1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การที่ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญและสนใจเกี่ยวกับอาหารมากขึ้นทั้งด้านการผลิต ความปลอดภัยจากเชื้อโรคและสารเคมีที่นำมาใช้ถนอมอาหาร ทำให้มีการศึกษาและพัฒนาเกี่ยวกับการผลิต และมีการใช้สารถนอมอาหาร (preservative) ที่ได้จากธรรมชาติ กันมากขึ้น ซึ่งวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้กันมาก คือ การใช้เชื้อจุลินทรีย์หรือสารยับยั้งที่จุลินทรีย์เหล่านี้สร้างขึ้นเพื่อยืดอายุอาหารให้เก็บได้นานขึ้นและเพิ่มความปลอดภัยให้ผู้บริโภคมากขึ้น แบคทีเรียแลกติกเป็นเชื้อที่ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอาหารมายาวนาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารหมักพื้นเมือง โดยช่วยให้รสชาติและลักษณะของอาหารหมักดีขึ้น ทั้งยังสามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ ไดอะซิทิล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน ในบรรดาสารยับยั้งเหล่านี้แบคเทอริโอซินได้รับความสนใจศึกษามาก เนื่องจากมีข้อดีคือ เป็นสารโปรตีนสามารถถูกย่อยได้โดยน้ำย่อยในทางเดินอาหารมนุษย์ ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ไม่ทำให้รสชาติของอาหารเปลี่ยนแปลง และใช้ได้ง่าย (Fiorentini *et al*., 2001)

การนำแบคทีเรียแลกติกมาใช้นั้นอาจทำได้โดยการเติมเชื้อในอาหารขณะที่ทำการผลิตโดยตรง เช่น การหมักผัก ผลไม้ เนื้อ นม หรือนำสารที่เชื้อผลิตได้มาใช้ เช่น การเติมกรดอินทรีย์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ลงในอาหารพวกเนื้อสัตว์เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อ *Escherichia coli* O157 : H7 (Cutter and Siragusa, 1994) การใช้ nisin ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินเพียงชนิดเดียวที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในอาหาร จำหน่ายในรูปกึ่งบริสุทธิ์โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Nisaplin® (Soomro *et al*., 2002) ในอาหารประเภท ผลิตภัณฑ์นม และ อาหารกระป๋องต่างๆ เนื้อสัตว์ (Flores and Alegre, 2001; Elotmani and Assobhei, 2003) ส่วนแบคเทอริโอซินชนิดอื่นๆ นั้นยังอยู่ในระหว่างการศึกษาและ

พัฒนา ทั้งด้านการผลิต คุณสมบัติต่างๆ การนำไปใช้ประโยชน์ และการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิต

อย่างไรก็ตามการใช้เชื้อแบคทีเรียแลกติกในอาหารโดยตรงหรือการนำสารยับยั้งที่เชื้อผลิตได้มาใช้ยังมีปัญหา กล่าวคือ การใช้เชื้อแบคทีเรียแลกติกเป็นเชื้อเริ่มต้นในอาหารต่างๆนั้นเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้ค่อนข้างมากทำให้ผลผลิตแต่ละครั้งมีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ (Mcmullen and stiles, 1996; Ryan *et al*., 1996) การใช้กรดอินทรีย์หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีข้อเสีย คือ บางครั้งทำให้รสชาติ กลิ่น สี ของอาหารบางชนิดเปลี่ยนแปลงไปไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ทั้งยังมีข้อจำกัดเรื่องระดับความเข้มข้นที่ใช้ซึ่งต้องไม่มากเกินไป (Standard and Wood, 1983) ส่วนข้อจำกัดของ nisin คือออกฤทธิ์ได้ดีเฉพาะในภาวะที่เป็นกรดทำให้ไม่สามารถนำไปใช้ในอาหารที่มี pH เป็นกลางหรือเป็นด่างได้ มีความสามารถในการซึมผ่านไม่ดีในอาหารที่มีส่วนประกอบของน้ำน้อย และไม่สามารถทำลายเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ (Gould, 1996)

จากข้อจำกัดดังกล่าว จึงทำให้ต้องมีการศึกษาเพื่อพัฒนาคุณสมบัติของสารยับยั้งจากเชื้อแบคทีเรียแลกติก ที่จะมาช่วยในการแก้ปัญหาข้อจำกัดของสารยับยั้งที่มีอยู่ในปัจจุบัน โดยการศึกษาครั้งนี้ต้องการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทย ในการผลิตสารยับยั้งต่างๆ ในสภาวะที่แตกต่างกัน ความสามารถของสารในการทำลายเชื้อแบคทีเรียอื่น และสมบัติต่างๆ ของสารยับยั้งที่ผลิตได้เพื่อเป็นแนวทางในการนำแบคทีเรียเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ด้านอาหารต่อไป

ตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปและความสำคัญของ *Lactobacillus*

1.1 ลักษณะทั่วไป

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างเป็นแท่งสั้นหรือแท่งยาว (Hammes and Vogel, 1995) ไม่เคลื่อนที่ ถ้ามีการเคลื่อนที่จะใช้แฟลกเจลลารอบตัว ไม่สร้างเอนไซม์ catalase แต่อาจมีบางสายพันธุ์สลายเปอร์ออกไซด์ โดยใช้

เอนไซม์ pseudocatalase ส่วนใหญ่ไม่สร้างสารสี ถ้าสร้างจะมีสีเหลือง ส้ม จนถึงสีแดงอิฐ หรือสีสนิม ต้องการอาหารในการเติบโตซับซ้อน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตโดยทั่วไป 30-40 °ซ pH ที่เหมาะสมโดยปกติ 5.5-5.8 หรือต่ำกว่า ส่วนใน pH ที่เป็นกลางหรือเริ่มเป็นด่างทำให้ระยะแรกของการเติบโต (lag phase) ยาวขึ้นหรือการเติบโตลดลง แบคทีเรียพวกนี้พบในน้ำนม ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์ เนื้อ น้ำ น้ำเสีย เบียร์ ไวน์ ผลไม้ น้ำผลไม้ ผักดอง มีเมตาบอลิซึมแบบ fermentative โดยการสร้างกรดแลกติกและสารอื่นๆ ออกมาเป็นผลิตผลพลอยได้ (Suskovic *et al*., 2001)

