# บทที่ 2
# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 อาหารหมักดอง

อาหารหมักดองเป็นภูมิปัญญาการถนอมอาหารของไทย ซึ่งสามารถเก็บรักษาอาหารให้สามารถนำกลับมารับประทานได้นานกว่าปกติธรรมดา โดยอาหารเหล่านี้จะไม่เกิดการเน่าเสีย อาหารหมักดองจะมีการเปลี่ยนแปลงสภาพของรสชาติ สี และกลิ่น เป็นต้น ซึ่งในบางกรณีเมื่อใช้เทคนิคการหมักดองอาหารเหล่านี้อาจจะมีรสชาติที่ดีกว่าเดิมก่อนที่จะนำมาหมักดองด้วยซ้ำ คนไทยมีการสืบสานและถ่ายทอดเทคนิคการทำอาหารหมักดองมาช้านาน ซึ่งยังไม่มีการศึกษาอย่างชัดเจนว่าลักษณะการถนอมอาหารดังกล่าวนี้มีการคิดค้นและเริ่มต้นทำอาหารหมักดองมาตั้งแต่เมื่อไหร่ แต่อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มคนไทยในท้องถิ่นต่างๆ พบว่ากลุ่มคนไทยมีการทำอาหารประเภทหมักดองด้วยกันทั้งสิ้น คนไทยคิดขบวนการทำอาหารหมักดองก็เพื่อประโยชน์ในการเก็บรักษาอาหารหรือถนอมอาหารให้สามารถเก็บไว้รับประทานได้นานๆ หรือในยามที่เกิดการขาดแคลนในช่วงที่ไม่ใช่ฤดูกาลของอาหารชนิดนั้น ๆ

การหมักผักหรือการดองผักเป็นวิธีการถนอมอาหารวิธีหนึ่ง โดยการดองผักเป็นการนำผักมาหมักในน้ำเกลือ การผลิตในระยะแรก ๆ เป็นการผลิตสำหรับการรับประทานในครัวเรือนเท่านั้น ซึ่งจุลินทรีย์ที่พบในผักดองมีทั้งยีสต์และแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่มีบทบาททำให้ผักดองเปรี้ยวคือแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้ ปัจจุบันมีการผลิตผักดองในหลายประเทศ เช่น ไทย จีน ฟิลิปปินส์ และญี่ปุ่น เป็นต้น ชนิดผักที่นิยมดอง เช่น กะหล่ำปลี แตงกวา ผักกาด หน่อไม้ และผักเสี้ยน เป็นต้น

### 2.1.1 ชนิดของผักดอง

1. ผักที่ผ่านการดองเกลือที่มีความเข้มข้นต่ำ (processed pickles) เป็นการดองที่ต้องใช้ระยะเวลาในการดองหลายสัปดาห์ โดยที่ผักที่ดองได้ยังคงมีความกรอบและมีกลิ่นรสเฉพาะตัว ความเข้มข้นของน้ำเกลือที่ใช้จะน้อยกว่าร้อยละ 12 ส่วนมากจะใช้ที่ระดับประมาณร้อยละ 4-8 หรือความเข้มข้นในระดับที่สูงพอที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น และเป็นระดับที่พอเหมาะให้จุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตกรดแลคติกเจริญได้ดี แต่ระดับความเข้มข้นของน้ำเกลือที่เหมาะสมที่สุดในการดองจะขึ้นอยู่กับชนิดของผักและผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเป็นหลัก การดองด้วยวิธีนี้จะมีจุลินทรีย์พวกที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลที่อยู่ในผักหรือเติมลงไป

ให้เป็นกรดแลคติก วิธีการดองแบบนี้จะใช้ได้กับผักหลายชนิด เช่น แตงกวา (pickles หรือ saltstock) กะหล่ำปลี (sauerkraut) ผักกาดดอง และกิมจิ เป็นต้น อาหารพวกนี้จะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงด้วยจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เพียงอย่างเดียวหรือเปลี่ยนแปลงด้วยจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกและเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ในการดองด้วยวิธีนี้ควรรักษาอุณหภูมิของน้ำเกลือให้อยู่ที่ 21 องศาเซลเซียส และให้ผักจมอยู่ในน้ำเกลือตลอดระยะเวลาที่ดอง หากมีเชื้อราที่ผิวหน้าของน้ำดองควรกำจัดออกทันทีเนื่องจากเชื้อราจะย่อยสลายกรดและสร้างสภาวะที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียเจริญต่อไปได้

2. การหมักดองโดยไม่มีเชื้อจุลินทรีย์เข้ามาเกี่ยวข้อง (unfermented pickle) ใช้กับการหมักผักที่มีความเป็นกรดสูง เช่น แตงกวา ดอกกะหล่ำ หัวหอม แครอท หรือพริกโดยจะใช้เกลือที่มีความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 20-25 การหมักด้วยวิธีนี้มีจุดประสงค์เพื่อเก็บรักษาผักและผลไม้ในน้ำเกลือมากกว่าหรือเป็นขั้นตอนหนึ่งในการขจัดรสขมและฝาดในการทำผลิตภัณฑ์ผักอบแห้ง

3. การดองในน้ำส้มสายชู วิธีการดองแบบนี้อาจใช้ร่วมกับการดองด้วยเกลือทั้งที่ใช้และไม่ใช้จุลินทรีย์และอาจไม่ผ่านกระบวนการหมักเลยก็ได้แต่เป็นการแช่ผักในน้ำส้มสายชูที่ปรุงแต่งรสชาติแล้วด้วยเครื่องเทศ น้ำตาลและเกลือ นับเป็นการดองที่ทำได้ง่ายที่สุดสามารถทำให้เสร็จได้ภายใน 1-2 วัน สิ่งที่สำคัญของการดองด้วยวิธีนี้คือ การเลือกใช้น้ำส้มสายชูที่มีคุณภาพดี ใส ไม่มีตะกอนและมีความเข้มข้นของกรดอะซิติกร้อยละ 5 ไม่ควรใช้น้ำส้มสายชูที่ผลิตเองในครัวเรือนเนื่องจากมักทำให้สีของผลิตภัณฑ์ที่ดองเสร็จแล้วคล้ำลง

4. การดองในน้ำมัน ประเทศที่นิยมการดองในน้ำมัน เช่น อินเดีย อังกฤษ การดองในน้ำมันจะใช้หัวผักกาด กะหล่ำปลีดอกหรือพืชอื่นๆ โดยการคลุกกับเกลือและเครื่องเทศบรรจุขวดแล้วตากแดดไว้ประมาณ 4-8 วัน จากนั้นจึงเติมน้ำมันลงไป จนกระทั่งผสมกันดี (ธีรพร, 2546)

**2.1.2 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการดอง**

ในกระบวนการดองที่ต้องมีการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลในผักผลไม้ให้เป็นกรดแลคติกจะเป็นแบคทีเรียที่อยู่ใน family Lactobacteriaceae ซึ่งใน family นี้จะมีอยู่ 5 genus ได้แก่ *Streptococcus, Pediococcus, Diplococcus, Leuconostoc* และ *Lactobacillus* แบคทีเรียเหล่านี้เป็นแกรมบวกสร้างสปอร์ไม่ได้ต้องการวิตามินบีรวมและกรดอะมิโนในการเจริญ ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีปริมาณกรดอะซิติกเข้มข้นเกินกว่าร้อยละ 3-6 และหากต้องการให้แบคทีเรียในกลุ่มนี้ทำให้กระบวนการหมักเกิดได้เร็วขึ้น สามารถทำได้โดยการเพิ่มปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระบบ สามารถแบ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ (ธีรพร, 2546)

Prince of Songkla University Pattani Campus

1. Homofermentative เป็นกลุ่มที่ใช้น้ำตาลร้อยละ 85-95 ในการผลิตกรดแลคติกเพียงอย่างเดียวส่วนที่เหลือจะนำไปสร้างพลังงานและสารประกอบที่ระเหยได้ (volatile compound) ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Streptococcus faecalis* และ *Pediococcus cerevisiae*

2. Heterofermentative เป็นกลุ่มที่ใช้น้ำตาลประมาณร้อยละ 50 ในการผลิตกรดแลคติก อีกร้อยละ 25 ใช้ในการผลิตกรดอะซิติกและเอทานอล ส่วนที่เหลือจะใช้ผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides* และ *Leuconostoc fermenti*

อาหารหมักดองจะมีกรดเป็นตัวควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการปริมาณกรดในการเจริญที่แตกต่างกัน สุดท้ายผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองที่ได้จะมีเฉพาะแบคทีเรียชนิดที่ทนกรดสูงเท่านั้น จากนั้นสภาวะที่เป็นกรดที่สูงมากขึ้นจะเป็นตัวทำลายตัวเองในภายหลังจึงมียีสต์และราที่ทนกรดเจริญต่อไป โดยราจะสามารถใช้กรดได้ ส่วนยีสต์จะผลิตสารที่เป็นด่างทำให้สภาวะความเป็นกรดลดลงจนถึงระดับที่แบคทีเรียทำงานต่อไปได้

**2.2 ยีสต์ (Yeast)**

ยีสต์มีความสำคัญด้านอาหารทั้งในแง่ของประโยชน์และโทษ โดยยีสต์มีบทบาทสำคัญในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหลายประเภท เช่นขนมปัง ไวน์ เบียร์ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ น้ำส้มสายชู หมัก และอาหารหมักพื้นบ้าน และในปัจจุบันพบว่า ยีสต์มีส่วนสำคัญต่อการพัฒนาอาหารหมักพื้นเมืองรวมทั้งผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ ทำให้การศึกษามีความก้าวหน้ามากยิ่งขึ้น

**2.2.1 ลักษณะทั่วไปของยีสต์**

ยีสต์ คือ ฟังไจ (fungi) ชนิดหนึ่งเช่นเดียวกับรา แต่ยีสต์มีชีวิตอยู่ได้อย่างอิสระ ไม่เป็นเส้นใยแต่เป็นเซลล์เดี่ยวรูปร่างกลม (round, spheroidal, spherical) เช่น *Citeromyces* sp. หรือรี (ellipsoidal) หรือ รูปไข่ (oval, ovoidal) เช่น *Saccharomyces* spp. มีการสืบพันธุ์แบบแตกหน่อ (budding) หรือแบ่งตัว (fission) ดังรูปที่ 1 บางสายพันธุ์สามารถสร้างเส้นใยแท้ (true mycelium) บางสายพันธุ์สามารถสร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) ยีสต์มีทั้งประโยชน์และโทษต่ออาหาร ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการหมักที่ใช้ยีสต์ในการผลิตมีดังนี้ (สาวิตรี, 2549)

ก. เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ (alcoholic beverage) ได้แก่ เบียร์และเหล้าชนิดต่าง ๆ

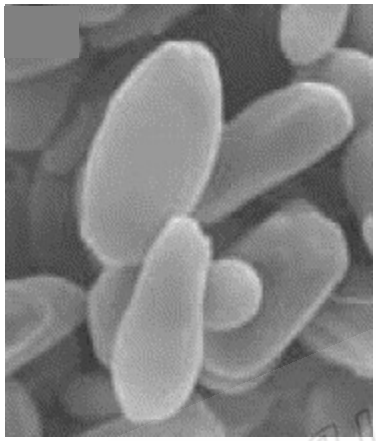
ข. ยีสต์ที่ใช้ทำขนมปัง (baker's yeasts)

ค. ยีสต์อาหารคนและอาหารสัตว์ (food and fodder yeasts)

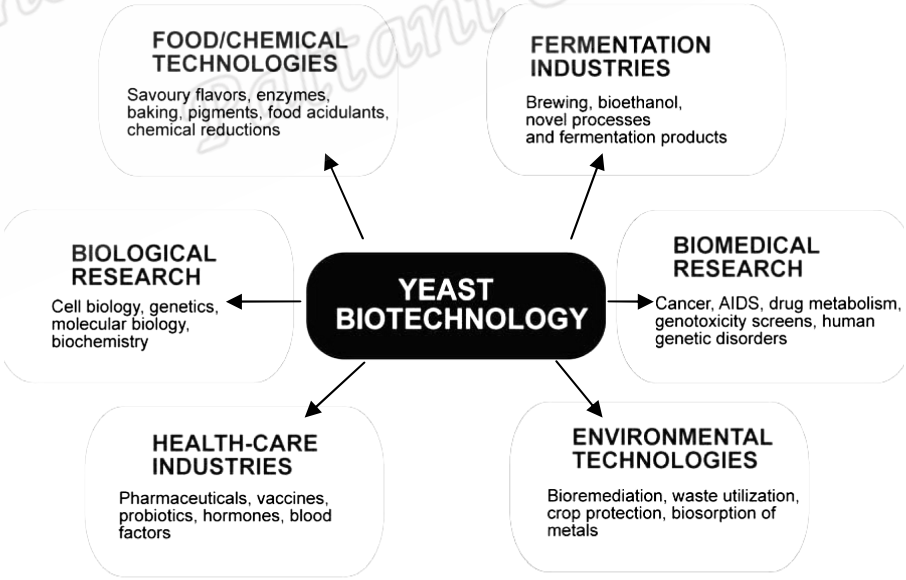
ง. แอลกอฮอล์เชื้อเพลิง (fuel alcohol)

