรดแลกติก เป็นต้น ซึ่งจะนำมาใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน ดังนี้

ผลิตภัณฑ์อาหาร

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติก ซึ่งมีประวัติการใช้ในอุตสาหกรรมยา เคมี และอาหารมาช้านาน เริ่มแรกใช้เป็นตัวปรับความเป็นกรด และเป็นสารถนอมอาหาร เช่น การถนอมผลิตภัณฑ์พวกอาหารหมักดองทั้งประเภทพืชและสัตว์ เนยแข็ง และโยเกิร์ต เป็นต้น

การปรับปรุงไวน์

ในไวน์แดงและไวน์ขาวมักมีกรดมาลิกผสมอยู่ ซึ่งทำให้รสชาติของไวน์ไม่ดี ดังนั้นแบคทีเรียแลกติกสามารถกำจัดกรดมาลิกให้น้อยลงได้ และลดการใช้ปริมาณ sulphurous anhydride ได้ โดยเฉพาะในไวน์แดง

การผลิตหญ้าหมัก

การผลิตหญ้าหมัก (silage) ซึ่งเป็นอาหารของสัตว์โดยใช้แบคทีเรียแลกติกจะทำให้หญ้าหมักมี pH ต่ำ ซึ่งสามารถเก็บไว้ได้นาน แต่ปริมาณน้ำตาลที่แบคทีเรียแลกติกจะใช้ได้มีอยู่ต่ำมากในหญ้าที่นำมาหมัก ด้วยเหตุนี้จึงต้องมีการเติมยีสต์ เพื่อให้ผลิตน้ำตาลที่จะใช้เปลี่ยนเป็นกรดแลกติกได้อย่างเพียงพอ

การป้องกันโรคเรืองแสง

การใช้แบคทีเรียแลกติกเพื่อป้องกันโรคเรืองแสงที่ระบาดในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio harveyi*

7. ยาปฏิชีวนะ (antibiotic)

ยาปฏิชีวนะบางชนิด เช่น tetracycline และ chloramphenicol มีการผสมลงในอาหารสัตว์ จะทำให้สัตว์เติบโตได้เร็วกว่าปกติรวมทั้งเพิ่มปริมาณการผลิตน้ำนม ในระยะเวลาต่อมาจึงปรากฏว่ามีการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นอาหารเสริม เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์เลี้ยงอย่างกว้างขวาง ซึ่งบ่อยครั้งเกิดปัญหาขึ้น เนื่องจากการควบคุมที่ไม่ดีพอ การใช้ปริมาณมากเกินกว่าที่กำหนด การใช้นานเกินไปโดยไม่มีการหยุดใช้ยาก่อนฆ่า เป็นต้น ทำให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ และเชื้อดื้อยาที่ใช้ยาบางชนิดขึ้น โดยเชื้อบางชนิดอาจทำให้เกิดโรคในคน จึงทำให้เกิดปัญหาการรักษาในภายหลัง นอกจากนี้การที่สัตว์ได้รับยาปฏิชีวนะบ่อยเกินไปทำให้เสียสมดุลของเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ ความผิดปกติสามารถก่อผลร้ายต่อสัตว์ได้ ดังนั้นจึงต้องหาสิ่งมาทดแทนในลักษณะเดียวกัน คือ โปรไบโอติก ปรากฏว่าใช้เป็นสิ่งเสริมในอาหารสัตว์ที่ให้ประโยชน์ได้เช่นเดียวกับยาปฏิชีวนะ แต่ไม่ก่อให้เกิดการตกค้างและการดื้อยาตามมา (สุวณีย์ สุภเวชย์, 2536) ความแตกต่างของสารยับยั้งที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นกับยาปฏิชีวนะแสดงดัง (ตาราง 3)

จากการศึกษาของ Charteris *et al.*,(1998) เกี่ยวกับการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร และระบบสืบพันธุ์ของเพศหญิง พบว่า เชื้อก่อโรคมีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ดังนั้นจึงได้มีการนำ Lactobacillus มาใช้ในการรักษา โดยมีการทดลองใช้ยาปฏิชีวนะ 44 ชนิดกับ Lactobacillus 46 สายพันธุ์ พบว่าทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 14 ชนิด คือ cefoxitin, azotreonam, amikacin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, norfloxacin, nalidixic acid, sulphamethoxazole, trimethoprim, co-trimoxazole, metronidazole, polymyxin B และ colistin sulphate และทุกสายพันธุ์ไวต่อยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด คือ tetracycline, chloramphenicol และ rifampicin ดังนั้นจึงมีการพัฒนาคัดเลือก Lactobacilli มาใช้ในการรักษาโรคท้องร่วง โรคติดเชื้อที่ระบบสืบพันธุ์ของเพศหญิง และโรคเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ โดยใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ

ตาราง 3 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสารยับยั้ง (inhibitory substance) ที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกกับยาปฏิชีวนะ (antibiotic)

สมบัติ	สารยับยั้ง	ยาปฏิชีวนะ
การประยุกต์ใช้	อาหาร	การแพทย์
การสังเคราะห์	primary metabolite หรือ secondary metabolite	secondary metabolite
การดูดซึมในทางเดินอาหาร	ไม่มี	มี
การตกค้างในเนื้อเยื่อ	ไม่มี	มี
การกลายพันธุ์หรือดื้อยา	ไม่เกิด	เกิด
แหล่งที่สร้าง	จุลินทรีย์	จุลินทรีย์ หรือสังเคราะห์ทางเคมี
ประเภทของสาร	โปรตีนเช่น bacteriocin สารอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น reuterin	โปรตีน สารอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น tetracycline และ chloramphenicol เป็นต้น
กิจกรรม	ให้ฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อเฉพาะที่ของร่างกาย เช่น ระบบทางเดินอาหาร	ให้ฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อได้ทั่วร่างกาย และออกฤทธิ์ต่อเชื้อต่างๆได้มากชนิด
กลไกการทำงาน	เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้สูญเสียความสามารถในการนำสารผ่านเข้าออก	ขัดขวางการสังเคราะห์ผนังเซลล์ DNA RNA และโปรตีน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Cleveland *et al.*, (2001)

8. แบคทีเรียก่อโรคที่มีอาหารเป็นสื่อ

ร่างกายมีภูมิต้านทานที่มีประสิทธิภาพ แต่จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค (pathogen microorganisms) บางชนิดที่สร้างสารพิษ และบุกรุก (invasive) ก็สามารถทำให้เกิดโรคได้ โรคส่วนใหญ่มาจากการดื่มน้ำหรือกินอาหารที่ปนเปื้อน แบคทีเรียก่อโรคที่มีอาหารเป็นสื่อ ดังนี้