De Vuyst และ Vandamme (1994b) ได้แบ่ง *Lactobacillus* ตามลักษณะการใช้และการสร้างสารอาหารออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1. Obligately homofermentative lactobacilli เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกได้ประมาณ 90 % จากกลูโคส แต่ไม่เกิดแก๊ส การใช้น้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะใช้โดยผ่าน Embden-Meyerhof-Parnas (EMB) pathway มีเอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ fructose-1,6-biphosphate-aldolase แต่จะไม่มีเอนไซม์ phosphoketolase และไม่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคเนตและเพนโตส ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus, L. delbruekii, L. helveticus, L. jenseni, L. amylovorus* และ *L. ruminis*

2. Facultatively heterofermentative lactobacilli แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถหมักทั้งน้ำตาลเฮกโซสและน้ำตาลเพนโตสได้ผลผลิตเป็นกรดแลกติกและ กรดอะซีติก มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ aldolase และ phosphoketolase ได้แก่ *L. plantarum, L. pentosus*. *L. casei, L. sake* และ *L. rhamnosus*

3. Obligately heterofermentative lactoacilli สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสได้โดยใช้ phosphogluconate pathway ส่วนน้ำตาลเพนโตจะเข้าสู่ pathway นี้เช่นเดียวกัน ผลผลิตที่ได้คือ กรดแลกติก กรดอะซิติก แอลกอฮอล์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Hammes and Vogell, 1995) ได้แก่ แบคทีเรีย *L. brevis, L. buchneri, L. bifermentans, L. cinfusus* และ *L. hilgardii* เป็นต้น

1.2 ความสำคัญ

Lactobacillus มีความเกี่ยวข้องกับมนุษย์มาช้านานไม่เพียงแต่ในอาหารเท่านั้น แต่พบว่ายังมีความสำคัญด้านอื่นๆ ด้วย สามารถสรุปความสำคัญได้ดังนี้

1. เพิ่มคุณภาพของอาหารหมัก เพราะความสามารถในการเปลี่ยน lactate ให้เป็น กรดแลกติก จึงเป็นเชื้อที่ช่วยในการหมักพืชผัก ผลิตภัณฑ์นม เนื้อ และเครื่องดื่มต่างๆ (Tserovska *et al*., 2002) ทั้งยังสามารถผลิตสารที่ช่วยเพิ่ม กลิ่น รส ให้อาหารหมักได้ด้วย (Hugenholtz *et al*., 2000)

2. สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ สารยับยั้งได้แก่ กรดอินทรีย์ คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิทิล และแบคเทอริโอซิน ซึ่งมีการนำไปใช้ในอาหารอย่างกว้างขวาง (Ko and Ahn, 2000)

3. ควบคุมสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร (Suskovic *et al*., 2001) โดยการ

3.1 ผลิตกรดทำให้ pH ในทางเดินอาหารต่ำลง เชื้อก่อโรคที่ชอบ pH เป็นกลางไม่สามารถเจริญได้ และผลิตสารยับยั้ง ต่างๆ มาทำลายเชื้อในทางเดินอาหารด้วย

3.2 แย่งอาหารจากเชื้อก่อโรค

3.3 แย่งที่จับกับแบคทีเรียก่อโรคบนผนังทางเดินอาหาร

4. กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย มีรายงานว่า การได้รับแบคทีเรียแลกติกทางปาก สามารถกระตุ้นให้ร่างกายผลิต antibody ทั้ง local และ circulatory antibody, gamma interferon, macrophage และ natural killer cells (Herich and Levkut, 2002)

5. ช่วยลดระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือด มีการศึกษาพบว่า คนที่ดื่มนมที่มี *Lactobacillus* ในปริมาณมากระยะหนึ่งพบว่าระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดลดลง กลไกการลดอาจเกิดจาก เชื้อมีการใช้โคเลสเตอรอล โคเลสเตอรอลถูกดูดซับอยู่ที่ผนังเซลล์ของ *Lactobacillus* และเชื้อยับยั้งการจับของไขมันกับน้ำดี ทำให้ไขมันถูกย่อยได้น้อยลง (Pereira and Gibson, 2002)

6. ลดความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งในลำไส้ ซึ่งยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด แต่อาจเนื่องจากเชื้อไปมีผลในการเปลี่ยนแปลง metabolites ของแบคทีเรียอื่นๆ ในลำไส้ เปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมีและกายภาพของลำไส้ จับและย่อยสลายสารก่อมะเร็งโดยตรง สร้างสารที่ต่อต้านการเกิดก้อนทูมและเซลล์มะเร็ง พร้อมทั้งกระตุ้นให้ร่างกายมีภูมิคุ้มกันต่อสารก่อมะเร็งเพิ่มมากขึ้น (Rafter, 2002)

2. แบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร

แบคทีเรียที่ทำให้เป็นโรคเนื่องจากการบริโภคอาหารที่มีแบคทีเรียเป็นสาเหตุ ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าว ได้แก่

2.1 ***Staphylococcus aureus*** (มัทนา, 2538)

ลักษณะ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ เจริญที่อุณหภูมิ 6-46 °ซ เจริญได้ดีในอาหารที่มี pH ตั้งแต่ 4.2–9.3 พบได้ทั่วไปตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น จมูก ผิวหนัง แผล และสิว เป็นต้น ถ้าคนงานมีสุขลักษณะไม่ดีเชื้อจะปนเปื้อนเข้าไปในผลิตภัณฑ์อาหารมาก โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์แช่แข็งพร้อมบริโภค