Prince of Songkla University Pattani Campus

ยีสต์สามารถนำมาผลิตทางอุตสาหกรรมต่างๆ แล้วยังสามารถนำมาศึกษาทางด้านชีววิทยา การแพทย์ เทคโนโลยีอาหารและเคมี เทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม และทางด้านเภสัชกรรม ดังรูปที่ 2



**รูปที่ 1** ลักษณะรูปร่างของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*
ที่มา **:** Liu *et al.* (2008)




**รูปที่ 2** การนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ
ที่มา : Feldmann (2005)

Prince of Songkla University Pattani Campus

**2.2.2 โครงสร้างภายในของยีสต์**

ภายในเซลล์ของยีสต์ประกอบด้วยโครงสร้างต่าง ๆ ดังนี้ คือ ผนังเซลล์ (cell wall) เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane หรือ plasma membrane) เพอริพลาสซึม (periplasm) ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) นิวเคลียส (nucleus) ไมโตคอนเดรีย (mitocondria) แวคิวโอล (vacuole) และเอนโด-พลาสมิคเรติคิวลัม (endoplasmic reticulum) (อักษร และคณะ, 2547)

**2.2.2.1 ผนังเซลล์**

ผนังเซลล์ของยีสต์เป็นโครงสร้างที่สร้างความแข็งแรงกับเซลล์เช่นเดียวกับผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นค่อนข้างหนาโดยมีความหนาประมาณ 100-200 นาโนเมตร และมีน้ำหนักร้อยละ 10-15 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ประกอบด้วยพอลิแซกคาไรด์ประมาณร้อยละ 80-90 ของผนังเซลล์ โดยส่วนใหญ่เป็นกลูแคน (glucan) และแมนแนน (mannan) ส่วนน้อยเป็นไคติน (chitin)

กลูแคนเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสซึ่งอยู่ที่ด้านในของผนังเซลล์ เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่เกี่ยวกับการกำหนดรูปร่างและทำให้เซลล์มีความมั่นคง กลูแคนที่พบในผนังเซลล์ของยีสต์มี 2 ชนิด คือ ß-1,3 -glucan และ ß-1,6- glucan

แมนแนนเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่มีแมนโนสเป็นองค์ประกอบอยู่เป็นส่วนใหญ่และอยู่ที่ด้านนอกของผนังเซลล์ แมนแนนไม่ได้ช่วยทำให้เซลล์คงรูปร่าง แต่ทำหน้าที่ยึดเกาะส่วนประกอบต่าง ๆ ของผนังเซลล์ให้คงอยู่ด้วยกัน ปกติจะเกาะอยู่กับโปรตีนโดยพันธะโควาเลนต์เรียกว่า แมนโนโปรตีน (mannoprotein)

ไคตินพบมากที่ที่ผนังกั้นแยกหน่อออกจากเซลล์แม่และที่บริเวณรอยแผลที่มีการแตกหน่อ (bud scar) มีบ้างที่กระจายในผนังเซลล์ส่วนอื่น ยีสต์ที่สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยสร้างแอสโคสปอร์มีไคตินประมาณร้อยละ 1-3 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ส่วนชนิดที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแบสิดิโอสปอร์มีไคตินประมาณร้อยละ 5-8 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

นอกจากพอลิแซคคาไรด์แล้วองค์ประกอบส่วนน้อยที่พบในผนังเซลล์ยีสต์ คือ โปรตีน ไขมัน และสารอนินทรีย์ฟอสเฟต

หน้าที่ของผนังเซลล์ยีสต์ที่สำคัญ คือ ป้องกันโปรโตพลาสต์ (protoplast) และทำให้เซลล์คงรูปร่าง นอกจากนั้นยังมีหน้าที่อีกหลายอย่าง เช่น เป็นเครื่องกีดขวางสภาพให้ซึมได้ (permeability barrier) และควบคุมการผ่านของน้ำเข้าสู่เซลล์ แยกอิออนที่มีประจุบวกรวมทั้งโลหะหนักอย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้เซลล์รู้จำเซลล์อื่นได้ (cell-cell recognition) รวมทั้งเป็นที่อยู่ของเอ็นไซม์ที่ทำลายผนังเซลล์ เช่น กลูคาเนส (glucanase) และเอ็นไซม์ไฮโดรเลส เช่น อินเวอร์เทส (invertase)

Prince of Songkla University Pattani Campus

**2.2.2.2 เยื่อหุ้มเซลล์**

เยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์มีความหนาประมาณ 7.5 นาโนเมตร มีลักษณะเป็น uni-membrane มีบางส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ยื่นลึกเข้าไปในไซโตพลาสซึม ซึ่งทำให้ต่างจากเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ส่วนที่ยื่นเข้าไปนี้มีความยาวแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด อายุ และระยะการเจริญของเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์ประกอบด้วย ไขมัน โปรตีน และพอลิแซคคาไรด์ ทำหน้าที่เป็นเครื่องกีดขวางสภาพให้ซึมได้รอบ ๆ ส่วนประกอบทั้งหมดของเซลล์ยกเว้นผนังเซลล์ และควบคุมการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลาย (solute) เข้าออกจากเซลล์โดยการเลือกนำธาตุอาหารบางชนิดเข้าสู่เซลล์

**2.2.2.3 นิวเคลียส**

นิวเคลียสมีรูปร่างกลมรี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 ไมโครเมตร (สาวิตรี, 2549) เป็นโครงสร้างของยีสต์ที่เห็นได้ชัดด้วยกล้องจุลทรรศน์ ขนาดของโครโมโซมของยีสต์พบว่ามีขนาดตั้งแต่ 0.2-16 เมกะเบส

**2.2.2.4 ไมโตคอนเดรีย**

ไมโตคอนเดรียของยีสต์เป็นโครงสร้างที่ล้อมรอบด้วยเยื่อเมมแบรน 2 ชั้น เยื่อชั้นนอกประกอบด้วยเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเมตาบอลิซึมกรดไขมัน และเยื่อชั้นในประกอบด้วยไซโตโครม (cytochrome) ของลูกโซ่หายใจ องค์ประกอบทางเคมีของไมโตคอนเดรีย คือ ไขมันและฟอสโฟลิปิดซึ่งพบเป็นเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรีย โดยเยื่อหุ้มด้านนอกประกอบด้วยฟอสโฟลิปิดปริมาณมากและโปรตีนปริมาณน้อยเช่นเดียวกับเยื่อหุ้มโครงสร้างชนิดอื่นในเซลล์ยีสต์ หน้าที่ของไมโตคอนเดรียที่สำคัญ คือ การสร้างพลังงานในรูป ATP จากการหายใจในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน นอกจากนั้นสามารถสังเคราะห์อาร์เอ็นเอและโปรตีนเนื่องจากดีเอ็นเออยู่ภายใน

**2.2.2.5 เอ็นโดพลาสมิค เรติคิวลัม และโครงสร้างที่เกี่ยวข้อง**

เอ็นโดพลาสมิค เรติคิวลัม เป็นโครงสร้างภายในไซโตพลาซึมที่ล้อมรอบด้วยเยื่อสองชั้น ช่องว่างระหว่างเยื่อทั้งสองเรียกว่า ลูเมน (lumen) หน้าที่ของเอ็นโดพลาสมิกเรติคิวลัม คือ ช่วยในช่วงเริ่มต้นของการแตกหน่อโดยการสร้างถุงที่บรรจุเอ็นไซม์ชนิดต่างๆ และองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ ถุงนี้จะไปหลอมรวมกับเยื่อหุ้มเซลล์ที่บริเวณที่หน่อเริ่มโผล่ออกมาให้เห็น และเมื่อผนังเซลล์สร้างสมบูรณ์แล้วถุงก็จะหายไป

Prince of Songkla University Pattani Campus

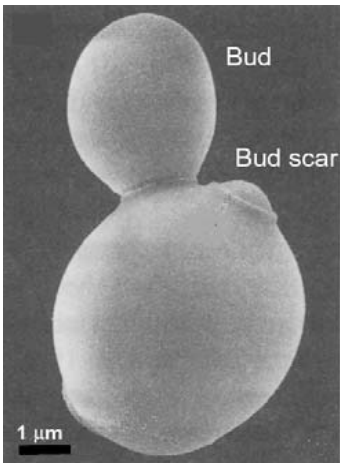
**2.2.2.6 แวคิวโอล**

แวคิวโอลไม่ใช่โครงสร้างอิสระแต่เป็นส่วนประกอบที่เกิดจากการรวมกันของโครงสร้างที่ล้อมรอบด้วยเยื่อซึ่งอยู่ภายในเซลล์ คือ เอ็นโดพลาสมิค เรติคิวลัม กอลจิบอดี้ (golgibody) และถุงเวซิเคิล แวคิวโอลเป็นโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงได้โดยอาจอยู่เป็นแวคิวโอลขนาดใหญ่เพียง 1 แวคิวโอล แวคิวโอลเป็นโครงสร้างหลักในการขนส่งโปรตีนในเซลล์ยีสต์ นอกจากนั้นยังทำหน้าที่คล้ายไลโซโซม (lysosome) ในการย่อยโปรตีนทั่วๆ ไปในเซลล์ รวมทั้งสามารถทำลายโครงสร้างบางอย่าง นอกจากนั้นแวคิวโอลยังทำหน้าที่ทางสรีรวิทยาหลายอย่าง เช่น ทำหน้าที่เป็นที่เก็บกรดอะมิโนที่เป็นด่าง พอลิฟอสเฟต และอิออนบางชนิดรวมทั้งมีบทบาทในการควบคุมแรงดันออสโมซีส (osmoregulation) และมีบทบาทสำคัญใน pH- homeostasis และ ion-homeostasis

**2.2.3 การสืบพันธุ์ (Reproduction)**

**2.2.3.1 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ยีสต์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดย**

ก. การแตกหน่อ (budding) โดยเกิดปุ่มเล็กๆ ที่ผิวนอกของเซลล์ ต่อมาปุ่มนี้จะขยายใหญ่ขึ้น และจะไม่มีนิวเคลียส และไซโตพลาสจากเซลล์แม่เข้าไปในปุ่ม ปุ่มนี้จะเปลี่ยนเป็นหน่อที่มีขนาดใหญ่เกือบเท่าเซลล์แม่ ดังรูปที่ 3 ต่อไปก็จะแยกออกจากเซลล์แม่ พวกที่สืบพันธุ์โดยการแตกหน่ออย่างแท้จริงเซลล์จะคอดเข้าแล้วหน่อจะหลุดออก ไม่มีการสร้างผนังคั่นระหว่างหน่อกับเซลล์แม่เสียก่อน ถ้าเกิดการแตกหน่อแล้วหน่อไม่หลุดออกจากเซลล์แม่ และยังสามารถให้หน่อใหม่ต่อๆ ไปได้อีก จะเกิดเป็นเส้นใยเทียม




**รูปที่ 3** ลักษณะการแตกหน่อของเซลล์ยีสต์
ที่มา : Feldmann (2005)

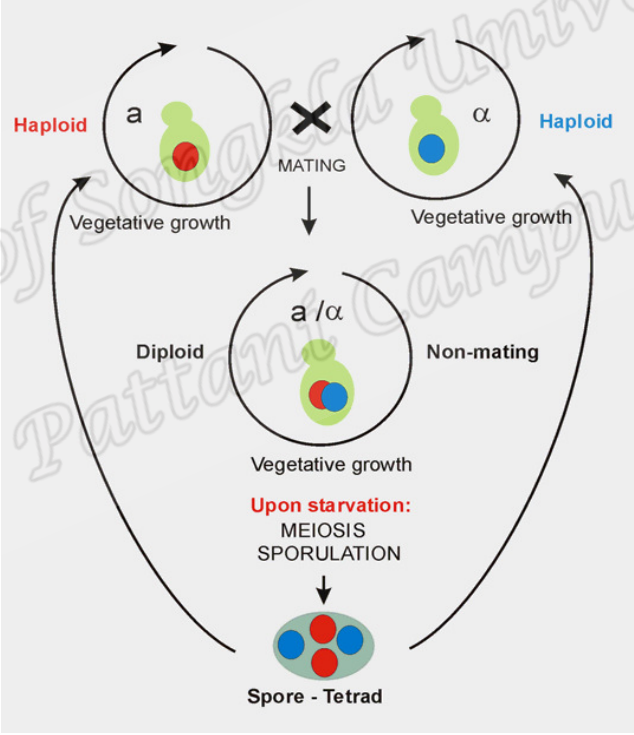
Prince of Songkla University Pattani Campus