Bacillus cereus (พิไลพรรณ พงษ์พูล, 2531)

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

Bacillus เป็นแบคทีเรียใน family Bacillaceae เป็นรูปแท่ง ขนาด 1-1.2x3-10 ไมโครเมตร มักจะเรียงกันเป็นสายมีสปอร์เป็นรูปไข่อยู่ตรงกลาง สปอร์ไม่ใหญ่กว่าตัวเซลล์ ติดสีแกรมบวก ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ และไม่มีแคปซูล

การทำให้เกิดโรค

มีอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติ เช่น ในอากาศ น้ำ ดิน และพืชผักต่างๆ เจริญได้ในที่มีอากาศ และมีสปอร์ที่ทนต่อความร้อน ถ้าสปอร์อยู่ในอาหารที่ปรุงเรียบร้อยแล้ว และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30-50 °C สปอร์จะงอก เพิ่มจำนวนและสร้าง toxin เมื่อกินอาหารที่ปนเปื้อนเข้าไปทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งมีอาการ 2 แบบ คือ

1) ถ้าบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนด้วยสายพันธุ์ที่สร้างทอกซินที่ทำให้ท้องเสีย (diarrheal toxin) จะมีระยะฟักตัวนานประมาณ 8-17 ชม. จึงเกิดอาการปวดท้องท้องเสีย บางรายมีอาการอาเจียน โรคนี้เป็นนานเฉลี่ย 12-24 ชม. อาหารที่มักจะเป็นต้นเหตุ ได้แก่ อาหารพวกเนื้อ น้ำซุป น้ำซอส

2) ถ้าบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนด้วยสายพันธุ์ที่สร้างทอกซินที่ทำให้อาเจียน (vomiting หรือ emiting toxin) toxin นี้ทนต่อความร้อน จะทำให้เกิดอาการขึ้นหลังจากกิน 1-5 ชม. มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง 1 ใน 3 ของผู้ป่วยจะมีอาการท้องเสีย อาการจะเป็นนาน 6-24 ชม. อาหารที่เป็นสาเหตุ ได้แก่ ข้าวผัด

Staphylococcus aureus

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา (พิไลพรรณ พงษ์พูล, 2531)

Staphylococcus เป็นแบคทีเรียใน family Micrococcaceae มีรูปร่างกลม ไม่เคลื่อนที่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.0 μm ติดสีแกรมบวก เรียงตัวเป็นรูปคล้ายพวงองุ่น เมื่อนำมาจากหนองย้อมสีดู จะเห็นว่าอยู่เป็นเดี่ยวๆ เป็นคู่และอยู่กันเป็นกลุ่มต่อกันเป็นสายโซ่สั้นๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวจะเห็นเป็นสายโซ่สั้นๆ และอยู่เป็นคู่จำนวนมาก มีน้อยชนิดที่สร้างแคปซูลซึ่งไปเพิ่มความรุนแรงของการทำให้เกิดโรค

Staphylococcus เจริญได้ในที่ที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) แต่ส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีในที่มีอากาศบางสายพันธุ์ต้องใช้ CO_2 ในการเจริญด้วย จะเจริญได้ที่อุณหภูมิ 6.5-46 °C อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของ *S. aureus* คือ 30-37 °C pH ที่เหมาะสม คือ 7.0-7.5 แต่เจริญได้ดีที่ pH 4.2-9.3 ต้องการ growth factor 2 ชนิด คือ adenine และ thiamine แต่เมื่อเจริญอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่มีอากาศจะต้องการ uracil และ pyruvate เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เช่น nutrient agar

ใน agar plate โคโลนีของ Staphylococcus มีลักษณะกลมเรียบ นูนเล็กน้อย มีขนาดตั้งแต่ 1-4 มม. ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง โคโลนีจะขุ่นและทึบแสงมากกว่า Streptococcus และ Pneumococcus โคโลนีของสายพันธุ์ส่วนใหญ่ของ *S. aureus* จะมีสีเหลืองทอง สีเกิดขึ้นเนื่องจากรงควัตถุพวก carotenoid บางครั้งพบว่าโคโลนีมีสีตั้งแต่ส้มจัดจนถึงเหลืองอ่อน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพการเพาะเลี้ยง

<u>การทำให้เกิดโรค</u>

S. aureus มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในอาหารหลายชนิด โดยเชื้อปนเปื้อนอาหารเหล่านี้ทางแผล ฝี หนอง ที่ผิวหนังของผู้ปรุงอาหาร เช่น อาหาร พวก คัสตาร์ด สลัด อาหารพวกเนื้อและผลิตภัณฑ์นม (dairy product) อาหารที่ปนเปื้อน *S. aureus* จะมีกลิ่นรสปกติ

อาการจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) A, B, C1, C2, D และ E 1-6 ชม. ยิ่งบริโภค enterotoxin มาก อาการที่เกิดขึ้นรวดเร็วและรุนแรง enterotoxin ที่พบบ่อย คือ A และ D ทำให้เกิดอาการอักเสบของเซลล์บุทางเดินอาหาร และถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตแล้วกลับมาทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ โดยมีการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องร่วง แต่มักไม่มีไข้

และมักหายเองภายใน 8 ชม. แต่อาจเกิดอาการรุนแรงได้ในทารก คนชรา หรือผู้ที่มีร่างกายอ่อนแอ

Salmonella (พิไลพรรณ พงษ์พูล, 2531)

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

Salmonella มีลักษณะเป็นท่อนสั้นๆ เคลื่อนที่ได้รวดเร็ว ไม่สร้างสปอร์ ติดสีแกรมลบ เป็น aerobic gram negative rod ไม่สามารถ ferment lactose ก่อโรคในลำไส้สัตว์เลือดอุ่นได้หลายชนิดรวมทั้งมนุษย์ด้วย บางสายพันธุ์ที่แยกเชื้อได้ใหม่ๆจะมีแคปซูล ทำให้โคโลนีมีลักษณะเป็นมูก

Antigenic structure

Salmonella มี antigen อยู่ 3 ชนิด คือ

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

2) Flagella antigen (H) เป็นส่วนของ flagella เตรียมได้โดยเติมฟอร์มาลินลงในเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่เคลื่อนที่ ทำลาย H-antigen ได้โดยใช้ความร้อน อุณหภูมิที่สูงกว่า 60°C หรือโดยใช้แอลกอฮอล์หรือกรด

3) Capsular antigen (Vi) จะไปรบกวนปฏิกิริยาตกตะกอน O-antigen ของสายพันธุ์ที่แยกได้ ทำลายได้โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C นาน 1 ชม. หรือโดยการใช้กรดหรือฟีนอล