อาการของโรค เนื่องจากเชื้อนี้สามารถสร้างสารพิษชนิด A, B, C, D และ E เมื่อบริโภคสารพิษดังกล่าวเข้าไปทำให้มีอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียนและท้องเดิน อาการนี้จะหายไปเองภายหลังจากถ่ายเอาเชื้อออกหมดแล้ว แต่ในรายที่เป็นเด็กหรือผู้ที่อ่อนแอพิษอาจรุนแรงและถึงแก่ชีวิตได้

2.2 ***Salmonella*** (สุมาลี, 2535)

ลักษณะ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ไม่สร้างสปอร์ สามารถย่อยสลายกลูโคสได้กรดกับก๊าซ แต่จะไม่ย่อยแลกโตสหรือซูโครส พบในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ สัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน

อาการของโรค โรคที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่มี *Salmonella* เข้าไปในร่างกายที่พบได้บ่อยที่สุดคือ โรคซาลโมเนลโลซิส นอกจากนี้คือ โรคไทฟอยด์ และพาราไทฟอยด์

ซาลโมเนลโลซิส มีระยะฟักตัว 12–16 ชั่วโมง จะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย หนาวสั่น อุจจาระเป็นน้ำมีสีเขียว อ่อนเพลีย มีไข้ปานกลาง

ไทฟอยด์ มีระยะฟักตัว 7-15 วัน มีอาการวิงเวียน ปวดหัว มีอาการไข้เพิ่มขึ้นตามลำดับ ปวดท้อง ท้องผูก หรือท้องเสีย การอักเสบของเนื้อเยื่อในต่อมน้ำเหลืองบริเวณลำไส้เล็ก ทำให้เกิดการเน่าเปื่อย หรือเกิดการตกเลือดบริเวณดังกล่าว ซึ่งอาจทำให้ถึงแก่ชีวิตได้

พาราไทฟอยด์ จะมีอาการคล้ายกับเป็นโรคไทฟอยด์มากแต่มีความรุนแรงน้อยกว่า

2.3 ***Escherichia coli*** (วิลาวัณย์, 2539)

ลักษณะ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนตรง เรียงตัวเดี่ยวๆ หรือเป็นคู่ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา หรือไม่เคลื่อนที่ พบในนม ผัก และเนื้อ กลุ่มที่ทำให้อาหารเป็นพิษเรียกว่า EEC (Enteropathogenic *E. coli*) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) 2 แบบคือ ทนความร้อนและไม่ทนความร้อน จะเกิดอาการหลังจากกินอาหารเป็นเวลา 8-44 ชั่วโมง โดยเฉลี่ย 26 ชั่วโมง ทำให้เกิดอาการท้องร่วง อุจจาระเป็นน้ำซาวข้าว อาเจียน คล้ายอหิวาตกโรค

กลุ่มที่ 2 เป็นสายพันธุ์ที่สร้างไซโตทอกซิน (cytotoxin) อาการจะเกิดขึ้นหลังจากรับประทานอาหารที่มีแบคทีเรียเหล่านี้เข้าไป 8-24 ชั่วโมงโดยเฉลี่ย 11 ชั่วโมง พวกนี้เจริญในลำไส้ใหญ่ รุกรานหรือแทรกเข้าไปในเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ใหญ่ ทำให้เกิดอาการของโรค คือ มีไข้ หนาวสั่น ปวดศรีษะ ปวดท้อง ท้องร่วง ถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ อาการคล้ายโรคบิด

2.4 *Micrococcus luteus* (วิลาวัณย์, 2539)

ลักษณะ เป็นเซลล์รูปกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-3.5 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก ต้องการออกซิเจนในการเติบโต อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโต 25-35 °ซ ทนเกลือสูงถึง 5 % สามารถสร้างสารสีเหลืองเมื่อเติบโตบนอาหารทำให้ผิวหน้าอาหารเปลี่ยนสีไป พบได้ทั่วไปในดิน น้ำจืด ผิวหนังคนและสัตว์อื่นๆ

3. การสร้างสารยับยั้งของ *Lactobacillus*

จากที่กล่าวมาข้างต้น แบคทีเรีย *Lactobacillus* สามารถยับยั้งเชื้อชนิดอื่นๆ ได้โดยการสร้างสารยับยั้งต่างๆ แล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ ซึ่งสารเหล่านี้ได้แก่

3.1 กรดอินทรีย์

ได้แก่ กรดแลกติก และกรดอะซีติก ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการใช้สารอาหารของเชื้อแบคทีเรียแลกติก การยับยั้งมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการละลายของกรดเหล่านี้ในรูป non-dissociated form ที่สามารถผ่านเซลล์เมมเบรนเข้าไปทำให้ไซโตพลาสซึมของเซลล์เป้าหมายมีสภาพเป็นกรด รบกวนระบบขนส่งพลังงานและการขนส่งสารอาหารเข้าสู่เซลล์ ทำให้เซลล์ตายได้ (Goncalves *et al*., 1997; Dorsa *et al.,*

1997;Tamblyn and Conner, 1997) แต่เชื้อรา ยีสต์ หรือแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดได้เกือบทั้งหมดจะทนต่อการถูกทำลายโดยกรดและสามารถมีชีวิตอยู่ในสภาวะที่ pH ต่ำ (De Vuyst and Vandamme, 1994b)