ข. การแบ่งตัว (fission) ยีสต์จะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า binary fission คล้ายกับที่เกิดในแบคทีเรีย โดยที่เซลล์ยีสต์จะพองออกหรือยาวออก นิวเคลียสจะมีการแบ่งทำให้ได้เซลล์ใหม่ขนาดเท่ากัน 2 เซลล์เกิดขึ้น

ค. การแตกหน่อและแบ่งตัวเกิดร่วมกัน (bud-fission) โดยเซลล์ยีสต์จะสร้างหน่อขึ้นมาและมีผนังคั่นระหว่างเซลล์แม่กับหน่อ

**2.2.3.2 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ**

ยีสต์ชนิด *Saccharomyces cerevisiae* มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยมีวัฏจักรชีวิตแบบสลับช่วงชีวิตที่เป็นแฮพพลอยด์ และดิปพลอยด์พอๆ กัน ทั้งสองช่วงชีวิตมีการเพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อ วัฏจักรชีวิตเป็นไปตามรูปที่ 4




**รูปที่ 4** การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของ *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา : Feldmann (2005)

Prince of Songkla University Pattani Campus

**2.2.4 นิเวศวิทยาของยีสต์ (Ecology of Yeast)**

นิเวศวิทยาของยีสต์มีความสำคัญสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์และเป็นพื้นฐานของวิวัฒนาการของยีสต์สปีชีส์ใหม่ ๆ เกิดจากการคัดเลือกโดยสภาวะแวดล้อม การพบความเหมือนและความต่างของยีสต์ที่พบในสภาวะแวดล้อมใดสภาวะแวดล้อมหนึ่งช่วยให้เห็นวิวัฒนาการที่เกิดขึ้นกับยีสต์นั้น การศึกษาวิวัฒนาการของยีสต์รวมเอาการศึกษาอิทธิพลของสภาวะกายภาพของสิ่งแวดล้อมต่อเซลล์ยีสต์และปฏิกิริยาระหว่างยีสต์กับจุลินทรีย์อื่น รวมทั้งกับสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดใหญ่กว่าโดยเฉพาะแมลงซึ่งมักกินยีสต์เป็นอาหารและทำหน้าที่เป็นพาหะสำหรับยีสต์

แหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติของยีสต์มีทั้งอยู่บนบก (terrestrial habitat) แหล่งที่อยู่ในน้ำ (aquatic habitat) เช่น พืช สัตว์ ดิน น้ำ และ อากาศ แหล่งอาศัยที่ยีสต์ชอบ คือ พืช โดยพบได้ทั้งดอก ผล ใบ ลำต้น และยาง ทั้งนี้เพราะพืชนอกจากจะมีความสามารถในการสังเคราะห์น้ำตาลและพอลิแซคคาไรด์หลายชนิดแล้ว ยังสามารถสังเคราะห์สารประกอบคาร์บอนชนิดอื่นอีกหลายชนิด สำหรับการเจริญของยีสต์ นอกจากพบยีสต์ตามแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติหลายชนิดแล้ว ยังอาจพบยีสต์ได้ตามสภาวะแวดล้อมที่มนุษย์สร้างขึ้น เช่น พบในระหว่างการหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น ไวน์ สาโท และในอาหารหมักพื้นเมืองบางชนิด เช่น ข้าวหมาก และ ขนมตาล บทบาทของยีสต์ในแหล่งอาศัยมีความสำคัญในการเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์โดยเฉพาะในเขตกึ่งร้อนและเขตร้อนซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของสปีชีส์และมีการเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์อย่างรวดเร็ว การเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมเหล่านี้เกิดขึ้นเร็วมาก และเมื่อสารอินทรีย์ของแหล่งเหล่านั้นเปลี่ยนแปลงไปทำให้ประชากรของยีสต์เปลี่ยนแปลงไปด้วย ผลที่ตามมา คือ ยีสต์หลายสปีชีส์หายไป ดังนั้นจึงควรต้องมีการแยก เก็บ และศึกษาลักษณะของยีสต์ในแหล่งนั้น ๆ อย่างรวดเร็ว

**2.2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์**

ยีสต์ทั่วไปจะเจริญได้ดีในที่มีความชื้นเพียงพอ ยีสต์สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของตัวถูกละลายสูง จึงสามารถจำแนกยีสต์ได้เป็น 2 แบบ ตามความต้องการความชื้นของยีสต์ ได้แก่ พวกยีสต์ทั่วไป กับพวกออสโมฟิลิก (osmophilic yeast) พวกยีสต์ทั่วไปต้องการความชื้นสูง พบว่ามี $a_w$ ขั้นต่ำอยู่ระหว่าง 0.88-0.94 ขณะที่ออสโมฟิลิกเจริญอย่างช้าๆ ยีสต์เจริญได้ดีในช่วงพีเอช 4-4.5 และเจริญได้ดีในอาหารที่เป็นด่าง การเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนจะเป็นไปได้ดีมาก ตามปกตินำ้ตาลเป็นแหล่งพลังงานที่ดีที่สุดของยีสต์ (สาวิตรี, 2549)

**2.2.5.1 แหล่งคาร์บอนและพลังงาน**

สารอินทรีย์ที่เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานมีปริมาณมาก และนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางได้แก่ แป้งจากข้าวชนิดต่างๆ ข้าวโพด มันสำปะหลัง มันฝรั่ง น้ำตาลที่ยีสต์เกือบทุกสายพันธุ์สามารถใช้ได้ ได้แก่ D-glucose, D-mannose, D-fructose และ sucrose เป็นต้น อย่างไรก็ตามยีสต์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนอื่นๆ ได้อีกดังตารางที่ 1 โดยการเติมแหล่งพลังงานเพื่อให้จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญเติบโตนั้นจะต้องคำนึงถึงปริมาณที่เหมาะสม และต้องคำนึงถึงผลกระทบต่างๆ ด้วย จุลินทรีย์แต่ละชนิดได้พลังงานในการดำรงชีวิตแตกต่างกันไป จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์แสงได้จะได้พลังงานจากแสง ในขณะที่จุลินทรีย์พวก Chemoorganotroph จะได้พลังงานจากการออกซิไดซ์สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร จุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นพวก Chemoorganotroph ซึ่งโดยทั่วไปได้พลังงานจากสารประกอบคาร์บอน เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน จุลินทรีย์บางชนิดอาจใช้มีเทน (methane) หรือเอทานอลเป็นแหล่งพลังงานได้ด้วย คาร์บอนเป็นแหล่งที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์เซลล์

**ตารางที่ 1** ความสามารถของยีสต์ในการใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

| Nutrient | *S. cerevisiae* | *S. carlsbergensis* | *S. fragilis* | *C. utilis* | *C. tropicalis* |
|---|---|---|---|---|---|
| Glucose | + | + | + | + | + |
| Galactose | + | + | + | - | + |
| Maltose | + | + | - | + | + |
| Sucrose | + | + | - | + | + |
| Lactose | - | - | + | - | - |
| Xylose | - | - | - | + | + |
| Ethanol | ± | - | - | + | - |

หมายเหตุ : + = มีการเจริญ, ± = มีการเจริญน้อย และ - = ไม่มีการเจริญ

ที่มา : ดัดแปลงจาก Rose and Harrison (1971)

Prince of Songkla University Pattani Campus

**2.2.5.2 แหล่งไนโตรเจน**

ยีสต์ต้องการไนโตรเจนในการเจริญ เนื่องจากเป็นแร่ธาตุที่สำคัญในการสร้างโปรตีนของเซลล์ ผนังเซลล์ยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบร้อยละ 10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Walker, 1998) ยีสต์แต่ละชนิดสามารถใช้แอมโมเนียมไนโตรเจนได้ (Spencer *et al*., 1997) ยีสต์สกัดและเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ที่มีปริมาณมากรองลงมาจากคาร์บอน สารหลายชนิดสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ โดยแหล่งไนโตรเจนที่มีขนาดเล็กและใช้ได้ง่าย เช่น แอมโมเนียมไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟต นอกจากอนินทรีย์ไนโตรเจนแล้วอินทรีย์ไนโตรเจนหลายชนิด เช่น กรดอะมิโน เพปไทด์ พิวรีน และเอมีน ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนของยีสต์บางชนิดได้ ยีสต์ใช้แอมโมเนียมอิออนเป็นแหล่งไนโตรเจนได้เร็วกว่าสารไนโตรเจนอื่น ในสภาวะที่มีอากาศยีสต์สามารถใช้แอมโมเนียมได้ดีกว่ากรดอะมิโน นอกจากนี้ยีสต์ยังใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ แต่การนำไปใช้จะช้ากว่า แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ เช่น ยีสต์สกัด โพแทสเซียมคลอไรด์ โพแทสเซียมไนเตรท

**2.2.5.3 แหล่งฟอสฟอรัส**

บทบาทหลักของฟอสฟอรัส คือ เป็นองค์ประกอบของน้ำตาลฟอสเฟต กรดนิวคลีอิค และนิวคลีโอไซด์ไดฟอสเฟต หรือนิวคลีโอไทด์ไทรฟอสเฟต มีความสำคัญในการควบคุมเมตาบอลิซึมของเซลล์ให้ฟอสเฟตสะสมและให้พลังงาน ฟอสฟอรัสจึงเป็นแร่ธาตุที่จำเป็นสำหรับการเจริญของยีสต์ในการสร้างพลังงาน เซลล์ยีสต์สามารถดูดซึมสารออร์โตฟอสเฟต และโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตได้ดี

**2.2.5.4 อุณหภูมิ**

ปกติจุลินทรีย์จะเจริญเร็วขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ การเลี้ยงยีสต์ส่วนใหญ่มักบ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส โดยการเจริญจะลดลงมากที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และไม่เจริญที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส และแตกต่างไปตามสายพันธุ์ของยีสต์

**2.2.5.5 ความเป็นกรดด่าง (pH)**

โดยทั่วไปยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ชอบความเป็นกรด และทนกรดได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในช่วง pH 3.5-7.0 ซึ่งพีเอชที่เป็นกรดจะยับยั้งการเจริญของ

Prince of Songkla University Pattani Campus

แบคทีเรีย ทำให้การหมักสามารถเจริญได้ดีตลอดเวลา และมีผลต่อปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นด้วย

**2.2.5.6 ปริมาณของออกซิเจน**

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ทั้งนี้นอกจากออกซิเจนทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายและเป็นองค์ประกอบของไซโตโครมในกระบวนการลูกโซ่การหายใจแล้วยังทำหน้าที่เป็นสิ่งกระตุ้นต่อการเจริญเติบโต (growth factor) โดยยีสต์ต้องการออกซิเจนสำหรับการเกิดไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) เพื่อรักษาการเจริญ ส่วนการเขย่าจะเป็นการเพิ่มอัตราการดูดซึมออกซิเจนอย่างมากทำให้การเจริญของยีสต์เพิ่มขึ้น

## 2.3 คิลเลอร์ยีสต์ (Killer Yeast)

คิลเลอร์ยีสต์ คือ ยีสต์ที่มีความสามารถในการแสดงคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้โดยจะมีการปลดปล่อยสารพิษ (killer toxin) ออกมานอกเซลล์แล้วฆ่าสายพันธุ์อื่นที่มีความว่องไวต่อการถูกทำลาย ในขณะที่ตัวเองมีความคงทนต่อคิลเลอร์ท็อกซินที่สร้างขึ้นได้ คิลเลอร์ยีสต์ชนิดแรกที่พบ คือ *Saccharomyces cerevisiae* (Bevan and Makower, 1963) และชนิดอื่นๆ เช่น *Hansenula* sp., *Picchia* sp., *Candida* sp., *Willopsis* sp., *Torulopsis* sp., *Tricosporon* sp., *Kloeckers* sp., *Kluyveromyces phaffi*. (ปราโมทย์ และคณะ, 2529; Butler *et al*., 1994; Estrada-Godina *et al*., 2001; Perez *et al*., 2001; Carreiro *et al*., 2002; Pintar and Starmer, 2003; Comitini *et al*., 2004; Ceccato-Antonini *et al*., 2004; Zarowska *et al*., 2004; Izgu *et al*.,2006; Murciano *et al*., 2006; Kapsopoulou *et al*., 2008; Goretti *et al*., 2009; Vadkertiova and Slavikova., 2007)