การทำให้เกิดโรค

เชื้อ Salmonella สร้างสารพิษชนิด endotoxin ซึ่งจะปล่อยสารพิษนี้ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือ host ได้ก็ต่อเมื่อเซลล์ตายหรือถูกทำลาย โดยปกติแล้วเชื้อจะเข้าสู่ร่างกาย host ได้ทางปากจากการกินอาหารหรือน้ำดื่ม

Salmonella มีทั้งหมดประมาณ 1930 serotype เป็นสาเหตุของโรค Salmonallosis มี 3 สปีชีส์ คือ *S. typhi, S.choleraesuis* และ *S. enteritidis* ซึ่งทำให้เกิดโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่1 ก่อให้เกิดโรคเฉพาะในคน คือ Salmonella ซึ่งตามธรรมชาติพบก่อให้

เกิดโรคเฉพาะในคน และคนเหล่านั้นที่เป็นพาหะของเชื้อนี้

- กลุ่มที่2 ก่อเกิดโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ ซึ่งพบเป็นส่วนใหญ่ของ *Salmonella* ทั้งหมด สัตว์ต่างๆที่เป็นโรค เช่น หมู หนู เป็ด ไก่ ฯลฯ หรือที่พบบ่อย คือ *S. typhimurium, S. anatum* ฯลฯ

การติดเชื้อ ส่วนใหญ่จะพบอาการใน 3 แบบนี้ผสมผสานกัน

1) Enteric fever หมายถึง ไข้ typhoid และ paratyphoid เชื้อจะเข้าสู่ร่างกายทางปาก โดยติดกับอาหารหรือน้ำดื่ม ผ่านกระเพาะอาหารเข้าไปถึงลำไส้เล็ก เข้าสู่ท่อน้ำเหลือง แล้วเข้าสู่กระแสเลือดไปสิ้นสุดที่อวัยวะต่างๆ รวมทั้งลำไส้ด้วย เชื้อจะแบ่งตัวในลำไส้ แล้วจะถูกขับออกไปทางอุจจาระ

2) Gastroenteritis หรือ Salmonella food poisoning หมายถึง อาหารเป็นพิษ (food poisoning) เกิดเนื่องจากเชื้อ *S. typhimurium, S. enteritidis* หรือ *S. derby* เชื้อจะมีระยะฟักตัว 1-3 วัน อาการจะบ่งชี้ว่ามีการรบกวนที่เยื่อเมือกในลำไส้ ทำให้กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ อย่างไรก็ตามการก่อโรคแบบนี้ เชื้อจะไม่เข้าสู่กระแสเลือด และไม่เกิดการติดเชื้อที่อวัยวะภายในหลังจากกินอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ เชื้อจะไปทำให้เกิดการอักเสบของลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ระยะฟักตัวอยู่ระหว่าง 8-48 ชม. ผู้ป่วยจะเกิดอาการไข้ หนาวสั่น คลื่นไส้ อุจจาระร่วง ในรายที่ไม่รุนแรงอาจหายได้เองภายใน 2-4 วัน

3) Septicemia การติดเชื้อ *S. choleraesuis* โดยที่เชื้อจะเข้าสู่ร่างกายทางปาก แต่จะไม่เกิดอาการทางลำไส้ เชื้อจะเข้าไปทางกระแสโลหิต ทำให้เกิดการอักเสบเป็นหนอง ฝี ตามอวัยวะภายใน เช่นทำให้เกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบ กระดูกพรุน อักเสบ ปอดบวม เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน host ที่มีสุขภาพไม่แข็งแรง ความต้านทานต่ำ

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 culturesได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin-methylene blue, MacConkey หรือ Deoxycholate อาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้จะแยกออกได้ว่า โคโลนีที่ขึ้นมานั้นเป็นชนิดย่อยสลายแลกโตส แบคทีเรียพวกแกรมบวกจะถูกยับยั้งการเจริญ Bismuth sulfite เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่งชี้ *S. typhi* ได้รวดเร็วมาก เพราะให้โคโลนีสีดำเนื่องจากเชื้อสร้างก๊าซ H_2S

4) Final identification นำโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ Salmonella ไปทดสอบทางชีวเคมี จากนั้นนำไปทดสอบทาง serology

Escherichia coli (พิไลพรรณ พงษ์พูล, 2531)

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

E.coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบต้องการออกซิเจนและไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (facultative anaerobe) ขึ้นได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey จะให้โคโลนีสีชมพูหรือแดง เนื่องจากการสลายแลกโตส บนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB (Eosin methylene blue) จะให้โคโลนีลักษณะสะท้อนแสงแววววาวที่เรียกว่า metallic sheen

การทำให้เกิดโรค

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

Enterotoxicgenic *E.coli* (ETEC)

ทำให้เกิดอาหารท้องร่วงอย่างอ่อน และรุนแรง ETEC สร้าง enterotoxin 2 ชนิด คือ

1) heat-labile toxin (LT) เป็น toxin ที่ถูกทำลายด้วยความร้อน ออกฤทธิ์เช่นเดียวกับ cholera toxin (CT) ซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ adenyl cyclase ในลำไส้เป็นผลให้เอนไซม์นี้มีปริมาณมากขึ้น ทำให้ adenosine triphosphate (ATP) เปลี่ยนเป็น cyclic adenosine monophosphate (C-AMP) และเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์โดยมีการขับน้ำ และเกลือแร่ต่างๆออกมาสู่ทางเดินอาหารเป็นจำนวนมากทำให้เกิดอาการท้องร่วงคล้ายอหิวาตกโรค

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

Enteroinvasive *E.coli* (EIEC)

เป็น *E.coli* ที่สามารถบุกรุกเซลล์เยื่อบุของลำไส้ใหญ่ ทำให้เกิดอาการคล้ายโรคบิด คือ มีไข้ เป็นตะคริว ท้องร่วง ถ่ายเป็นมูกเลือด

Enteropathogenic *E.coli* (EPEC)

เป็นสาเหตุของการเกิดโรคท้องร่วงเนื่องจากจะเข้าไปทำให้เกิดการติดเชื้อที่ epithelial cell ในชั้น mucosa ของลำไส้ เมื่อเข้าไปแล้วจะเพิ่มจำนวนอย่างมากมายและปล่อยสารพิษออกมาทำให้เกิดอาการท้องร่วงมักจะระบาดในทารกแรกคลอดในสถานรับเลี้ยงเด็ก

Enterohemorrhagic *E.coli* (EHEC)

ทำให้เกิด hemorrhagic colitis คือ ถ่ายเป็นเลือดอย่างมากแต่ไม่มีไข้

Enteroautoagglutinate *E.coli* (EAggEC)