3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

เนื่องจากแบคทีเรีย *Lactobacillus* ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ catalase ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำ จึงทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เชื้อนี้สร้างขึ้นถูกสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ (Daeschel, 1989)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อาจออกฤทธิ์ยับยั้งหรือ ทำลายเชื้อแบคทีเรียก็ได้ขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย และปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่างของอาหาร โดยเมื่อมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แพร่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วมีแสงสว่างหรือออกซิเจนมาเป็นตัวกระตุ้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะกลายเป็นสารอันตราย เช่น hydroxyl radicle ซึ่งเป็นสาร ออกซิแดนซ์ที่รุนแรง สามารถทำลาย กรดนิวคลีอิก โปรตีน และและชีวโมเลกุลอื่นๆของสิ่งมีชีวิตได้ (Juven and Pierson, 1996; Ocana *et al*., 1999) นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถทำให้ระบบต่างๆ ภายในเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงโดยยับยั้งขบวนการขนส่งสาร ขบวนการหายใจ และการเจริญเติบโตของเชื้อได้อีกด้วย (Wofson and Sumner, 1994)

Ocana และคณะ (1999) พบว่าเมื่อนำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *L. crispatus* F117 ซึ่งแยกได้จากช่องคลอดสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นเชื้อที่มี toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) ที่ทำให้เกิด toxic shock syndrome ในผู้หญิงที่ใช้ผ้าอนามัยแบบสอดได้แต่ไม่ยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินปัสสาวะชนิดอื่นๆ คือ *Enterococcus* sp., Group B *Streptococcus* sp., *Streptococcus agalactiae* ATCC 1022., *E. coli, Klebsiella* และ *Candida* ซึ่งการยับยั้งที่เกิดขึ้นเป็นผลจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถทดสอบได้โดยการเติมเอนไซม์ catalase ลงใน culture broth พบว่าไม่มีการยับยั้งเกิดขึ้น

3.3 อะซีทัลดีไฮด์ (Acetyldehyde)

เป็นสารที่ได้จากกระบวนการย่อยคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียแลกติก มีจำนวนเพียงเล็กน้อยซึ่งจะมีผลต่อกลิ่นของอาหาร และยังมีผลยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ด้วย พบ

ว่าอะซีทัลดีไฮด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกที่ความเข้มข้น 10-100 ppm สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *S. typhimurium* ได้ (De Vuyst and Vandamme, 1994b)

3.4 ไดอะซิทิล (Diacetyl)

เป็นสารที่เกิดจากการใช้ซิเตรทของแบคทีเรียแลกติกบางชนิด ในนมหรือหางนม ซึ่งมีซิเตรทเป็นองค์ประกอบเกิดขึ้นทั้งการหมักแบบมีและไม่มีอากาศ มีความสำคัญในการเพิ่ม กลิ่น รส ที่ดีให้อาหาร มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรามากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยไดอะซิทิลจะไปรบกวนการใช้ arginine ของเชื้อแกรมลบ ตัวอย่างเชื้อที่ถูกยับยั้งได้โดยไดอะซิทิล เช่น *E. coli*, *S. anatum*, *Aeromonas hydrophila* และ *Yersinia enterocolitica* (De Vuyst and Vandamme, 1994b)

3.5 คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)

เกิดจากการหมักน้ำตาล hexose โดย heterofermentative lactobacilli (De Vuyst and Vandamme, 1994b) มีผลต่อรสชาติ กลิ่น และเนื้อสัมผัสของอาหารหมัก ส่วนการยับยั้งจุลินทรีย์นั้นจะออกฤทธิ์ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยการเข้าแทนที่โมเลกุลของออกซิเจนทำให้เกิดการทำลายผนังเซลล์ คาร์บอนไดออกไซด์ในรูป dissociated form จะไปดึงส่วนประกอบของเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์หรือออแกเนลล์มีโครงร่างที่เปลี่ยนไปทำให้คาร์บอนไดออกไซด์สามารถเข้าสู่เซลล์ ได้ทำให้ pH ภายในเซลล์ของแบคทีเรียลดลงจนวิกฤติ และสามารถทำให้เซลล์แตกได้เนื่องจากความดันภายในเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็ว ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำลายเซลล์แบคทีเรียคือ ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (Desmazeaud, 1996; Shimoda *et al*., 1998)

3.6 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคเทอริโอซิน เป็นสารยับยั้งอีกชนิดหนึ่งที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus* นอกเหนือจากสารยับยั้งต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น Tagg และคณะ (1976) เป็นผู้เริ่มต้นในการกำหนดลักษณะของแบคเทอริโอซินไว้ 6 ข้อ คือ

1. เป็นสารโปรตีน จึงสามารถทำลายได้โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน

2. ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ (bacteriostatic) และทำลายแบคทีเรีย (bactericidal) ได้

3. มีบริเวณจำเพาะ (specific binding site) ในการจับกับแบคทีเรียก่อโรคต่างๆ

4. ยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินโดยส่วนใหญ่จะพบว่าอยู่บริเวณพลาสมิด

5. แบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซินออกมานอกเซลล์จะทำให้เซลล์ตายแต่มีแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินในระยะ log ดังนั้นจึงไม่มีการตายของเซลล์

6. แบคเทอริโอซินออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเท่านั้น

Klaenhammer (1993) ได้แบ่งกลุ่มแบคเทอริโอซินออกเป็น 4 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 Lantibiotic มีขนาดเล็กเป็นสายเปปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 5 kDa ต่างจากแบคเทอริโอซินอื่นๆ คือประกอบด้วย didehydro amino acids และ thioether amino acid สามารถแยกออกได้เป็นกลุ่มย่อยจากลักษณะโครงสร้างที่เป็นรูปวงแหวนดังนี้

1.1. มีรูปร่างเป็นเกลียว มีมวลโมเลกุล 2,164-3,488 dalton และมีประจุบวก 2-7 ประจุ

1.2. ลักษณะรูปร่างเป็นก้อนกลม มีมวลโมเลกุล 1,954-2,041 dalton อาจมีประจุเป็นลบ ได้แก่ nisin และ lactocin 481