### 2.3.1 แหล่งที่พบคิลเลอร์ยีสต์

คิลเลอร์ยีสต์สามารถพบได้ในอาหารหลากหลายประเภท เช่น อาหารประเภทหมักดองในกระบวนการผลิตไวน์ สิ่งแวดล้อม และยังพบได้ที่บริเวณผิวหนังของสัตว์ปีก แต่จะสามารถพบได้อย่างเด่นชัดในการหมักไวน์ เนื่องจากที่บริเวณผิวขององุ่นจะมีจุลินทรีย์อยู่หลายชนิด เมื่อนำไปหมักจึงทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดี การหมักดองอาหารเป็นวิธีที่ใช้ในการถนอมอาหารอย่างหนึ่งซึ่งรู้จักมานานแล้ว โดยใช้ภูมิปัญญาท้องถิ่น โดยมีจุลินทรีย์เข้ามาเกี่ยวข้อง คือ ยีสต์ แบคทีเรีย และรา ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของอาหาร โดยการทำงานของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น จะทำให้อาหารมีกลิ่นรสต่างจากไปจากเดิม และทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ทำให้อาหารเสียและเป็นพิษ (Perez *et al*., 2001) อาหารที่ใช้ในการหมักดองอาจเป็นอาหารสุก อาหารดิบ อาหารคาว และหวาน การหมักดองอาหารจะมีวิธีการที่แตกต่างกัน นับตั้งแต่วิธีการง่ายๆ โดยการปล่อยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใน

Prince of Songkla University Pattani Campus

อาหารเองไปจนถึงกรรมวิธีที่สลับซับซ้อนโดยอาศัยจุลินทรีย์เข้าช่วย ปัจจุบันการบริโภคผักดองเป็นที่นิยมในประเทศสหรัฐอเมริกา ผักดองที่มียอดจำหน่ายสูงสุดได้แก่ แตงกวาดอง ในอังกฤษจะนิยมใช้หัวหอมดองในอาหารและหัวบีทดองปรุงรสเป็นเครื่องเคียง สำหรับประเทศจีนมีผลิตภัณฑ์ผักดองมากมาย อาทิ หัวผักกาด กะหล่ำปลี พริก แตงกวา และอื่นๆ ไต้หวันนิยมท้อดอง แตงกวาดอง กะหล่ำปลีดอง และ หัวผักกาดดอง ญี่ปุ่นนิยมหัวผักกาด ท้อ ดอกกะหล่ำและผักกาดดอง เกาหลีนิยมใช้กะหล่ำปลีในการทำกิมจิ ส่วนอินเดียจะนิยมดองผักหลายชนิดร่วมกัน ผลิตภัณฑ์อาหารหมักเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ที่ต้องการและเพื่อถนอมอาหารโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนวัตถุดิบให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ อาหารหมักดองสามารถพบคิลเลอร์ยีสต์ได้หลากหลายชนิดซึ่งจะขึ้นอยู่กับประเภทของอาหารหมักดองนั้นๆ ในมะกอกดองสามารถพบคิลเลอร์ยีสต์ได้ 5 ชนิด คือ *Debaryomyces hansenii* CYC 1021, *Pichia anomala* CYC 1027, *P. membranaefaciens* CYC 1106, *P. membranaefaciens* CYC 1108 และ *S. cerevisiae* ซึ่งคิลเลอร์ยีสต์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *C. boidinii* IGC 3430, *S. exiguous* IGC 4612 และ *K. lactis* IGC4358 สามารถเกิดกิจกรรมการยับยั้งได้สูงสุดที่ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 6 (Llorente *et al*, 1997) และสามารถพบคิลเลอร์ยีสต์ได้ในกระบวนการหมักน้ำองุ่นหรือการหมักไวน์ ซึ่งจะเป็นการช่วยในการลดปริมาณการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการหรือจุลินทรีย์ก่อโรคได้ Heard and Fleet (1987) ได้ศึกษาการเจริญเติบโตของคิลเลอร์ยีสต์ในระหว่างการหมักไวน์และทำการคัดแยกคิลเลอร์ยีสต์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักไวน์ คิลเลอร์ยีสต์ที่พบได้แก่ *S. cerevisiae, Kloeckera* spp. *Hansenula* spp. และ *Torulospora* spp. เช่นเดียวกับผลงานของ Vagnoli *et al*. (1993) ได้ศึกษาคิลเลอร์ยีสต์ในกระบวนการหมักไวน์ของอิตาลีโดยใช้ตัวอย่างไวน์ที่หมักเองตามธรรมชาติ 18 ตัวอย่าง เมื่อทำการตรวจสอบความสามารถในการเป็นคิลเลอร์ด้วยทดสอบการยับยั้งการเจริญของสายพันธุ์ที่มีความว่องไว พบว่าปริมาณคิลเลอร์ยีสต์จะมีความสัมพันธ์กันกับปริมาณสายพันธุ์ที่ว่องไว โดยเมื่อคิลเลอร์ยีสต์มีจำนวนเพิ่มขึ้นจะมีผลให้จำนวนของสายพันธุ์ว่องไวลดลง คิลเลอร์ยีสต์ที่พบ ได้แก่ *Candida valida* และ *S. cereviseae* โดยในระยะแรกการปรากฏเป็นคิลเลอร์จะมีจำนวนน้อยและจะมีจำนวนเปอร์เซ็นต์คิลเลอร์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนระยะสุดท้ายของการหมักแอลกอฮอล์

Middelbeek *et al*. (1980) ได้ทำการคัดแยกคิลเลอร์ยีสต์จากบริเวณใบหน้า ปากช่องคลอด และช่องคอของมนุษย์ จากการคัดแยกพบเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ เช่น *Cryptococcus laurentii* 1026, *Hensenula* sp. 1034, *Kluyveromyces* sp. 1024, *Pichia kluyueri* 1002, *Pichia* sp. 1035 และ *Toluropsis* sp.1027 ศึกษาการยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไวจากสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน พบว่าคิลเลอร์

Prince of Songkla University Pattani Campus

ยีสต์หนึ่งสายพันธุ์หรือมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์สามารถเกิดการยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไวชนิด *Candida* และ *Torulopsis* ได้

Petering *et al*. (1991) ศึกษากิจกรรมของคิลเลอร์ยีสต์ในการหมักน้ำองุ่นโดยใช้สายพันธุ์ยีสต์ *Saccharomyces* พบว่า ในการหมักน้ำองุ่นที่มีพีเอช 3.1 อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เกิดกิจกรรมได้ชัดเจนแต่ความสามารถในการยับยั้งจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของเซลล์ที่มีความไวต่อการยับยั้งและเซลล์ของคิลเลอร์ยีสต์โดยที่อัตราส่วนที่เกิดการยับยั้งได้มากที่สุดเท่ากับ 2:1

Santos *et al*. (2004) ศึกษายีสต์ที่สามารถควบคุมเชื้อรา *Botrytis cinerea* ซึ่งทำให้เกิดโรคราดำในผลไม้ โดยทำการคัดแยกยีสต์จาก แหล่งต่างๆ เช่น มะกอกดอง ไวน์องุ่น เครื่องดื่ม และอาหาร พบยีสต์ที่มีคุณสมบัติเป็นคิลเลอร์ทั้งหมด 42 ชนิด ได้แก่ *Pichia anomala*, *Pichia membranifraciens* และ *Cryptococcus albidus* เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้ง *Botrytis cinerea* สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า มีคิลเลอร์ยีสต์จำนวน 20 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ถึง 18 ชนิด ซึ่งเป็นสายพันธุ์ของ *Botrytis cinerea* และ *Botrytis fuckeliana* โดยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการยับยั้ง *Botrytis cinerea* มากที่สุด คือ *P. membranaefaciens*, *P. anomala* และ *Debaryomyces hansenii*

Hernandez *et al*. (2008) ทดสอบกิจกรรมของคิลเลอร์ยีสต์ที่คัดแยกได้จากมะกอกดอง พบว่า สามารถคัดเลือกคิลเลอร์ยีสต์ชนิดต่างๆ ได้จำนวน 51 ไอโซเลตประกอบด้วยสายพันธุ์ *Candida, Debaryomyces, Kluyveromyces, Pichia* และ *Saccharomyces* โดยในแต่ละสายพันธุ์จะสามารถเกิดกิจกรรมการยับยั้งได้ที่สภาวะที่แตกต่างกัน

**2.3.2 คิลเลอร์ท็อกซิน (Killer Toxin)**

คิลเลอร์ท็อกซินเป็นสารพิษที่ผลิตโดยยีสต์ ซึ่งจะเป็นชนิดที่เป็นโปรตีนและไกลโคโปรตีน ได้พิสูจน์และเป็นที่ยอมรับกันแล้วว่ามีความปลอดภัยต่อมนุษย์ โดยคิลเลอร์ยีสต์ที่พบส่วนใหญ่จะมีความสามารถในการสร้างคิลเลอร์ท็อกซินได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 20-25 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์สามารถสร้างได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส คิลเลอร์ท็อกซินที่สร้างขึ้นจะเสื่อมสภาพได้ง่าย ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง (ปราโมทย์และคณะ, 2529) และสารพิษที่ได้จากเชื้อยีสต์บางชนิดจะมีความคงตัวน้อยไม่คงสภาพ จึงทำให้หมดความสามารถในการเกิดกิจกรรมการฆ่าได้เมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูง

Pfeiffer *et al*. (1988) พบว่า ยีสต์ *S. cerevisiae* จะหลั่งสารคิลเลอร์ท็อกซินชนิด KT 28 ซึ่งสารชนิดนี้จะมีผลไปยับยั้งหรือต่อต้านการเจริญของยีสต์ชนิดอื่นที่มีความไวและนอกจากนี้ยังไปมีผลต่อเชื้อราก่อโรค หรือโปรโตซัวชนิด *Trichomonas vaginalis* โดยพบว่าที่ความเข้มข้นเพียง 0.1 mg/ml ก็สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรค *T. vaginalis* และ *Microsporum canis* ซึ่งสามารถสังเกต

Prince of Songkla University Pattani Campus

ผลการยับยั้งได้ที่พีเอช 6.5 เช่นเดียวกับ Pena *et al.* (1981) ได้กล่าวว่า *S. cerevisiae* จะหลั่งสารคิลเลอร์ท็อกซินและไปมีผลในการยับยั้งเซลล์จุลินทรีย์อื่นที่มีความว่องไว

Chen *et al.* (2000) ได้กล่าวว่า ยีสต์ *Schwanniomyces occidentalis* จะผลิตคิลเลอร์ท็อกซินที่เป็นสารประกอบประเภทโปรตีน ซึ่งจะไปมีผลฆ่าเซลล์ของ *S. cerevisiae* ที่มีความไวต่อคิลเลอร์ท็อกซินที่สร้างขึ้นและนำไปทำให้บริสุทธิ์พบว่าคิลเลอร์โปรตีนประกอบด้วยสองซับยูนิตที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 7.4 และ 4.9 kDa

**2.3.2.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของคิลเลอร์ท็อกซิน**

การวิเคราะห์กิจกรรมหรือความสามารถในการยับยั้งของคิลเลอร์ท็อกซินสามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี เช่น การวิเคราะห์โดยใช้อาหารแข็งหรืออาหารเหลว ดังเช่นการศึกษาของ Soares and Sato (1999) ได้ตรวจสอบการเกิดกิจกรรมการยับยั้งของคิลเลอร์ท็อกซินจากเชื้อ *S. cerevisiae* Y500-4L โดยใช้อาหารแข็ง YEPD-MB (yeast extract peptone glucose - methylene blue agar) ยับยั้งการเจริญของ Fleischmann, Itaiqura (เป็นชื่อยีสต์ที่ใช้ทางการค้า) และคิลเลอร์ยีสต์มาตรฐาน คือ K1-K11 (*S. cerevisiae* KL88, *S. diastaticus* NCYC 713, *S. capepsis* NCYC 761, *Candida glabrata* NCYC 388, *Debaryomyces vanrij* NCYC 577, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 587, *Pichia membranaefaciens* NCYC 333, *Hansenula anomala* NCYC 435, *H. mrakii* NCYC 500, *K. drosophilarum* NCYC 575 และ*Torulopsis glabrata* ATCC 15126) นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน พบว่าให้ผลปรากฏเป็นวงใส (clear zone) ซึ่งสามารถวัดวงใสได้อย่างชัดเจน