ทำให้เกิดอาการท้องร่วงในเด็กที่อายุต่ำกว่า 6 เดือน

การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

สิ่งส่งตรวจเป็นอุจจาระหรืออาจเป็นปัสสาวะ ในกรณีที่เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ นำมาขีดบน blood agar และ MacConkey agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C 18-24 ชม. สายพันธุ์ที่ก่อโรคจะเจริญบน MacConkey agar โดยจะให้

สีชมพู ทำการทดสอบทางชีวเคมี ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคจะไม่เจริญบน MacConkey agar และ blood agar

โดยสรุปสิ่งส่งตรวจเป็นอุจจาระ ควรลงใน blood agar, MacConkey agar และ SS agar เพื่อป้องกันความผิดพลาด สำหรับ *E.coli* เมื่อโคโลนีขึ้นมาแล้ว ทดสอบ TSI agar ให้ผล acid slant acid butt และสร้างก๊าซ ไม่ให้ H_2S ทดสอบ IMViC test ให้ผล + + - - จะบอกได้ว่าเป็น *E.coli* แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็น pathogenic *E.coli* หรือไม่ ต้องคัดเลือกโคโลนีไปทำทาง serology

***Escherichia coli* O157:H7** (อรอนงค์ รัชตราเชนชัย, 2542)

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

E.coli เป็นแบคทีเรียใน family Enterobacteriaceae มีรูปร่างเป็นท่อนตรง ขนาด 1.1-1.5 x 2.0-6.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างเอนโดสปอร์ มีแคปซูลบางๆห่อหุ้ม สายพันธุ์ส่วนใหญ่เคลื่อนที่โดยใช้ flagella ทีมีอยู่รอบตัว เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C จัดเป็นพวก facultative anaerobe สลายน้ำตาลหลายชนิดได้โดยวิธี fermentation เกิดกรดและส่วนมากเกิดเป็นก๊าซ ไม่มีเอนไซม์ oxidase แต่มีเอนไซม์ catalase ผลการทดสอบ Voges-Proskauer ให้ผลลบ แต่ methyl red ให้ผลบวก ไม่ใช้ Simmon citrate เชื้อสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆได้ดี

การแพร่กระจายของเชื้อ

สัตว์กีบ เช่น วัว ควาย แพะ และแกะ เป็นแหล่งกักเก็บเชื้อตามธรรมชาติ นอกจากนี้ยังพบเชื้อในหมูและไก่งวง การติดต่อของเชื้อมาสู่คนโดยการรับประทานอาหารที่ประกอบจากเนื้อสัตว์ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ และปรุงสุกๆดิบๆ หรือรับประทานนมดิบหรือผลิตภัณฑ์นมที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ นอกจากนี้เชื้อยังสามารถแพร่กระจายจากผู้ป่วยไปยังบุคคลอื่นโดยตรง

อาหารที่เป็นแหล่งของเชื้อ

ในเนื้อสัตว์ต่างๆ เช่น เนื้อวัว เนื้อไก่ หรือเนื้อหมู เชื้อ *E.coli* O157 : H7 ไม่ทนทานต่อความร้อน แต่สามารถอยู่รอดได้ในอุณหภูมิแช่แข็ง เชื้อ *E.coli* O157:H7 สามารถเจริญได้ในลำไส้ของไก่ และพบได้ในอุจจาระของไก่หลังจากถ่ายมาแล้วหลายเดือน

แสดงให้เห็นว่าไก่เป็นแหล่งสำคัญของเชื้อ และการที่สามารถแยกเชื้อได้ทั้งในไก่งวง หมู และแกะ แสดงว่าเนื้อสัตว์เหล่านี้เป็นแหล่งของโรคเช่นเดียวกัน

การทำให้เกิดโรค

E.coli O157 : H7 ถูกค้นพบว่าเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารเมื่อปี 1982 นี้เอง เชื้อนี้จะไม่เหมือนกับ *E.coli* โดยทั่วไป เนื่องจากยากที่จะตรวจพบและความรุนแรงอาจถึงตายได้ *E. coli* เกือบกว่า 1,000 สายพันธุ์จะไม่มีอันตรายกับมนุษย์ แต่มีกลุ่มย่อยๆที่เรียกว่า enteropathogen *E. coli* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ *E.coli* O157 : H7 ก็จัดอยู่ในกลุ่มนี้

การเกิดโรคของเชื้อ *E.coli* O157 : H7 เกิดในทุกช่วงอายุ แต่ในเด็กเล็กและผู้สูงอายุมีความเสี่ยงก่อให้เกิดโรคและอาการรุนแรงมากกว่า เชื้อปริมาณน้อยกว่า 10 เซลล์สามารถทำให้เกิดโรคได้ ระยะฟักตัวของเชื้อ 3-9 วัน ผู้ที่ติดเชื้ออาจมีหรือไม่มีอาการ และอาการตั้งแต่น้อยไปจนถึงรุนแรงและทำให้เสียชีวิตได้ เชื้อนี้มีการระบาดในหลายประเทศในทวีปอเมริกาเหนือ ทวีปยุโรป และในประเทศญี่ปุ่น อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *E.coli* O157 : H7 มีดังนี้

1) hemorrhagic colitis ลักษณะอาการ คือ ปวดท้องอย่างรุนแรง ถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำในระยะแรก 2-3วัน ต่อมาถ่ายอุจจาระมีเลือดปนหรือถ่ายเป็นเลือดสด อาจมีอาการอาเจียน ไม่มีไข้หรือมีไข้เล็กน้อย

2) Hemolytic uremic syndrome (HUS) ผู้ป่วยจะมีอาการ 3 แบบ คือ microangiopathoc hemolytic anemia คือ มีการจับตัวของเม็ดเลือดแดง ทำให้ถูกทำลายได้ thrombocytomia คือ มีจำนวน platelet น้อย และ acute nephropathy คือ การทำงานของไตผิดปกติ การรักษาทำได้โดยการล้างไต และการถ่ายเลือด บางรายผู้ป่วยอาจมีอาการโคม่า และในที่สุดอาจเสียชีวิต

3) Thrombotic throbocytopenic purpura (TTP) ลักษณะอาการคล้าย HUS แต่ที่แตกต่างกันออกไป คือ จะมีอาการทางประสาทเข้ามาเกี่ยวข้องมากกว่า และมีไข้ ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมีเลือดคั่งในสมองและตายในที่สุด

Vibrio parahaemolyticus (อรษา สุดาเธียรกุล, 2541)