กลุ่มที่ 2 แบคเทอริโอซินขนาดเล็กเช่นกัน แต่ส่วนใหญ่รูปร่างกลม มวลโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa สายเปปไทด์จะไม่มีกรดอะมิโนกลุ่มกลุ่ม lantibiotic สามารถทนความร้อนได้ปานกลาง (80 °ซ) ถึงมาก (120 °ซ) ได้แก่ diplococcin, lactococcin A และ lactococcin F

กลุ่มที่ 3 แบคเทอริโอซินที่มีขนาดใหญ่ มวลโมเลกุลมากกว่า 30 kDa เป็นโปรตีนที่ทนความร้อน ได้แก่ helveticin J และ caseicin 80

กลุ่มที่ 4 เป็นแบคเทอริโอซินที่มีความซับซ้อน ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ plantaricin S และ lactocin 27

สำหรับแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อกลุ่ม Lactobacilli ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มที่ 2 (Bogovic-Matijasic *et al*., 1998) มีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 เช่น lactocin S และ plantaricin C (Mortvedt-Abildgaard *et al*., 1995; Gonzalez *et al*., 1994)

nisin เป็นแบคเทอริโอซินชนิดแรกและเดียวที่มีการผลิตระดับอุตสาหกรรมและได้รับอนุญาตให้ใช้เป็นสาร preservative ในอาหารได้เป็นครั้งแรกเมื่อปี 1928 และในปัจจุบันมีการอนุญาตให้นำมาใช้ในประเทศต่างๆ มากกว่า 40 ประเทศ โดยนำมาใช้ในรูปของ nisin กึ่งบริสุทธิ์ (Parente and Ricciardi, 1999) การที่ nisin ได้รับการอนุญาตจากองค์อนามัยโลก (World Health Organization :WHO) ให้ใช้เป็นสารกันเสียในอาหารได้เนื่องจากมีคุณสมบัติคือ ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้หลายชนิด มีความคงตัวที่ pH เป็นกรด ทนต่อความร้อนได้สูง และถูกย่อยได้โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนในทางเดินอาหารของมนุษย์ (Kato *et al*.,1994)

nisin อาจอยู่ในรูปของ nisin A หรือ nisin Z แล้วแต่สายพันธุ์ของเชื้อที่ผลิต nisin A มีน้ำหนักโมเลกุล 3,354 dalton ประกอบด้วย กรดอะมิโนที่เชื่อมต่อกันเป็นสายเปปไทด์ทั้งหมด 34 ตัว ในจำนวนนี้มีกรดอะมิโนพิเศษที่ไม่พบในสายเปปไทด์โดยทั่วไปอยู่ด้วย ได้แก่ lanthionine 1 ตัว β-methyllanthionine 4 ตัว 2-dehydro alanine 1 ตัว ส่วน nisin Z มีกรดอะมิโนต่างจาก nisin A เพียงตำแหน่งเดียว คือ มี asparagine แทนที่ histidine ในตำแหน่งที่ 27 (De Vuyst and Vandamme, 1994a)

ต่อมาการศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลกติกได้พัฒนาขึ้นเรื่อยๆ โดยส่วนใหญ่แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus* จะมีสมบัติบางประการคล้ายกับแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากกลุ่มแบคทีเรียแลกติกโดยส่วนใหญ่ คือ เป็นสารพวกโปรตีนไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่างๆ และทนความร้อน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ชนิดและสมบัติบางประการของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus*

แบคเทอริโอซิน	คุณสมบัติ	เอกสารอ้างอิง
Lactocin B	เป็นสารโปรตีน, ทนความร้อน	Barefoot and Klaenhammer (1983)
Lakacin A	เป็นสารโปรตีน, ทนความร้อน	Schllinger and Lucke (1989)
Plantaricin 149	เป็นสารโปรตีน, ทนความร้อน	Kato *et al.,* (1994)
Plantaricin S	เป็นสาร glycolipoprotein, ทนความร้อน	Jimenez-Diaz *et al*., (1993)
Plantaricin LC 74	เป็นสารโปรตีน	Rekhif *et al.*,(1994)
Plantaricin UG1	เป็นสารโปรตีน, ทนความร้อน	Enan *et al*., (1996)
Pediocin AcH	เป็นสารโปรตีน, ทนความร้อน	Ennahar *et al*.,(1996)
Sakacin P	เป็นสารโปรตีน	Eijsink *et al.*, (1996)
Sactocin A	เป็นสารโปรตีน	Contreras *et al.*,(1997)
Fermencin B	เป็นสารโปรตีน, ทนความร้อน	Yan and Lee (1997)
Acidocin A, B	เป็นสารโปรตีน, ทนความร้อน	Bogovic-Matijasic *et al.*, (1998)

การออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus* โดยส่วนใหญ่จะออกฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย (bactericidal) ตัวอย่างแบคเทอริโอซินดังกล่าว ได้แก่ lactacin B (Barefoot *et al.,* 1994) plantaricin 149 (Kato *et al*., 1994) plantaricin C (Gonzalez *et al.,* 1994), plantaricin UG1 (Enan *et al*., 1996) acidocin B (Bogovic - Matijasic *et al.,*1998) แต่ยังมีแบคเทอริโอซินส่วนน้อยที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (bacteriostatic)ได้แก่ plantaricin LC74 (Rekhif *et al*., 1994) และแบคเทอริโอซินซึ่ง