Soares and Sato (2000) ศึกษาคุณสมบัติของคิลเลอร์ท็อกซินของ *S. cerevisiae* Y500-4L ที่แยกได้จากแอลกอฮอล์ที่ผลิตจากพืช ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งยีสต์ทางการค้าซึ่งผลิตโดย Fleschmann Royal Nabisco ในอาหาร YEPD ด้วยวิธี well test method โดยการนำสายพันธุ์ที่มีความว่องไวป้ายบนผิวหน้าอาหารแข็ง จากนั้นนำกระดาษกรองที่มีลักษณะเป็นวงกลมมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร จุ่มในสารละลายคิลเลอร์ท็อกซินแล้ววางบนผิวหน้าอาหารแข็งพบว่า เกิดกิจกรรมการยับยั้งได้มากที่สุดในช่วงพีเอช 4.1-4.5 และอุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส คิลเลอร์ท็อกซินจะมีความเสถียรมากที่สุดในช่วงพีเอช 3.8-4.5 ที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส

Zagorc *et al.* (2001) ศึกษาคิลเลอร์ยีสต์ในไวน์พื้นเมืองและนำไปประยุกต์เป็นหัวเชื้อในการหมักไวน์ ตรวจสอบลักษณะปรากฏของคิลเลอร์ท็อกซินจากเชื้อ *S. cerevisiae* โดยใช้อาหารแข็ง YEPD ที่มีการเติม methylen blue ร้อยละ 0.003 และปรับพีเอชให้เหมาะสม นำไป

Prince of Songkla University Pattani Campus

บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จะปรากฏผลเป็นลักษณะวงใสบริเวณขอบเซลล์จะเป็นสีน้ำเงินรอบ ๆ

**2.2.3.2 การทำคิลเลอร์ท็อกซินให้บริสุทธิ์**

คิลเลอร์ท็อกซินที่ได้จากการหลั่งของยีสต์สามารถทำให้มีความบริสุทธิ์ได้โดยการนำสารละลายที่ได้กรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดรูพรุนที่เล็กกว่าเซลล์จุลินทรีย์และนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วระดับต่างๆ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ตกตะกอนโปรตีนด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ซึ่งถือว่าเป็นการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นแรกดังเช่นการศึกษาของ Comitini *et al.* (2004) ได้ทำบริสุทธิ์คิลเลอร์ท็อกซินชนิด KpKt จากเชื้อ *Kluyveromyces phaffii* ให้บริสุทธิ์โดยกรองสารละลายส่วนใสด้วย Amicon YM10 (10 kDa cut-off membrane; Pharmacia) จากนั้นคัดแยกด้วยถุง dialysis membrane และทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ชนิด Q-Sepharose ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเมื่อเพิ่มความละเอียดในการกรองจะทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นตามลำดับ และกิจกรรมที่เกิดขึ้นจะเพิ่มตามปริมาณความเข้มข้นของสารละลายท็อกซินดังแสดงในตารางที่ 2

Izgu *et al.* (2006) ศึกษาคุณสมบัติและการทำให้บริสุทธิ์ของคิลเลอร์ท็อกซินจาก *P. anomala* NCYC 432 โดยขั้นแรกนำสารละลายส่วนใสกรองโดยวิธี ultrafiltration จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยนำมากรองด้วย gel filtration chromatography ต่อเนื่องกันสองครั้งโดยใช้คอลัมท์ TSK G2000SW เมื่อนำคิลเลอร์ท็อกซินที่บริสุทธิ์แล้วมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งด้วยเซลล์ที่มีความไว คือ *S. cerevisiae* จะให้เกิดผลเป็นวงใสที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 10 มิลลิเมตร ต่อ 1 aU

**ตารางที่ 2** การทำให้บริสุทธิ์ของคิลเลอร์ท็อกซินชนิด KpKt จากเชื้อ *Kluyveromyces phaffii*

| step | Total volume(ml) | Total protein(mg) | Activity (aU/ml) | Purification (fold) | Yield (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Culture broth | 1800 | 144 | 0.3 | 1 | 100 |
| Ultrafiltration | 12 | 34 | 31 | 29 | 69 |
| Q-Sepharose | 1.2 | 0.06 | 54 | 285 | 12 |

หมายเหตุ : 1 aU คือ ความเข้มข้นของท็อกซินที่ทำให้เกิดวงใส 8.0 mm

ที่มา : Comitini *et al.* (2004)

Prince of Songkla University Pattani Campus

ยีสต์แต่ละสายพันธุ์ที่ผลิตโปรตีนแล้วหลั่งออกนอกเซลล์จะมีขนาดของโปรตีนที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์แต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3 นอกจากนี้การทำให้คิลเลอร์ท็อกซินบริสุทธิ์สามารถศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากคิลเลอร์ท็อกซิน ดังเช่นการศึกษาของ Riffer *et al*. (2002) รายงานว่าคิลเลอร์ท็อกซินจากยีสต์ชนิด *Saccharomyces cerevisiae* มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 42 kDa

**ตารางที่ 3** น้ำหนักโมเลกุลของคิลเลอร์โปรตีนจากคิลเลอร์ยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ

| **Killer yeast** | **Molecular weight (kDa)** | **Reference** |
|---|---|---|
| *Hansenula mrakii* | 8.9 | Ashida *et al*., 1983 |
| *Pichia anomala* WC65 | 83.3 | Sawant *et al*., 1989 |
| *Zygosaccharomyces bailii* | 10 | Redler *et al*., 1993 |
| *Williopsis mrakii* | 1.8-5.0 | Hodgson *et al*., 1995 |
| *Schawanniomyces occidentalis* | 4.9, 7.4 | Chen *et al*., 2000 |
| *Saccharomyces cerevisiae* | 18 - 20 | Soares and Sato, 2000 |
| *Pichia membranifaciens* | 20.5 | Yap., 2000 |
| *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 | 85 | Guyard *et al*., 2002 |
| *Saccharomyces cerevisiae* | 20 | Lebionka *et al*., 2002 |
| *Saccharomyces cerevisiae* | 42 | Riffer *et. al*., 2002 |
| *Debaryomyces hansenii* | 23 | Santos *et al*., 2002 |
| *Zygosaccharomyces bailii* | 10 | Weiler and Schmitt, 2003 |
| *Williopsis saturnus* DBPG 4561 | 62 | Buzzini *et al*., 2004 |
| *Kluveromyces phaffii* DBVPG 6076 | 33 | Comitini *et al*., 2004 |
| *Hansenula anomala* | 49 | Izgu and Altinbay., 2004 |
| *Pichia membranifaciens* CYC 1106 | 18 | Santos and Marquina, 2004 |
| *Pichia anomala* NCYC 432 | 47 | Izgu *et al*., 2006 |
| *Pichia anomala* YF07b | 49 | Wang *et al*., 2007 |
| *Williopsis saturnus* | 47.5 | Peng *et al*., 2009 |

Prince of Songkla University Pattani Campus

**2.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของคิลเลอร์ท็อกซิน**

**2.3.3.1 พีเอช (pH)**

พีเอชเริ่มต้นและสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิตและประสิทธิภาพของคิลเลอร์ท็อกซินของยีสต์ การปรับพีเอชเริ่มต้นให้เหมาะสมจะทำให้ยีสต์มีการเจริญเติบโตและสร้างคิลเลอร์ท็อกซินที่มีประสิทธิภาพ ดังเช่นการศึกษาของ Santos and Marquina (2004) ได้ศึกษาคิลเลอร์ท็อกซินจาก *Pichia membranifaciens* และความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เป็นตัวควบคุมและยับยั้งโรคราดำในต้นองุ่น พบว่า พีเอชมีอิทธิพลต่อกิจกรรมการยับยั้งและความคงตัวของคิลเลอร์ท็อกซินโดยจะมีกิจกรรมสูงสุดและมีความคงตัวในช่วงพีเอช 3.0-4.8 เมื่อค่าพีเอชเพิ่มขึ้นกิจกรรมของยีสต์และความคงตัวของคิลเลอร์ท็อกซินจะลดลง เช่นเดียวกับการทดลองของ Ciani and Fatichenti (2001) พบว่าคิลเลอร์ท็อกซินจากเชื้อ *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 สามารถมีกิจกรรมสูงสุดได้ที่พีเอชมากกว่า 3.0

Wilson and Whittaker (1989) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งและความคงตัวของคิลเลอร์ท็อกซินจาก *Kluyvermyces lactis* พบว่า ที่ช่วงพีเอช 4.8-5.4 ทำให้คิลเลอร์ท็อกซินมีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีความว่องไวได้ดีที่สุดและมีความคงตัวสูงสุด อย่างไรก็ตามความคงตัวของคิลเลอร์ท็อกซินสามารถมีความคงตัวได้จนถึงที่พีเอช 8

Criseo *et al.* (1999) ได้ศึกษากิจกรรมการยับยั้ง *Cryptococcus neoformans* var. ชนิด A ในช่วงพีเอช 4.6-5.6 ด้วยยีสต์ที่ได้จากการคัดแยกยีสต์ในสิ่งแวดล้อมจำนวน 35 สายพันธุ์ ในอาหาร modified Sabouraud dextrose agar (MSDA) ที่พีเอชต่างๆ พบว่า มีเพียง 25 สายพันธุ์ที่สามารถเกิดกิจกรรมการยับยั้งได้ที่ระดับพีเอชต่างๆ กัน โดยมีกิจกรรมเท่ากับร้อยละ 64.0, 38.5 และ 43.6 ที่พีเอช 4.6, 5.0 และ 5.6 ตามลำดับ แสดงว่ากิจกรรมการยับยั้งจะเกิดได้ดีที่สุดที่พีเอช 4.6

Chen *et al*. (2000) ได้ศึกษาคุณสมบัติของ *Schwanniomyces occidentalis* ในการเป็นคิลเลอร์ยีสต์ต่อกิจกรรมการยับยั้ง *S. cerevisiae* ในช่วงพีเอช 2.0-5.5 พบว่าคิลเลอร์ท็อกซินสามารถเกิดกิจกรรมได้ดีที่สุดในช่วงพีเอช 4.2-4.8 และคิลเลอร์โปรตีนจะเสถียรในช่วงพีเอช 2.0-5.0 เมื่อเก็บรักษาไว้ที่พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่าคิลเลอร์โปรตีนจะเกิดกิจกรรมลดลงครึ่งหนึ่งของการเกิดกิจกรรมและจะไม่เกิดกิจกรรมที่พีเอช 6.0

Soares and Sato (2000) รายงานว่าคิลเลอร์ท็อกซินจากเชื้อ *S. cerevisiae* จะเกิดกิจกรรมการยับยั้งได้ในช่วงพีเอช 4.1-4.5 และอุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส โดยที่พีเอช 4.5 อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส จะเกิดกิจกรรมได้ดีที่สุด และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พีเอช 4.1

Prince of Songkla University Pattani Campus

จะเกิดกิจกรรมได้ดี ความสามารถในการเกิดกิจกรรมจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (30 องศาเซลเซียส)

Ciani and Fatichenti (2001) ได้ทำการศึกษาคิลเลอร์ท็อกซินของ *Kluyvermyces phaffii* DBVPG 6076 เพื่อใช้เป็นวัตถุกันเสียและควบคุม apiculate wine yeast โดยได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของคิลเลอร์ท็อกซินพบว่า พีเอชและอุณหภูมิจะมีผลต่อการเกิดกิจกรรมโดยทั่วไป กิจกรรมจะเกิดในช่วงพีเอช 2.8-6.0 และเกิดกิจกรรมได้ดีในช่วงพีเอช 3.0-5.0 นอกจากนี้เมื่อนำไปทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนชนิด *S. cerevisiae* และ *Hanseniaspora uvarum* พบว่า สามารถยับยั้งได้ที่พีเอช 4.0 โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* ได้ดีกว่า *H. uvarum*