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่งขนาด 0.5-0.8X1.4-2.6 μm สามารถเจริญได้ในที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ไม่สร้างสปอร์ มีแคปซูล เคลื่อนที่ได้ และไม่หมักน้ำตาล sucrose ดังนั้นโคโลนี บน TCBS จะมีสีเขียวอมน้ำเงินขนาด 2-3 มม. *V. parahaemolyticus* จัดเป็นพวก mesophile คือ เจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 15-42 °C แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญเติบโต คือ 30-35 °C ช่วง pH ที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญเติบโต คือ 7.6-8.6 ต้องการ NaCl ในการเจริญ (halophile) โดยเจริญได้ใน NaCl ที่มีความเข้มข้นอยู่ระหว่างร้อยละ 0.5-8 แต่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด คือ ร้อยละ 2-3

แหล่งของโรค

V. parahaemolyticus พบได้ในน้ำทะเลทั่วโลก บริเวณชายฝั่งทะเล ตะกอนโคลน (sediment) อนุภาคแขวนลอย (suspened particles) แพลงค์ตอน ปลา ปู กุ้ง หอย การกระจายตัวของเชื้อในสิ่งแวดล้อมขึ้นอยู่กับความแตกต่างของฤดูกาล ในช่วงฤดูร้อนจะพบเชื้อมากกว่าฤดูหนาว จะพบเชื้อได้น้อยในน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 13-15 °C ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 °C เชื้อจะไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อได้ใน zooplankton และเพิ่มจำนวนมากขึ้นในน้ำทะเล สำหรับประเทศไทยอุณหภูมิตลอดทั้งปีไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นการระบาดของเชื้อจึงพบได้ทุกเดือนตลอดทั้งปี บริเวณอ่าวไทยตอนบนซึ่งมีประชากรอยู่หนาแน่นจะมีการปนเปื้อน และแพร่กระจายของเชื้อ *V. parahaemolyticus* มากกว่าบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน

การทำให้เกิดโรค

virulance factor ที่สำคัญแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

1) Thermostable direct hemolysin (tdh)

V. parahaemolyticus จะพบอยู่ทั่วไปในน้ำทะเล และปนเปื้อนในอาหารทะเลต่างๆ แต่ไม่ใช่ทุกสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิด gastroenteritis พบว่าสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคจะสามารถสร้าง hemolysin ซึ่งทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหรือสัตว์แตกแบบสมบรูณ์ (β-hemolysis) ดังนั้น hemolysin นี้จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้

เกิดโรค (virulance factor) ซึ่งต่อมาเรียกว่า thermostable direct hemolysin (tdh) เนื่องจากไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน 100°C นาน 10 นาที จากการศึกษาในเวลาต่อมา tdh เป็น spore-forming toxin คือ ออกฤทธิ์โดยตรงกับเม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดรูและเซลล์แตกในเวลาต่อมา

2) Thermostable direct hemolysin-related hemolysin (trh)

พบครั้งแรกใน พ.ศ. 2528 ที่เกาะ Maldives มีรายงานผู้ป่วยท้องร่วงจากการรับประทานอาหารทะเล 51 ราย พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* สามารถสร้าง hemolysin ชนิดใหม่ คือ trh ซึ่งเป็นโปรตีนประกอบด้วย กรดอะมิโน 189 ตัว มีฤทธิ์คล้ายคลึงกับ tdh คือ ทำให้เม็ดเลือดแดงของสัตว์บางชนิดแตกทำให้เกิดการสะสมน้ำในลำไส้ เพิ่มการซึมผ่านของเหลวออกจากหลอดเลือดที่ผิวหนัง และมีผลต่อกล้ามเนื้อหัวใจ

<u>การทำให้เกิดโรค</u>

V. parahaemolyticus ก่อให้เกิด gastroenteritis เมื่อผู้ป่วยรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าไปประมาณ 106-109 ตัว ระยะฟักตัวประมาณ 4-9 ชม. ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อ และภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย อาการที่แสดงออกที่สำคัญ คือ อุจจาระร่วง ปวดท้อง (abdominal cramps) คลื่นไส้ อาเจียน อาจมีไข้ ผู้ป่วยบางรายอุจจาระอาจมีมูกเลือดปน ระยะเวลาในการป่วยประมาณ 2-3 วัน ในรายที่รุนแรงอาจนานกว่า 1-2 อาทิตย์ โดยปกติมักหายเอง

Enterobacter (อภิญญา ผลิโกมล, 2532)

<u>ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา</u>

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง เคลื่อนที่ได้โดยใช้ flagella บางสายพันธุ์มีแคปซูล สามารถใช้ citrate และ acetate เป็นแหล่งคาร์บอน หมักน้ำตาลกลูโคสที่อุณหภูมิ 37 °C โดยให้ผลเป็นกรดกับก๊าซ ($CO_2 : H_2 = 2 : 1$) พบในอุจจาระของคนและสัตว์อื่นๆ ตลอดจนในน้ำโสโครก ดิน และแหล่งน้ำตามธรรมชาติ

<u>การทำให้เกิดโรค</u>

เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องร่วง เกิดโรคเช่นเดียวกับ *E. coli*

Shigella (อภิญญา ผลิโกมล, 2532)

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างแคปซูล เจริญได้ดีบน nutrient agar โดยไม่ต้องเติมสารอาหารพิเศษลงไป ไม่สามารถใช้ citrate หรือ malonate เป็นแหล่งคาร์บอน การเจริญจะถูกยับยั้งโดย KCN ไม่มีกาสร้างก๊าซ H_2S ผลลัพธ์จากการหมักน้ำตาลกลูโคส และคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ จะเกิดกรด แต่ไม่เกิดก๊าซ พบในลำไส้ของคนและสัตว์บางชนิด

การทำให้เกิดโรค

การติดต่อของ Shigella เกิดโดยการบุกรุกของเซลล์ผนังลำไส้ใหญ่ ทำให้เกิดการอักเสบอย่างรุนแรงและรอบๆ บริเวณที่แบคทีเรียแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจะเกิดฝี ทำให้เลือดออกและเป็นแผล นอกจากนี้สร้าง exotoxin ทำให้เกิดการถ่ายเหลว

อาการของโรคบิด ประกอบด้วย ปวดท้อง ปวดเบ่ง มีไข้ ท้องร่วง อุจจาระมีมูกเลือดปน ถ้าอาการรุนแรงมากๆ จะเสียน้ำและทำให้ช็อกตายได้ ในเด็กจำเป็นต้องให้ยาปฏิชีวนะ เช่น tetracycline และ ampicillin ยังไม่มีวัคซีนป้องกันโรคบิด

Proteus (ฑิฆัมพร กุยยานนท์ และคณะ, 2527)