ผลิตจากเชื้อ *L. helvesticus* CNRZ450 ซึ่งส่วนใหญ่พบว่าการออกฤทธิ์จะจำเพาะในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นของผนังเซลล์ (cell wall) ซึ่งมีเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) เป็นส่วนประกอบหลักเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ลักษณะเป็นร่างแห ทำให้แบคเทอริโอซินเข้าไปสู่ชั้นเซลล์เมมเบรน (cytoplasmic membrane) ได้ง่าย ในชั้นนี้ประกอบด้วยสารพวกฟอสโฟไลปิด (phospholipid) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ กรดไขมันและหมู่ฟอสเฟต โดยหมู่ฟอสเฟตทำให้บริเวณเมมเบรนมีประจุลบ ในขณะที่แบคเทอริโอซินโดยส่วนใหญ่พบว่ามีประจุเป็นบวก ทำให้เกิดการจับกันของประจุลบและประจุบวกโดย electrostatic attractions ทำให้หน้าที่ของชั้นเมมเบรนเปลี่ยนแปลงไป มีการสูญเสียความสามารถในการควบคุมการซึมผ่านของสารต่างๆ รบกวนการขนส่งสารที่ต้องอาศัยพลังงาน ทำให้เกิดรูบนเซลล์เมมเบรน ของเหลวต่างๆที่เป็นส่วนประกอบภายในเซลล์เมมเบรน และสารต่างๆ เช่นกรดอะมิโน จะไหลออกมานอกเซลล์ ทำให้เซลล์ตาย (Okereke and Montville, 1992; Jack *et al*., 1995; Muriana, 1996)

มีการศึกษาการออกฤทธิ์ของ lactacin B ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. johnsonii* VPI11088 ต่อเชื้ออินดิเคเตอร์คือ *L. delbrueckii*, *L. johnsonii* และ *E. feacalis* พบว่า lactacin B สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เป้าหมายมีการสูญเสีย K^+ ออกนอกเซลล์ มีการเกิด depolarization ของเซลล์เมมเบรน ทำให้มีรูเกิดขึ้น เกิด hydrolysis ของ ATP ส่งผลให้มีการรั่วออกของ inorganic phosphate ทำให้ ATPในเซลล์เสียสมดุลและเซลล์ตายในที่สุด (Barefoot *et al.,* 1994)

นอกจากนี้พบว่าการทำลายเซลล์แบคที่เรียเป้าหมายของแบคเทอริโอซินบางชนิดนั้น มีทั้งที่ทำให้เซลล์ตายโดยมีการแตก (lysis) และไม่มีการแตกของเซลล์ ถ้ามีการแตกของเซลล์เกิดขึ้นพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ลดลง แต่ถ้าค่าการดูดกลืนแสงไม่ลดลงแสดงว่าเซลล์ตายโดยไม่มีการแตกของเซลล์ การแตกและไม่แตกของเซลล์เป้าหมายมีกลไก primary effects เหมือนกันคือ แบคเทอริโอซินจะทำให้เกิดรูที่เซลล์เมมเบรนดังที่กล่าวมาข้างต้น แต่จากนั้นจะมี secondary effects ที่แตกต่างกันคือ การทำลายเซลล์โดยไม่แตกนั้น แบคเทอริโอซินจะทำให้มีการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และ RNA ของเซลล์ แต่การทำลายโดยมีการแตกของเซลล์นั้น สันนิษฐานว่า secondary effect ทำให้

เกิดการกระตุ้นระบบ autolytic system ภายในเซลล์แบคทีเรียให้ทำงาน ซึ่งกลไกนี้จะทำลายเซลล์ได้ภายในเวลาอันรวดเร็วกว่าการทำลายโดยยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และ RNA (Gonzalez *et al.,* 1994)

ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ มี divalent cations ที่ outer membrane ทำให้ชั้น lipopolysaccharide มีความแข็งแรงมากขึ้นจากการที่สามารถลด electrostatic repulsion และเพิ่ม lipopolysaccharide-lipopolysaccharide association ทำให้ส่วน outer membrane มีความแข็งแรงและเป็นพื้นฐานสำคัญที่จะไม่ยอมให้โมเลกุลของสารต่างๆ ผ่านได้ง่าย แต่ถ้าใช้แบคเทอริโอซินร่วมกับการเติมสารบางอย่าง ได้แก่ surfactants, chelators และ adjuvants จะ ทำให้แบคเทอริโอซินทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ ซึ่ง Stevens และคณะ (1992) พบว่าการเติมสาร EDTA จะทำให้เชื้อ *S. typhimurium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบมีการเปลี่ยนแปลงส่วน core oligosaccharide ใน lipopolysaccharide ของชั้น outer membrane จึงยอมให้สารต่างๆ รวมทั้งแบคเทอริโอซินผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ และบริเวณที่แบคเทอริโอซินผ่านเข้าไปทำลายคือ เซลล์เมมเบรนเช่นเดียวกับแบคทีเรียแกรมบวก

เชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ต่างชนิด (species) ต่างสกุล (genus) กันจะมีความไว (sentitive) ต่อแบคเทอริโอซินต่างกันแม้จะอยู่ในสภาวะเดียวกัน และแบคทีเรียชนิดเดียวกันแต่เจริญอยู่ในสภาวะต่างกัน ก็จะมีความไวต่อแบคเทอริโอซินต่างกันด้วย (Bennik *et al*., 1997)

การศึกษาการสร้างสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนของแบคทีเรียแลกติก ที่มีการจำกัดผลของกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้น Barefoot and Klaenhammer (1983) พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *L. acidophilus* ภายใต้สภาวะที่มีการจำกัดผลของกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะทำให้มีการผลิตสารยับยั้งบางชนิดขึ้นมา เรียกว่า lactocin B ซึ่งมีผลในการยับยั้ง *L. leichmannii*, *L. lactis, L. bulgaricus* และ *L. helveticus*

Shillinger และ Lucke (1989) ทำการแยก *Lactobacillus* จากเนื้อได้ทั้งหมด 221 สายพันธุ์ นำมาทดสอบการยับยั้งภายใต้สภาวะดังกล่าวข้างต้น พบว่าเชื้อทั้งหมด 23 สายพันธุ์ คือ *L. sake* 19 สายพันธุ์ *L. plantarum* 3 สายพันธุ์ และ *L. curvatus* 1 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus* กลุ่มอื่นๆ ได้ แต่เมื่อนำ culture broth มาทำการทดสอบการยับยั้งโดยวิธี agar well diffusion assay ปรากฏว่ามีเชื้อ *L. sake* เพียง 6