Lebionka *et al*. (2002) ได้ทำการคัดเลือกยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่สามารถผลิตคิลเลอร์ท็อกซินชนิด K2 และการทำให้มีความบริสุทธิ์ โดยเลี้ยง *S. cerevisiae* สายพันธุ์ Rom K-100 หรือ M 437 ในอาหารเหลว MB (ไม่เติม methylene blue) ที่มีพีเอช 4.0 บ่มที่อุณหภูมิ 20 $^{o}$C เป็นเวลา 96-120 ชั่วโมง พบว่า สายพันธุ์ Rom K-100 และ M 437 ผลิตคิลเลอร์ท็อกซินและมีกิจกรรมได้มากในช่วงพีเอช 4.0-4.2 และเกิดกิจกรรมได้มากที่สุดในช่วงพีเอช 4.3-4.4

Izgu *et al*. (2004) ศึกษาการหมักกล้าเชื้อของ *S. cerevisiae* ในอุตสาหกรรมให้ต้านทานต่อการปนเปื้อนของ *Candida tropicalis* โดยทำการศึกษากิจกรรมที่เหมาะสมในช่วงพีเอช 3.5-5.0 จากการศึกษาพบว่า พีเอชที่มีความเหมาะสมต่อกิจกรรมการยับยั้งของคิลเลอร์ยีสต์มากที่สุด คือ ที่ระดับพีเอช 4.0

**2.3.3.2 อุณหภูมิ**

อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตคิลเลอร์ท็อกซินของยีสต์ โดยทั่วไปยีสต์จะเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส ยีสต์บางสายพันธุ์จะหยุดการเจริญเติบโตเมื่ออุณหภูมิสูง แต่ยังมียีสต์บางสายพันธุ์ที่สามารถทำให้เกิดการหมักได้ที่อุณหภูมิสูงๆ Wilson and Whittaker (1989) กล่าวว่าคิลเลอร์ท็อกซินที่ผลิตจาก *Kluyveromyces lactis* จะเสถียรที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และได้ทำการศึกษาในอาหาร YEPD และ GLM (ประกอบด้วย glucose ร้อยละ 2, $MgSO_4$. $7H_2O$ ร้อยละ 0.2, $NH_4H_2PO_4$ ร้อยละ 1 และ yeast extract ร้อยละ 0.5) ที่พีเอช 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 4 , 40 , 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าคิลเลอร์ท็อกซินจะเสถียรที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และจะไม่เกิดกิจกรรมการยับยั้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส กิจกรรมของคิลเลอร์ท็อกซินจะลดลงหลังจากเก็บในอาหาร YEPD ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 9 เดือน ในทำนองเดียวกัน Ciani and Fatichenti (2001) ได้กล่าวว่าอุณหภูมิจะมีผลต่อกิจกรรมการควบคุม apiculate wine yeast ของคิลเลอร์ท็อกซินได้จาก

Prince of Songkla University Pattani Campus

*Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 โดยพบว่า สามารถมีความเสถียรที่อุณหภูมิมากกว่า 25 องศาเซลเซียสได้ อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิสูงจะเป็นสาเหตุของการลดกิจกรรมของคิลเลอร์ท็อกซินได้โดยทดสอบด้วยวิธี well test assay พบว่า เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 2 ชั่วโมง จะทำให้คิลเลอร์ท็อกซินไม่มีกิจกรรมการยับยั้ง

Heard and Fleet (1987) ศึกษาการเกิดและการเจริญเติบโตของคิลเลอร์ยีสต์ในระหว่างการหมักไวน์จำนวน 16 ตัวอย่าง และศึกษาสมบัติการเป็นคิลเลอร์ของเชื้อที่คัดแยกได้โดยศึกษาเฉพาะเชื้อ *S. cerevisiae* พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งระหว่างการหมักไวน์ คือ พีเอชและอุณหภูมิในการหมักไวน์ โดยอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์คิลเลอร์ และเซลล์ที่มีความว่องไวจะมีความสัมพันธ์กัน คือ เมื่อเซลล์คิลเลอร์มีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเซลล์ที่มีความว่องไวจะมีปริมาณลดลงโดยจะเกิดกิจกรรมการยับยั้งได้ดีที่สุดที่พีเอช 3.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Izgu *et al.* (1997) ได้ศึกษาคัดแยกยีสต์และกิจกรรมการยับยั้งยีสต์ที่ปนเปื้อนได้แก่ *C. tropicalis* ในการผลิตกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* ในอุตสาหกรรมขนมปังอบ โดยทำการศึกษากิจกรรมการยับยั้งในช่วงพีเอช 2.9-6.1 และอุณหภูมิ 18-35 องศาเซลเซียส พบว่า กิจกรรมการยับยั้งของคิลเลอร์ท็อกซินจะเกิดผลในช่วง 3.5-4.7 แต่จะให้ผลที่ดีที่สุดในช่วงพีเอช 3.9–4.1 และอุณหภูมิ 18-30 องศาเซลเซียส สามารถเกิดกิจกรรมการยับยั้งได้ แต่ที่อุณหภูมิ 22–25 องศาเซลเซียส สามารถเกิดได้ดีที่สุด

Izgu *et al.* (2004) ศึกษาการต้านทานของกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *C. tropicalis* ด้วยการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งต่อยีสต์ที่ปนเปื้อนจากการเกิดเป็นวงใสที่ช่วงพีเอช 3.5-5.5 และที่อุณหภูมิ 20-35 องศาเซลเซียส พบว่า กิจกรรมการยับยั้งจะเกิดได้ดีที่สุดที่พีเอช 4.0 และที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส คิลเลอร์ท็อกซินจะมีความเสถียรเป็นระยะเวลานานถึง 1 ปี

Santos and Marquina (2004) ศึกษาคิลเลอร์ท็อกซินจาก *Pichia membranifaciens* และความเป็นไปได้ในการเป็นตัวควบคุมและยับยั้งโรคราดำในต้นองุ่น โดยนำคิลเลอร์ท็อกซินยับยั้งเชื้อรา *Botrytis cinerea* ที่พีเอช 4 และที่อุณหภูมิมากกว่า 20 องศาเซลเซียส จะมีความเหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรม แต่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส กิจกรรมการยับยั้งจะลดลงร้อยละ 70 ซึ่งอุณหภูมิจะมีผลให้มีความเสถียรแตกต่างกัน โดยที่อุณหภูมิ 5-20 องศาเซลเซียส คิลเลอร์ท็อกซินจะมีความเสถียรมากที่สุด

Izgu *et al.* (2006) ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และกิจกรรมของ exo-ß-1,3-glucanase ของคิลเลอร์ท็อกซินจาก *Pichia anomala* NCYC 432 ด้วยการเลี้ยงเซลล์ *P. anomala* ในอาหาร

Prince of Songkla University Pattani Campus

เหลว YEPD และเติมกลีเซอรอลเพื่อให้เกิดการเสถียร จากนั้นนำคิลเลอร์ท็อกซินที่ได้ทำให้เข้มข้นโดยใช้การกรองแบบ ultrafiltration และทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยใช้ gel filtration chromatography และคอลัมน์ชนิด TSK G2000SW เมื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งโดยใช้ *S. cerevisiae* เป็นสายพันธุ์ที่มีความว่องไวพบว่า สามารถเกิดการยับยั้งและเกิดบริเวณวงใสมีขนาด 10 มิลลิเมตร และยืนยันความบริสุทธิ์ของคิลเลอร์ท็อกซินโดยใช้ SDS-PAGE จากการเกิดแถบของโปรตีนเพียงหนึ่งแถบ มีขนาดโมเลกุล 47 kDa และศึกษาค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เกิดกิจกรรมการยับยั้ง พบว่า พีเอชที่ 4.5 และอุณหภูมิ 4-37 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสมในการยับยั้ง นอกจากนี้การเกิดกิจกรรมการยับยั้งของคิลเลอร์ท็อกซินจากยีสต์จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ต่าง ๆ อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม ดังตารางที่ 4

**ตารางที่ 4** อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของคิลเลอร์ท็อกซินในการยับยั้งของยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ

| **Killer strain** | **อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)** | **พีเอช** | **อ้างอิง** |
|---|---|---|---|
| *Saccharomyces cerevisiae* | 15.0-25.0 | 3.5-4.5 | Heard and Fleet (1987) |
| *Kluyvermyces phaffii* | 24.0 | 4.0 | Ciani and Fatichenti (2001) |
| *Saccharomyces cerevisiae* | 20.0 | 4.3-4.4 | Lebionka *et al*. (2002) |
| *Candida tropicalis* | 20.0-30.0 | 4.0 | Izgu *et al.* (2004) |
| *Pichia membranifaciens* | 25.0 | 3.0-4.8 | Santos and Marquina (2004) |
| *Pichia anomala* | 4.0-37.0 | 4.5 | Izgu *et al.* (2006) |

**2.3.3.3 ความเข้มข้นของเกลือ**

สภาวะแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง เช่น น้ำเค็ม อาหารหมักที่ใช้เกลือ เช่น ผักดองเค็ม ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว มักพบออสโมฟิลิกหรือยีสต์ที่ชอบแรงดันออสโมซีส ซึ่งมีทั้งฮาโลฟิลิกยีสต์ หรือยีสต์ทนเค็ม (halotolerant yeast) หรือยีสต์ทนเกลือ (salt tolerant yeast) เป็นยีสต์ที่เจริญได้ที่มีเกลือซึ่งมักเป็นเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ ตัวอย่าง ยีสต์ทนเค็ม เช่น *Zygosaccharomyces rouxii* เจริญได้ในที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3.7 โมลาร์ (ร้อยละ 20-22)

Llorente *et al*. (1997) ได้คัดแยกคิลเลอร์ยีสต์จากมะกอกดองและศึกษาคุณสมบัติของยีสต์ที่แยกได้ในอาหาร YMB (ประกอบด้วย yeast extract ร้อยละ 0.3, malt extract ร้อยละ 0.3,

Prince of Songkla University Pattani Campus

peptone ร้อยละ 0.5 และ glucose ร้อยละ 1) ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ (ร้อยละ 0, 3 และ6) พบว่า ยีสต์ที่คัดแยกได้ ได้แก่ *Pichia anomal, Pichia membranifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Debaryomyces hansenii* มีกิจกรรมการยับยั้ง *C. boidinii* IGC 3430 ได้สูงสุดที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6 จะเกิดเป็นวงใสรอบๆ คิลเลอร์ยีสต์

**2.3.4 กลไกการทำงานของคิลเลอร์ท็อกซิน**

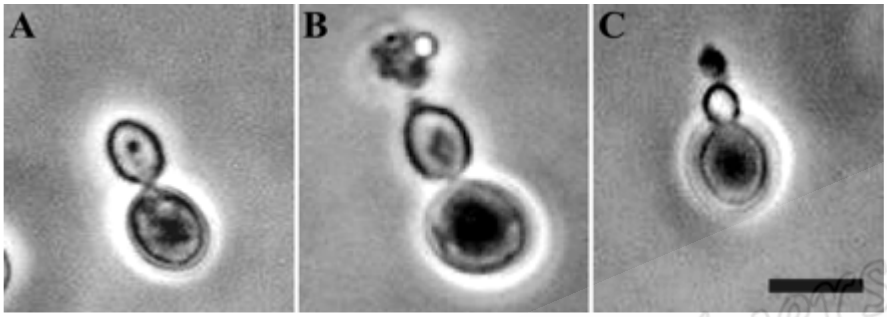
คิลเลอร์ท็อกซินเป็นสารประเภทโปรตีน หรือ ไกลโคโปรตีนที่มีความสามารถฆ่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีความไวต่อสารคิลเลอร์ท็อกซิน มีการสันนิษฐานว่าคิลเลอร์ท็อกซินจะรบกวนหรือยับยั้งกลไกการสังเคราะห์ ß-1,3-glucan แต่จะไม่มีผลรบกวนต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ โปรตีน และ ไขมัน (Kasahara, 1994) คิลเลอร์ยีสต์และสารพิษมีการค้นพบและนำไปประยุกต์ใช้ เช่น ระบบการจำลองในงานวิจัยสำหรับการศึกษากลไกการหลั่งสาร และการจับกับตัวรับคิลเลอร์ท็อกซิน ซึ่งจะไปมีผลต่อการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ยีสต์ที่มีความไวต่อสารคิลเลอร์ท็อกซินที่เซลล์สร้างขึ้น แต่จะไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของมันเองหรือเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Komiyama, 1996) โดยจะมีการสร้างสารพิษออกมานอกเซลล์และมีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์ ß-glucan การสังเคราะห์ผนังเซลล์ของยีสต์และรา ผลของการยับยั้งจะทำให้เกิดรูที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่มีความว่องไวจึงทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนโปรตอนภายในและภายนอกเซลล์ซึ่งเป็นสาเหตุของ osmotic pressure (Komiyama, 1996) และมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมจึงก่อให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ ß-glucan ในเซลล์ที่มีความว่องไว (Yamamoto, 1985)