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง เจริญที่ผิวหน้าอาหาร มีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วเป็นระยะ เคลื่อนที่จากจุดเพาะเลี้ยงออกไปทุกทิศทาง นอกจากนี้สามารถสลาย gelatin) และ urea ได้อย่างรวดเร็ว พบตามธรรมชาติในน้ำ บนดิน โดยเฉพาะสิ่งเน่าเปื่อย บางครั้งอาจพบในอุจจาระของคน

การทำให้เกิดโรค

ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารเช่นเดียวกับ *E. coli*

9. การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่มีอาหารเป็นสื่อโดยแบคทีเรียแลกติก

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการใช้แบคทีเรียแลกติกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารดังนี้ คือ การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักของไทย ซึ่ง

เมื่อเทียบเคียงชนิดพบว่าเป็น *Lactobacillus plantarum* 16 สายพันธุ์ *L. bavaricus* 3 สายพันธุ์ และ *L. brevis* 1 สายพันธุ์ นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งต่อแบคทีเรีย 5 ชนิด คือ *E. coli, V. parahaemolyticus, S. typhimirium, B. cereus* และ *S. aureus* โดยวิธี agar spot method ซึ่งให้ส่วนใสการยับยั้งมากกว่า 10 มม. ต่อแบคทีเรียทดสอบอย่างน้อย 3 ชนิด (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และอุบลวรรณ รอด-ประดิษฐ์, 2540) และจากการแยกแบคทีเรียแลกติกจากไส้กรอกเปรี้ยวนำมาทดสอบการยับยั้งโดยใช้ agar spot method พบว่ามี 81 สายพันธุ์ แสดงผลการยับยั้ง *S. typhimurium* 3292 และ *S. enteritidis* 3294 คัดเลือกแบคทีเรียแลกติก 24 สายพันธุ์ที่แสดงผลการยับยั้ง *S. typhimurium* ทั้ง 6 สายพันธุ์ (*S. anatum, S. enteritidis* 3289 และ 3299, *S. typhi* 3299, *S. typhimurium* 3292 และ 3230) ได้สูงไปทดสอบการยับยั้ง *S. typhimurium* โดยบ่มในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ในอาหาร MRSที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 0.2 พบว่ามีเพียง Lactobacillus 3 สายพันธุ์และ Pediococcus 1 สายพันธุ์ แสดงผลการยับยั้งเล็กน้อย นำ culture supernatant ของแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ปรับ pH ให้เป็นกลาง ใส่ catalase enzyme ทดสอบการยับยั้งโดยใช้ well diffusion assay พบว่าไม่มีสายพันธุ์ที่แสดงผลการยับยั้งต่อ *S. typhimurium* (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และอังคณา สุขบุญ, 2541) ส่วนการทดลองของ Voughan *et al.*, (1994) พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักจากพืชสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ส่วนแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักจากสัตว์สามารถยับยั้งเชื้อ *Listeria innocua, Pseudomonas frogi* และ *S. aureus* นอกจากนี้ยังมีการแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 43 สายพันธุ์จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์ 7 ชนิด ได้แก่ กุ้งส้ม จิ้งจัง ปลาแป้งแดง ปลาส้ม ไตปลา หนาง และ หอยดอง นำมาทดสอบการยับยั้ง *L. monocytogenes* และ *E. coli* O157 : H7 โดยวิธี agar spot method สายพันธุ์ที่ให้การยับยั้งสูงสุด คือ K14, L4 ส่วนการทดสอบการยับยั้ง *L. monocytogenes* และ *E. coli* O157 : H7 โดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน พบว่า K14 และ L4 สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* ได้ดีกว่า *E. coli* O157 : H7 (วลัยกาญจน์ ไกรวรรณ์, 2542) และการแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักพื้นบ้านได้ 212 isolates นำไปทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค คือ *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 และ *S. typhimurium* 3230 โดยวิธี agar spot พบว่ามี

แบคทีเรียแลกติก 10 isolates ที่แสดงผลการยับยั้งโดยการสร้างสารยับยั้งกรดอินทรีย์ H_2O_2 และ bacteriocin และมีแบคทีเรียแลกติกเพียง isolate เดียว คือ P5 แสดงผลการยับยั้งโดยวิธีวัดความขุ่น ส่วนการทดสอบโดย agar well diffusion พบว่าไม่มี isolates ใดที่แสดงผลการยับยั้ง จากการเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกทั้ง 10 isolates เป็น *Lactobacillus plantarum* 6 isolates *L. brevis* และ *L. fermentum* อย่างละ 2 isolates (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2543) จากการทดลองของวรรณศิลป์ โรจนวงศ์ชัย และศิริลักษณ์ พันโญศรัณยา (2542) โดยทำการแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักพื้นบ้าน 7 ชนิด คือ แหนม ไส้กรอกอีสาน ปลาร้า กุ้งส้ม ปลาแป้งแดง หน่อไม้ดอง และผักเสี้ยนดองได้ 91 isolates เมื่อทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก คือ ความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี สามารถทนได้ที่ระดับร้อยละ 0.05 และทนต่อ pH ต่ำที่ 1.5, 2 และ 3 มีความสามารถในการยับยั้ง *S. aureus* เทียบเคียงชนิดพบว่า 18 isolates คือ *Lactobacillus* sp. (homofermentative) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากนมและผลิตภัณฑ์นม จะเห็นได้จากการทดลองของมลิวรรณ ส่งเสริม (2542) ที่มีการนำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากนมและผลิตภัณฑ์นมมาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *E. coli* O157 : H7 และ *L. monocytogenes* โดย agar spot method พบว่าแบคทีเรียแลกติก L_{30} มีส่วนใสของการยับยั้งมากที่สุด และเมื่อทดสอบผลการยับยั้งของ L_{30} ต่อ *L. monocytogenes* และ *E. coli* O157 : H7 โดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกันที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 ชม. พบว่าแบคทีเรียแลกติก L_{30} สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* ได้ดีกว่า *E. coli* O157 : H7 คือ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งร้อยละ 54.2 ในขณะที่ *E. coli* O157 : H7 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งร้อยละ 41.1 และมีการแยก Lactobacillus จากนมเปรี้ยว 5 ยี่ห้อ ได้ 5 สายพันธุ์ คือ *L. casei* 2 สายพันธุ์, *L. acidophilus* 2 สายพันธุ์ *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 1 สายพันธุ์ นำมาทดสอบการยับยั้งพบว่า Lactobacillus ทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีกว่า *S. typhimurium* และ *E. coli* โดยมีร้อยละการยับยั้งระหว่าง40.5-62.1 และ 47.9-53.0 ตามลำดับ (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และคณะ, 2539) แบคทีเรียแลกติกนอกจากจะสามารถแยกได้จากอาหารหมักและนมแล้วยังสามารถแยกได้จากเครื่องในปลากะพงซึ่งพบแบคทีเรียแลกติก 87 isolates เมื่อทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก พบว่า