สายพันธุ์ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำ *L. sake* เพียง 1 สายพันธุ์มาศึกษาการออกฤทธิ์ พบว่าสารที่หลั่งออกมาจะออกฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียแลกติกและ *L. monocytogenes* สารดังกล่าวเป็นโปรตีนออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรีย มีขอบเขตการยับยั้งแคบและชื่อว่า sakacin A

Lewus และ Montville (1992) รายงานว่า plantaricin BN, bavaricin MN และ pediocin ที่ผลิตโดย *L. plantarum* BN, *L. bavaricus* MN และ *P. pentosaceus* 43200 ตามลำดับ เป็นแบคเทอริโอซินที่ออกฤทธิ์ทำลายเชื้อ *C. botulinum* และ *L. monocytogenes*

Jimenez-Diaz และคณะ (1993) ทำการแยก *L. plantarum* LPCO10 จากการหมักมะกอกเขียว พบว่าสามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่เรียกว่า plantaricin S ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้

Rekhif และคณะ (1994) ศึกษาพบว่า plantaricin LC74 ที่ผลิตจาก *L. plantarum* LC74 สามารถยับยั้ง mesophilic lactobacilli ได้แก่ *L. plantarum, L. brevis* และ *L. buchneri* ในปีเดียวกันมีรายงานว่า Gonzalez และคณะ (1994) พบว่า *L. plantarum* LL44 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่มีศักยภาพในการยับยั้งได้ดี ซึ่งประกอบด้วยสายเปปไทด์ขนาด 3.5 kDa สามารถทำลายแบคทีเรียอื่นๆได้ เรียกชื่อแบคเทอริโอซินนี้ว่า plantaricin C

Ennahar และคณะ (1996) สามารถแยกเชื้อ *L. plantarum* WHE92 ที่สร้าง pediocin AcH มีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Lactobacillus, Enterococcus*, *Streptococcus* และ *Bacillus*

Thompson และคณะ (1996) พบว่า *L. heveticus* สายพันธุ์ CNRZ 450 ผลิตแบคเทอริโอซินที่คล้ายกับ helveticin J ซึ่งผลิตจาก *L. heveticus* NCFB 481 โดยแบคเทอริโอซินดังกล่าวสามารถยับยั้ง homofermentative lactobacilli ได้

Yan และ Lee (1997) พบว่า *L. fermentum* สามารถผลิต แบคเทอริโอซิน fermencin B ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *L. brevis, L. plantarum L. pentosus, L. pentosus, L. delbruekii, L. helveticus* และ *M. luteus*

Bogovic-Matijisic และคณะ (1998) พบว่า *L. acidophilus* LF221 ผลิตแบคเทอริโอซิน อย่างน้อย 2 ชนิด ได้แก่ acidocin A และ acidocin B ซึ่งจะออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียได้แก่ *B. cereus*, *Clostridium* sp., *Listeria innocua, S. aureus* และ *Streptococcus* sp.

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ *Lactobacillus*

ในการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ *Lactobacillus* ต้องอาศัยปัจจัยหลายๆ อย่างที่แตกต่างกันออกไป โดยส่วนใหญ่ที่มีการศึกษาสามารถสรุปได้ดังนี้

4.1 สายพันธุ์ของเชื้อ

พบว่าเชื้อชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันจะสามารถผลิตแบคเทอริโอซินชนิดเดียวกันได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น เชื้อ *L. lactis* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ผลิต nisin (De Vuyst and Vandamme, 1994a)

4.2 pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.2.1 pH เริ่มต้น

pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการสร้างสารยับยั้ง แบคทีเรียแลกติกต่างชนิดกันจะมี pH ที่เหมาะสมในการผลิตต่างกัน เช่น Lewus และ Montville (1992) รายงานว่า *L. plantarum* BN ผลิต plantaricin BN และ *L. bavaricus* จะผลิต bavaricin MN เมื่อ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.9 และ 6.5 ตามลำดับ *L. plantarum* UG1 จะผลิต plantaricin UG1 ได้สูงสุดที่ pH 6.5 เช่นเดียวกับกับ bavaricin MN

4.2.2 pH สุดท้าย

รายงานส่วนใหญ่พบว่าการผลิตแบคเทอริโอซิน จะมีปริมาณสูงขึ้นเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นกรด โดย Kelly และคณะ (1996) กล่าวว่า plantaricin KW30 จะผลิตแบคเทอริโอซินได้มากภายใต้สภาวะที่มีความเป็นกรด (pH 4.5) และมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียสูงสุด ส่วนที่ระดับ pH 5.0 ซึ่ง เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินหลายชนิด ได้แก่ acidocin J1229, lactocin S และ plantaricin 149 (Tahara and Kanatoni, 1996; Mortvedt-Abildgaard *et al*. 1995; Kato *et al*., 1994) Matsusaki และคณะ (1996) พบว่าเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ IO-1 ผลิต nisin ได้มากที่สุดที่ pH 5.5 เมื่อใช้

glucose media แต่เมื่อใช้ xylose media จะผลิตได้มากที่สุดที่ pH 6.0 อย่างไรก็ตาม มีแบคทีเรียแลกติกจำนวนมากที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงในอาหารที่มีระดับ pH กว้าง เช่น plantaricin S และ T, pediocin AcH และ fermencin B จะถูกผลิตได้สูงที่ระดับ pH ในช่วง 3-7, 4-6 และ 3-8 ตามลำดับ (Jimenez-Diaz *et al*., 1993; Ennahar *et al*., 1996; Yan and Lee, 1997)

4.3 ชนิดและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน รวมทั้ง cations สารลดแรงตึงผิว และสารยับยั้งต่างๆ มีผลอย่างมากต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน (Parente and Ricciardi, 1999) โดยส่วนใหญ่พบว่าอาหารที่นิยมใช้เลี้ยงแบคทีเรียแลกติกในการผลิตสารยับยั้งคืออาหาร MRS (de Man Rogosa and Sharpe) โดย