Selvakumar *et al.* (2006) ศึกษาการยับยั้งการสังเคราะห์ ß-1,3-glucan ของราและการเจริญเติบโตโดยคิลเลอร์ท็อกซินชนิด HM-1 จากยีสต์ *Williopsis saturnus* ที่ความเข้มข้นของแอนติบอดี้ scFv (single chain variable fragment) 4 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1.56-12.5 µg/ml พบว่าสามารถยับยั้ง *Candida* ได้ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* NBRC 1400, *C. parapsilosis* NBRC 1396 และ *C. glabrata* NBRC 0622 โดย killer toxin มีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์ ß-1,3-glucan และฆ่าเซลล์ยีสต์ที่มีความไว ซึ่งกลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตโดยการสร้างรูที่ปลายของเซลล์ลูก ผลของการสร้างรูจะทำให้เกิดโครงสร้างที่ยื่นออก และในที่สุดจะทำให้เซลล์ตาย ดังแสดงรูปที่ 5

Walker *et al.* (1995) ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาระหว่างคิลเลอร์ยีสต์และเชื้อราที่ก่อโรค ทำการทดสอบคิลเลอร์ยีสต์ทั้งหมด 17 ชนิด ได้แก่สายพันธุ์ของ *Debaryomyces, Kluveromyces, Pichia, Saccharomyces* และ *Willopsis* โดยคัดแยกจากสิ่งแวดล้อม ดินที่ใช้ทำการเกษตรและทางการแพทย์ เมื่อทดสอบการยับยั้งและกิจกรรมการยับยั้งเชื้อราก่อโรค พบว่า *C. albicans* เป็น

Prince of Songkla University Pattani Campus

เชื้อที่มีความไวต่อกิจกรรมการยับยั้งของ *Williopsis mrakii* ในขณะที่คิลเลอร์ชนิด *S. cerevisiae* และ *P.anomala* จะสามารถยับยั้งการเจริญของราที่ทำให้เกิดการผุของไม้ และราก่อโรคในพืชได้อย่างชัดเจน




**รูปที่ 5** การเกิดรูหรือช่องของเซลล์ยีสต์เมื่อได้รับคิลเลอร์ท็อกซิน (A) เซลล์ยีสต์ชุดควบคุม (B) เซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงด้วยคิลเลอร์ท็อกซินชนิด HM-1 และ (C) เซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงด้วย scFv
ที่มา : Selvakumar *et al*. (2006)

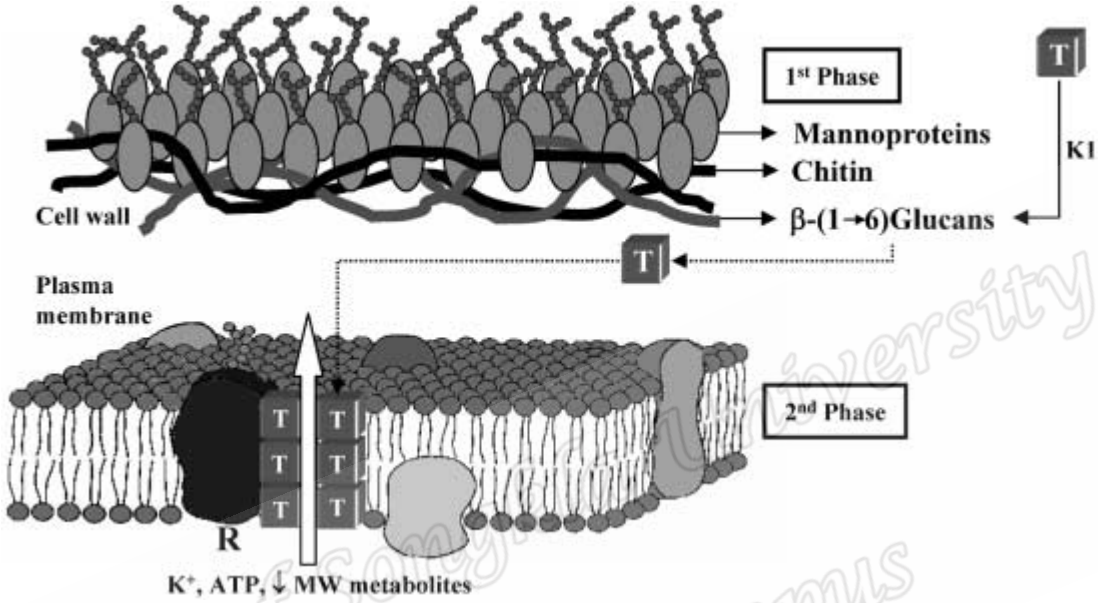
Prince of Songkla University Pattani Campus

**2.3.4.1 กลไกการจับกันระหว่าง killer toxin กับ sensitive strain**

ความหลากหลายของฤทธิ์ในการฆ่าของคิลเลอร์ยีสต์สามารถทดสอบได้จากการศึกษาสารพิษที่ผลิตขึ้น คิลเลอร์ท็อกซินจะมีความแตกต่างที่หลากหลายขึ้นอยู่กับพันธุกรรมและขนาดของโมเลกุลซึ่งจะสามารถแสดงคุณสมบัติออกมา เช่น การเข้ารหัส RNA plasmid ของสารพิษจาก *S. cerevisiae* K1 มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 20 kDa ในขณะที่คิลเลอร์ท็อกซินจาก *P. anomala* มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 47 kDa (Izgu *et al*., 2006)

คิลเลอร์ท็อกซินจะฆ่าเซลล์ที่มีความว่องไวด้วยกลไกที่แตกต่างกัน โดยผ่านกระบวนการย่อยหรือการยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ที่มีส่วนประกอบของ ß-1,3-glucans หรือเป็นเหตุให้อิออนรั่วไหลโดยการสร้างรูหรือช่องที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ กลไกการจับจะเริ่มจากคิลเลอร์ท็อกซินจับกับ ß-1,6-glucan ตัวแรกที่บริเวณผนังเซลล์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่มีความรู้สึกไวโดยจะขึ้นกับชนิดของคิลเลอร์ท็อกซินบริเวณที่สารพิษจับในตอนแรกจะเป็นบริเวณที่เป็นกลูแคนหรือแมนแนน โดยปริมาณของกลูแคนหรือแมนแนนจะมีความสำคัญต่อการเข้าจับของคิลเลอร์ท็อกซินจากนั้นคิลเลอร์ท็อกซินจะทำปฏิกิริยากับตัวรับที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์โดยมีการสร้างช่อง ซึ่งจะเป็นสาเหตุให้โปรตอนและโพแทสเซียมไอออนเข้าภายในเซลล์ และจะทำให้

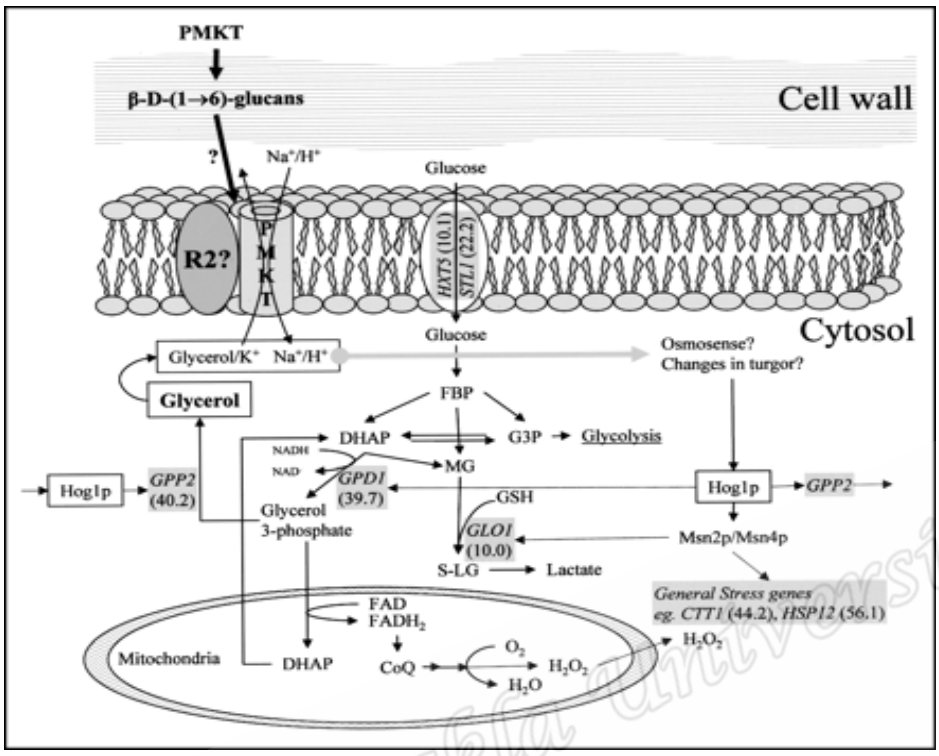
สารพลังงานสูง เช่น ATP ไหลออกนอกเซลล์ ซึ่งจะทำให้มีผลต่อเซลล์ที่มีความไวจนกระทั่งเซลล์ตายในที่สุด ดังรูปที่ 6 และ 7




**รูปที่ 6** การจับกันระหว่างคิลเลอร์ท็อกซิน K1 ของ *Saccharomyces cerevisiae* กับตัวรับที่บริเวณผนังเซลล์ จากนั้นคิลเลอร์ท็อกซิน K1 จะเคลื่อนที่ไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ และสร้างรูทำให้องค์ประกอบภายในเซลล์เคลื่อนที่ออกนอกเซลล์ จนกระทั่งทำให้เซลล์ตาย

ที่มา : Marquina *et al.* (2002)

Prince of Songkla University Pattani Campus




**รูปที่ 7** กลไกการทำปฏิกิริยาของคิลเลอร์ท็อกซินชนิด PMKT กระบวนการเริ่มแรกคิลเลอร์ท็อกซินที่เชื้อสร้างขึ้นจะเริ่มจับกับตัวรับตัวแรก ที่บริเวณ ß-D-(1→6)-glucans ของผนังเซลล์ จากนั้นคิลเลอร์ท็อกซินจะทำปฏิกิริยาโดยตรงหรือโดยอ้อม และตัวรับที่สอง (R2) คิลเลอร์ท็อกซินจะผ่านเข้าไปพร้อมกับไอออน ($H^+$, $K^+$ และ $Na^+$)

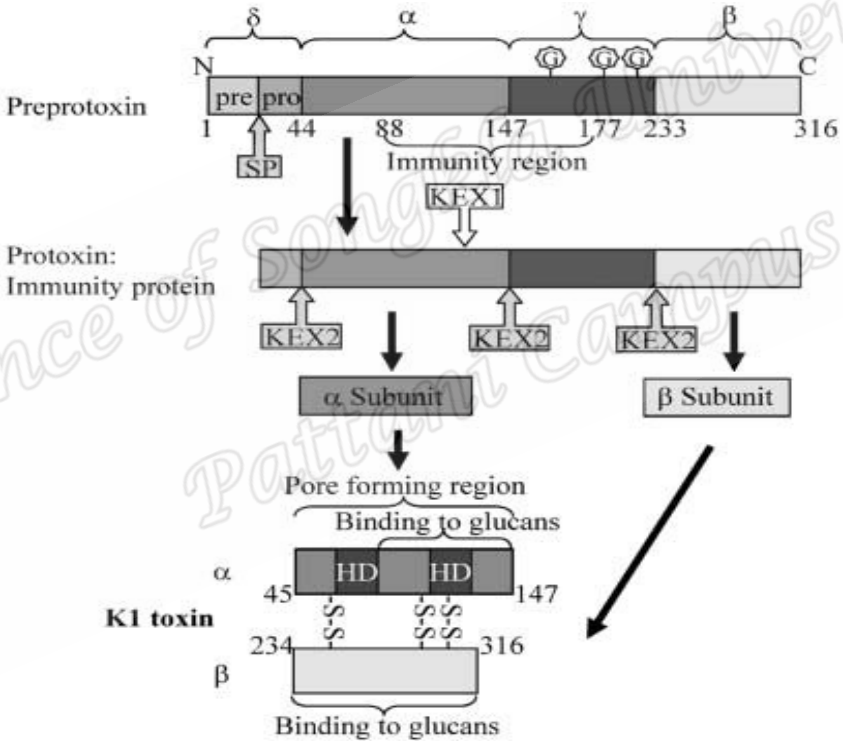
ที่มา : Santos *et al*. (2005)