16 isolates สามารถทนเกลือน้ำที่ความเข้มข้น 500 ml/l 2 isolates สามารถทนต่อกรดที่ pH 1, 2, 3 ได้ตั้งแต่ 0.5-5 ชม. เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน แป้ง ไขมัน มี 60 isolates ที่สามารถย่อยโปรตีน แป้ง และไขมันได้ และแบคทีเรียแลก-ติก 28 isolates สามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Lactobacillus* sp. (homofermentative) 7 isolates, *Lactobacilllus* sp. (heterofermentative) 3 isolates และ *Streptococcus* sp. 18 isolates (กมลทิพย์ กาฬสมุทร และวัชรี ส้มแก้ว, 2542) นอกจากนี้มีการแยกแบคทีเรียแลกติก คือ *Lactobacillus gasseri* จากทางเดินอาหารของคน และมีสมบัติเป็นโปรไบโอติก จะช่วยลดการแพร่ของเชื้อ *S.aureus* เนื่องจากมีการสร้างสารยับยั้ง เช่น lactic acid, hydrogenperoxide และ bacteriocin (Arihara *et al.*, 1998)

10. อาหารหมัก (Fermented food)

กระบวนการหมักเป็นวิธีหนึ่งที่ยอมรับในการถนอมอาหาร เป็นกระบวนการที่ทำให้สารประกอบของอาหารเปลี่ยนแปลงไป คือ เปลี่ยนทั้งสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่ทำให้คุณค่าทางอาหารเสียไป ทั้งรสชาติและลักษณะผลิตภัณฑ์นั้นก็เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2524) โดยสารประกอบที่มีบทบาทสำคัญในการถนอมอาหาร คือ กรดแลกติก ปกติแบคทีเรียแลกติกพบได้ทั่วไปในผัก ผลไม้ หรือเนื้อสัตว์ แบคทีเรียแลกติกจะใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในผัก ผลไม้ หรือเนื้อสัตว์และเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกทำให้สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้

<u>อาหารหมักแบ่งตามวัตถุดิบที่ใช้</u> สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1) <u>อาหารหมักจากพืช</u> เช่น กะหล่ำปลีดอง แตงกวาดอง ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว และหอมดอง เป็นต้น

2) <u>อาหารหมักจากสัตว์</u> เช่น ไส้กรอก แหนม ปลาร้า ไตปลา น้ำปลา ปลาแป้งแดง กุ้งส้ม ปลาส้ม ปลาเจ่า และปลาส้มฟัก เป็นต้น ดังแสดงใน(ตาราง 4) ในอาหารหมักใส่เกลือ เครื่องเทศ น้ำตาล และ สารกันเสีย (chemical preservative) ซึ่งผลจากการถนอมอาหารของสารเหล่านี้จะร่วมกับกรดที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก ซึ่งทำให้อาหารหมักมีระยะเวลาการเก็บที่ยาวนานขึ้น (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2532)

ตาราง 4 อาหารหมักดองทั่วทุกภาคของประเทศไทยที่มีแบคทีเรียแลกติกเกี่ยวข้อง

ภาค	อาหารหมักดอง	
	พืช	สัตว์
ภาคเหนือ	ขนมจีน ใบเมี่ยง ผักดอง และผลไม้ดอง	แหนม ปลาร้า ปลาจ่อม ปลาส้ม ปลาเจ่า น้ำปลา
ภาคใต้	ขนมจีน ก๊งฉ่าย ซีเซ็กฉ่าย เกี๊ยมฉ่าย ตั้งฉ่าย ผักและผลไม้ดอง หัวไชโป้ ซีอิ๊ว และเต้าเจี้ยว	หมูอวน หอยดอง กุ้งจ่อม กุ้งส้ม น้ำบูดู น้ำเคย น้ำปลา ไตปลา ปลาหมัม แป้งข้าวหมาก ปลาจ่อม ปลาแป้งแดง ปลาส้ม
ภาคตะวันออก	ขนมจีน ก๊งฉ่าย ซีเซ็กฉ่าย เกี๊ยมฉ่าย ตั้งฉ่าย ผักและผลไม้	หอยดอง ปลาจ่อม ปลาส้ม น้ำปลา
ภาคอีสาน	ขนมจีน ผักและผลไม้ดอง	ส้มฟัก กุ้งจ่อม ปลาร้า แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ปลาเจ่า น้ำปลา
ภาคกลาง	ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว เกี๊ยมฉ่าย ขนมจีน ซีเซ็กฉ่าย ตั้งฉ่าย ก๊งฉ่าย	กุ้งเจ่า กุ้งจ่อม ปลาเจ่า ปลาจ่อม ปลาส้ม หอยดอง โยเกิร์ต น้ำปลา เนยแข็ง

ที่มา : วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534)

<u>ตัวอย่างอาหารหมัก</u>

1) อาหารหมักจากสัตว์

<u>แหนม</u> เป็นอาหารหมักพื้นเมืองประเภทเนื้อสัตว์ที่นิยมบริโภคกันทั่วประเทศ การหมักแหนมเกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียแลกติก โดยในระยะแรกของการหมัก Pediococcus จะเจริญอย่างรวดเร็วและสร้างกรดแลกติกขึ้น ส่วน Lactobacillus ในระยะแรกจะเจริญช้า หลังจากการหมัก 3 วัน Pediococcus ซึ่งทนกรดได้น้อย จะเจริญช้าลงและหยุดเจริญในที่สุด ในระยะนี้ Lactobacillus จะเจริญและสร้างกรดต่อไป (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

ปลาร้า เป็นอาหารพื้นเมืองที่นิยมรับประทานกันมากในภาคเหนือ อีสาน และภาคกลาง เป็นอาหารที่ได้จากการหมักปลา และมีลักษณะเป็นตัวปลาเป็นส่วนใหญ่ มีน้ำเล็กน้อยเนื้อปลามีลักษณะนิ่มยุ่ย มีสีเหลืองเข้มจนถึงสีน้ำตาลดำ (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536) แบคทีเรียที่พบในการหมักปลาร้า ได้แก่ *Pediococcus* sp. *P. halophilus* ซึ่งแบคทีเรียพวกนี้จะมีผลต่อกลิ่นรสของปลาร้า นอกจากนี้ยังพบ *Staphylococcus* sp. และ *S. epidermidis* ซึ่งจะมีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีน และมีผลต่อกลิ่นรสบ้างเล็กน้อย เช่นเดียวกับ *Micrococcus* sp. *Bacillus subtilis* และ *B. licheniformis* (ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2524)