*S. cerevisiae* มีการแยกสารพิษออกเป็น 3 กลุ่มหลัก ๆ คือ K1, K2 และ K28 ตามขนาดโมเลกุลของสารพิษที่หลั่งออกมาโดย dsRNA มีรหัสที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างคิลเลอร์ท็อกซินแต่คิลเลอร์ยีสต์ชนิดอื่นจะมีการสร้างสารพิษจากรหัสที่อยู่บน chromosomal DNA (Magliani *et al*., 1997) โดยคิลเลอร์ท็อกซินชนิด K1 จะมีน้ำหนักโมเลกุล 19 kDa ประกอบด้วย Disulfide-linked α-β dimer โดยซับยูนิต α จะมีขนาด 9.5 kDa และ β จะมีขนาด 9.0 kDa ซับยูนิตทั้งสองชนิดจะมีความสัมพันธ์กับประจุที่บรรจุอยู่และกรดอะมิโนที่ชอบน้ำ โดยประจุที่มีมากเกินของสารพิษจะอาศัยอยู่ใน β ซับยูนิต คิลเลอร์ท็อกซินชนิด K2 และ K28 จะมีคุณสมบัติที่น้อยกว่า K1 แต่จะมีกลไกต่าง ๆ ที่คล้ายคลึงกัน

การสร้างคิลเลอร์ท็อกซินของคิลเลอร์ยีสต์จะเริ่มจากการสังเคราะห์พอลิเปปไทด์สายเดียว ของ pre-protoxin ที่ประกอบด้วยอะมิโนที่มีปลายไม่ชอบน้ำ ภายในสายพอลิเปปไทด์จะ

Prince of Songkla University Pattani Campus

มีบริเวณที่คิลเลอร์ยีสต์สามารถต้านทานต่อท็อกซินที่สร้างขึ้นได้ เรียกกระบวนการนี้ว่า self-immunity (Marquina *et al*., 2002) จากนั้นจะมีเอนไซม์ signal peptidase (SP) ตัดบริเวณ pretoxin ได้พอลิแปปไทด์ที่เรียกว่า protoxin ซึ่งสามารถทนทานต่อท็อกซินที่สร้างขึ้นได้ เอนไซม์ killer expression protease (*KEX*) จะตัดตรงตำแหน่งของ protoxin และบริเวณอื่นเพื่อให้เกิดเป็นซับยูนิตของ α และ β จากนั้น α และ β จับกันเป็น dimer มีหมู่ sulfide เชื่อมต่อระหว่างกันเรียกว่า disulfide -linked α-β dimer โดย α และ β จะมีตำแหน่งที่ไปจับกับ glucan ที่บริเวณผนังเซลล์ของเซลล์ที่มีความว่องไว ดังรูปที่ 8




**รูปที่ 8** โครงสร้างของคิลเลอร์ท็อกซินชนิด K1

ที่มา : Marquina *et al.* (2002)

Prince of Songkla University Pattani Campus

นอกจากจะมีกลไกในการสร้างรูหรือช่องแล้วคิลเลอร์ท็อกซินยังมีกลไกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของเซลล์ที่มีความว่องไว โดยจะมีผลทำให้เซลล์ที่มีความว่องไวมีผนังเซลล์ที่อ่อนแอถูกทำลายง่าย และตายในที่สุด ดังรายงานของ Selvakumar *et al.* (2006) ได้ศึกษากิจกรรมการยับยั้งการสังเคราะห์ ß-1,3-glucan ของสายพันธุ์ *Candida* จากคิลเลอร์ท็อกซินชนิด HM-1 ซึ่งได้จากการผลิตของยีสต์ *Williopsis saturnus* var. *mrakii* IFO 0895 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมและสารแอนติบอดี้ชนิด Single-Chain variable-fragment (scFv) Anti-Idiootypic Antibody ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ คือ ตั้งแต่ความเข้มข้น 1.56-12.5 µg/ml พบว่า คิลเลอร์ท็อกซินชนิด HM-1 สามารถยับยั้งกิจกรรมการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของยีสต์ที่มีความว่องไว โดยสามารถเกิดกิจกรรมการสังเคราะห์ผนังเซลล์เพียงร้อยละ 25 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

Yamamoto *et al.* (1985) ศึกษาความเข้มข้นของคิลเลอร์ท็อกซินจาก *H. mrakii* ต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ในยีสต์ที่มีความว่องไวชนิด *S. cerevisiae* พบว่า คิลเลอร์ท็อกซินที่มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นจะสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ได้เพิ่มขึ้น

Izgu *et al*. (2007) ศึกษาความไวของ *Candida* spp. ต่อ panomycocin ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ Exo- ß-1,3-glucanase เป็นคิลเลอร์ท็อกซินจาก *Pichia anomala* NCYC 434 พบว่า panomycin มีกิจกรรมการยับยั้ง *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. glabrata*, *C. albican*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ซึ่งกิจกรรมการยับยั้งที่เกิดขึ้นจะต้องใช้ panomycin ที่มีความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

**2.4 แบคทีเรียก่อโรคในอาหาร**

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหาร มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปลักษณ์ของอาหารเป็นส่วนใหญ่ โดยมีจุลินทรีย์บางชนิดเมื่อปนเปื้อนในอาหารแล้วไม่ทำให้อาหารมีการเปลี่ยนแปลงใดๆ สำหรับจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในอาหารนั้น มีทั้งชนิดที่มีประโยชน์และที่ก่อโทษต่อมนุษย์ ประโยชน์ของจุลินทรีย์ เช่น การทำให้เกิดอาหารหมักชนิดต่างๆและการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ เป็นต้น ส่วนแบคทีเรียก่อโรคมีโทษทางอาหาร เช่น การทำให้อาหารเน่าเสีย และการทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ

**2.4.1 ลักษณะโดยทั่วไปของแบคทีเรีย**

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์พวกโพรคาริโอต (procaryote) จึงไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส แบคทีเรียมีขนาดเล็กมาก จึงมองไม่เห็นด้วยตาเปล่า โดยมีขนาดตั้งแต่ 0.5-5 ไมโครเมตร รูปร่างแบคทีเรียมีหลายแบบ ได้แก่ รูปกลม (coccus) รูปท่อน (rod) รูปเกลียว (spirillum) หรือบางชนิดอาจมีรูปร่างที่

Prince of Songkla University Pattani Campus

เปลี่ยนกลับไปกลับมาไม่แน่นอน (pleomorphism) สามารถพบแบคทีเรียได้ทั่วไปในธรรมชาติ รวมทั้งในอาหาร แบคทีเรียทำให้อาหารหลายประเภทเกิดการเน่าเสีย เช่น ผัก ผลไม้ แป้ง นม ไข่ เนื้อสัตว์ นอกจากนี้จะมีการสร้างสารพิษในอาหารด้วย เช่น สารพิษของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งแบคทีเรียสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. แบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) ชั้นของ peptidoglycan ของแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแผ่นหนาประมาณ 15-80 nm มีเพียงชั้นเดียว มีกรดไทโคอิก (teichoic acid) และกรดไทคูโรนิก (teichuronic acid) เป็นองค์ประกอบร่วมที่สำคัญ

2. แบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) โครงสร้างของผนังเซลล์ซับซ้อน ประกอบด้วยชั้นบางของ peptidoglycan อยู่ชั้นในสุด หนาประมาณ 2 nm และหุ้มด้วยชั้นของไลโพพอลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) และไลโพโปรตีน (lipoprotein) มีช่องว่างระหว่างผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ (ศุภยางค์, 2546) นอกจากนี้องค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรียทั้งสองชนิดจะมีความแตกต่างกัน ดังตารางที่ 5

**ตารางที่ 5** เปรียบเทียบส่วนประกอบภายในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

| ส่วนประกอบของผนังเซลล์ | Gram-positive | Gram-negative |
|---|---|---|
| Peptidoglycan | ร้อยละ 40-50 | ร้อยละ 5-15 |
| Teichoic acid | มี | ไม่มี |
| Lipopolysaccharide | ไม่มี | มี |
| Lipid | ร้อยละ 2 | ร้อยละ 20 |
| Protein | ร้อยละ 10 | ร้อยละ 60 |

ที่มา : ศุภยางค์ (2546)

**2.4.2 โรคอาหารเป็นพิษ**

โรคอาหารเป็นพิษ หมายถึง โรคที่เกิดจากการบริโภคอาหารซึ่งส่วนมากมีสาเหตุจากจุลินทรีย์ อาการของโรคอาหารเป็นพิษที่รู้จักกันทั่วไป คือ ปวดท้อง ท้องเสีย และบางครั้งอาจมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน และอาจมีไข้ร่วมด้วย การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษ ตามปกติจะต้องมีผู้ป่วยที่อยู่ในเหตุการณ์เดียวกันบริโภคอาหารชนิดเดียวกัน และเกิดอาการป่วยคล้าย ๆ กันตั้งแต่สองคนขึ้นไป

โรคอาหารเป็นพิษเกิดจากการบริโภคจุลินทรีย์หรือสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น เชื้อโรคอาหารเป็นพิษอาจติดมากับตัวอาหารเองหรือปนเปื้อนผ่านมากับอุจจาระของคนและสัตว์เลือดอุ่น

Prince of Songkla University Pattani Campus

สู่สิ่งแวดล้อม ผ่านการสัมผัสกับอาหารอย่างไม่ถูกสุขลักษณะ แล้วเข้าสู่ร่างกายหรือทางเดินอาหารของมนุษย์

**แบคทีเรียในอาหารที่ก่อให้เกิดโรค** (นรีกุล, 2536; นันทนา, 2537; วราวุฒิ, 2538)

**1. *Escherichia coli***

เป็นแบคทีเรียรูปร่างเป็นแท่งตรง (rod shape) ติดแกรมลบ ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic bacteria) เคลื่อนที่ได้โดยใช้ peritrichous flagella ขึ้นได้บนอาหารง่ายๆ โคโลนีบนอาหาร NA (nutrient agar) ผิวเรียบ ชื้น ผิวมัน สีเทา โคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร พบได้ทั่วไปในดิน น้ำ และลำไส้ของคนและสัตว์โดยไม่ทำให้เกิดโรค แต่มีบาง serotype ที่ทำให้เกิดโรคในคนได้ คือ โรคอุจจาระร่วง (diarrheal diseases) ตามปกติถูกใช้เป็นเชื้อที่บ่งชี้ถึงการปนเปื้อนที่เกี่ยวเนื่องกับระบบขับถ่าย (อุจจาระ) ในอาหารและเครื่องดื่ม

**2. *Salmonella sp.***

เป็นแบคทีเรียก่อโรคภายหลังบริโภคอาหารเข้าไปที่เรียกว่า food infection ติดสีแกรมลบ โคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร ลักษณะกลม ขอบเรียบ เป็นมัน ไม่มีสี (ไม่ย่อยน้ำตาลแลกโตส) ไม่ทึบแต่ไม่โปร่งแสง บางสายพันธุ์มีโคโลนีลักษณะเป็นเมือก ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ บางชนิดมีแคปซูล บางชนิดมีชีวิตในอาหารแห้งได้นาน

**3. *Staphylococcus aureus***

เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม (cocci) มักอยู่เป็นกลุ่ม ๆ คล้ายองุ่น ติดสีแกรมบวก เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาเกือบทุกชนิดที่มีพีเอชระหว่าง 4.8 – 7.4 โคโลนีบนวุ้นมีลักษณะกลม นูน เป็นมันวาว สีเหลืองทอง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1–2 มิลลิเมตร เป็นสาเหตุทำให้อาหารเป็นพิษ ซึ่งเรียกว่า food poisoning เพราะแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สร้างสารพิษในอาหารได้ และสร้างปฏิกิริยา coagulase positive แต่ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ไม่ได้

**4. *Baciilus cereus***

เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง เซลล์มักเรียงเป็นลูกโว่ ติดสีแกรมบวก สร้างสปอร์และเคลื่อนที่ได้ รูปร่างโคโลนีมีการสร้าง hemolysin toxin lytic enzyme ปล่อยออกสู่นอกเซลล์ ทำให้เกิดโรค food poisoning ซึ่งมีระยะพักของโรคสั้นมาก มักจะปนเปื้อนกับข้าวผัดที่เก็บทิ้งไว้ในที่อุ่น แบคทีเรียชนิดนี้จะผลิตท็อกซิน พบในอาหารกระป๋องพวกถั่ว พบอยู่ตามธรรมชาติในดิน น้ำ และอากาศ

Prince of Songkla University Pattani Campus