บูดู เป็นอาหารที่นิยมรับประทานในทางภาคใต้ของประเทศไทย ในระยะแรกของการหมักบูดูมักพบแบคทีเรียพวก *Bacillus* sp. *Staphylococcus* sp. และ Coryneform bacteria ซึ่งเชื่อว่าแบคทีเรียเหล่านี้มักมีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อปลา ส่วนแบคทีเรีย *Pediococcus halophilus* จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาในการหมัก และเมื่อสิ้นสุดการหมักจะพบแบคทีเรียชนิดนี้ถึงร้อยละ 90 แบคทีเรียชนิดนี้มีความสำคัญในการสร้างกรด และกลิ่นในบูดู (วิลาวัณย์ เจริญจิระ-ตระกูล, 2536)

ปลาส้ม เป็นอาหารหมักพื้นเมืองประเภทปลาที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับปลาเจ่า แต่ในการทำใช้ข้าวสุกแทนข้าวหมาก บางครั้งจึงเรียก ปลาข้าวสุก หรือปลาจ่อม ในระยะแรกของการหมักมักพบแบคทีเรียพวก Staphylococcus, Micrococcus และ Bacillus ซึ่งเชื่อว่ามีความสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลา ส่วนแบคทีเรียที่พบในปริมาณมาก และพบตลอดระยะการหมัก คือ *Pediococcus cerevisiae* ที่พบในปริมาณรองลงมา คือ *Lactobacillus plamtarum* และ *L .brevis* ซึ่งเชื่อว่ามีบทบาทสำคัญในการสร้างกรดและกลิ่นในปลาส้ม (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

ปลาส้มฟัก เป็นอาหารหมักพื้นบ้านประเภทเนื้อปลานิยมทำกันในภาคกลาง โดยเฉพาะลพบุรีมีการทำกันเป็นจำนวนมาก ในระยะแรกของการหมักพบแบคทีเรีย Staphylococcus ซึ่งมีบทบาทในการสลายโปรตีนในเนื้อปลา ส่วนแบคทีเรียที่พบในปริมาณมากที่สุดคือ *Lactobacillus brevis* และที่พบรองลงมา คือ *Pediococcus*

cerevisiae เชื่อว่าแบคทีเรียแลกติกเหล่านี้มีบทบาทในการสร้างกรดแลกติก (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

ไส้กรอกเปรี้ยว เป็นอาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์มีต้นกำเนิดมาจากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ บางครั้งจึงเรียกไส้กรอกอีสาน จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมักไส้กรอกเปรี้ยว ได้แก่ แบคทีเรียแลกติก สำหรับชนิดที่พบมาก คือ *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus cerevisiae* นอกจากนี้พบ *L. brevis* และ *P. halophilus* แบคทีเรียเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการหมัก (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติก สำหรับใช้ในการผลิตไส้กรอกเปรี้ยว พบว่า ตัวอย่างไส้กรอกเปรี้ยวที่มีผู้ทดสอบชิม ชอบมากที่สุด คือ การใช้กล้าเชื้อ *L. plantarum* ร่วมกับ *P. acidilactici* (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534)

2) อาหารหมักจากพืช

ผักกาดดอง เป็นผักดองเปรี้ยวของไทยอย่างหนึ่ง พบว่า เมื่อเริ่มหมักแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นชนิด heterofermentative rod ได้แก่ *Lactobacillus* spp. และ *L. brevis* การหมักในระยะต่อมาแบคทีเรียพวก heterofermentative cocci จะเด่นขึ้นมา ได้แก่ *Pediococcus cerevisiae* ในช่วงหลังของการหมักจะพบพวก heterofermentative rod ได้แก่ *L. plantarum* (ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2524)

แตงกวาดอง จุลินทรีย์ที่พบในการหมักระยะแรก คือ *Lactobacillus moesenteriodes, Streptococcus faecalis* และ *Pediococcus cerevisiae* และระยะหลังเกิดจาก *Lactobacillus brevis* และ *Lactobacillus plantarum* (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2539)

กะหล่ำปลีดอง (sauerkraut) เป็นกะหล่ำปลีที่มีรสเปรี้ยวนิยมรับประทานกันมากในประเทศแถบยุโรป (ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2524) จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในระยะแรก คือ *Enterobacter coacae* และ *Erwinia herbicola* การหมักในระยะกลางอาศัยจุลินทรีย์ *Leuconostoc mesenteriodes* และระยะสุดท้ายอาศัย *L. pl antarum* (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ,2539) นอกจากนี้ยังพบว่า สภาวะที่เหมาะสมกับการหมักกะหล่ำปลีดอง นั่นคือ เกลือร้อยละ 2.25 อุณหภูมิ 18 °C หรือต่ำกว่า ทั้งนี้

เพราะจะทำให้แบคทีเรียพวก heterofermentative ทำงานได้ดี (ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2524)

<u>หน่อไม้ดอง</u> มีหลักการเดียวกับการทำกะหล่ำปลีดองของประเทศตะวันตก โดย *Pediococcus cerevisiae* และ *Lactobacillus plantarum* จะผลิตกรดแลกติกในระยะเริ่มแรกของกระบวนการหมัก ส่วนในระยะสุดท้ายของกระบวนการหมักจะพบ *L .buchneri, L. fermenti* และ *L .mesenteriodes* ส่วนแบคทีเรียแลกติกที่พบในผักเสี้ยนดองมีทั้ง heterofermentative และ homofermentative และส่วนใหญ่ก็เป็นแบคทีเรียที่พบในการดองหน่อไม้ (ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2524)

วัตถุประสงค์

1. แยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักประเภทต่างๆ ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์
2. คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติซึ่งทดสอบได้ในห้องปฏิบัติการว่าเหมาะสมสำหรับใช้เป็นโปรไบโอติก
3. เทียบเคียงชนิดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักของไทยประเภทต่างๆให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ และทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียแลกติกในห้องปฏิบัติการ เช่น ความสามารถในการทนต่อกรด การทนต่อเกลือน้ำดี ความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน แป้ง ความสามารถในการเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามินบี 12 ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน และความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคต่างๆ เป็นต้น การเจริญในอาหารที่ปราศจากเนื้อสัตว์ รวมถึงการเจริญของแบคทีเรียแลกติกใน MRS broth และการเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากอาหารหมักซึ่งอาศัยการหมักจากเชื้อในธรรมชาติ
2. เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักเพื่อเพิ่มสุขภาพที่ดีแก่ผู้บริโภค