Spelhaug และ Harlander (1989) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *L. lactis* และ *P. pentosaceus* ในอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ M17-glu, BHI (Brain Heart Infusion) และ MRS พบว่าเชื้อสามารถสร้างสารยับยั้งได้มากที่สุดในอาหาร MRS

Kelly และคณะ (1996) พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* ในอาหาร Elliker broth และ อาหาร TYT30 เชื้อสามารถเจริญได้ดีแต่ผลิตแบคเทอริโอซิน plantaricin KW30 ได้น้อยกว่าในอาหาร MRS แล้วยังพบว่าเชื้อสามารถใช้น้ำตาลกาแลกโตส แลกโตส และซอบิทอล แทนน้ำตาลกลูโคสได้โดยไม่ทำให้การผลิตแบคเทอริโอซินลดลง

Bogovic-Matijisic และคณะ (1998) รายงานว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง MRS จะมีการผลิตแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกได้สูงกว่าในอาหารแข็ง M17

อย่างไรก็ตามนอกจากอาหาร MRS แล้ว Thompson และคณะ (1996) รายงานว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *L. helveticus* CNRZ450 ใน skim milk เชื้อสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้มากกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS นอกจากนี้ Yang และ Ray (1994) ได้ทำการศึกษาอาหารชนิดอื่นๆ ที่มีส่วนประกอบไม่ซับซ้อนในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติก ทำให้ค้นพบว่า TGE (Trypticase Glucose Yeast Extract) เป็นอาหารที่ทำให้เชื้อสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงเช่นกัน

สำหรับผลของส่วนประกอบในอาหารนั้นพบว่าเชื้อจะผลิตสารยับยั้งได้ดีถ้าในอาหารประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสมากกว่าที่เป็นซูโครส, ไซโลสหรือกาแลกโตส

(Matsusaki *et al*.,1996., Biswas *et al*., 1991) แต่ Parente และ Ricciardi (1999) กล่าวว่า การผลิตแบคเทอริโอซิน enterocin 1146 จากเชื้อ *Enterococcus faecium* เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสดีกว่ากลูโคส ส่วนฟรุกโตสกับแลกโตสนั้นให้ผลผลิตมวลเซลล์เท่ากับซูโครส แต่ผลิต enterocin 1146 น้อยกว่า

สำหรับผลของ anion ได้แก่ ฟอสเฟต และ cations ได้แก่ Mg^{2+} และ Ca^{2+} พบว่ามีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซินแต่มักขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อแต่ละชนิดด้วย โดย Biswas และคณะ (1991) พบว่า Mg^{2+} สามารถทำให้การผลิตแบคเทอริโอซิน pediocin AcH เพิ่มขึ้นได้ เช่นเดียวกับ Meghrous และคณะ (1992) พบว่า Mg^{2+} สามารถเพิ่มการผลิต nisin จากเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis*. ATCC 11454 และลดการดูดซับ nisin สู่ผิวเซลล์ที่ผลิตได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่ Matsusaki และคณะ (1996) รายงานว่า เมื่อเลี้ยง *L. lactis* subsp. *lactis*. IO-1 ด้วยการหมักแบบครั้งคราว ที่มีการควบคุม pH โดยการใช้น้ำตาลกลูโคส และไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น การเติม Mg^{2+} ไม่ทำให้เชื้อผลิต nisin ได้เพิ่มขึ้น แต่การเติม $CaCl_2$ 0.1 โมลลาร์/ลิตรสามารถกระตุ้นให้เชื้อมีการผลิต nisin ได้มากขึ้นโดยไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและการผลิตแลกเตทแต่อย่างใด

นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิว เช่น tween 80 มีผลกระตุ้นการผลิตแบคเทอริโอซินในเชื้อบางชนิดได้ (Parente and Hill, 1992; Daba *et al*., 1993; Matsusaki *et al.,* 1996) โดย tween 80 ทำให้แรงตึงผิวบริเวณผิวเซลล์แบคทีเรียลดลงการนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์เกิดขึ้นได้ดีและช่วยป้องกันไม่ให้แบคเทอริโอซินที่ผลิตออกมาเกาะอยู่กับผิวภาชนะที่ใช้เลี้ยงจึงทำให้สามารถตรวจพบปริมาณแบคเทอริโอซินใน culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้น

ส่วนการเติมสารที่ทำให้เกิดภาวะกดดันต่อเชื้อที่เลี้ยง จากการศึกษาของ Mortvedt-Abildgaard และคณะ (1995) พบว่าเมื่อมีการเติมเอทธานอล ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 % จะทำให้การผลิต lactosin S เพิ่มขึ้น โดยสันนิษฐานว่าไปมีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการผลิตแบคเทอริโอซิน และช่วยป้องกันมิให้แบคเทอริโอซินที่หลั่งออกมานอกเซลล์เกาะกลุ่มกัน

4.4 อุณหภูมิในการบ่มเชื้อ

ส่วนใหญ่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติกจะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินด้วย และพบว่าแบคทีเรียแต่ละชนิดจะเจริญและผลิตแบคเทอริโอซินที่อุณหภูมิในการบ่มที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อ *Lactobacillus* เพื่อการผลิตแบคเทอริโอซินชนิดต่างๆ

แบคเทอริโอซิน	**อุณหภูมิ** (°ซ)	**เอกสารอ้างอิง**
Brevicin 286	20	Conventry *et al.,* (1996)
Plantaricin UG1	25 – 30	Enan *et al*., (1996)
Plantaricin BN	15	Lewus and Montvil (1992)
Bavaricin	30	Lewus and Montvill (1992)
Lactocin S	30	Mortvedt-Abildgaard *et al*., (1995)

4.5 ระยะการเจริญของเชื้อ

การผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติก อาจจะสัมพันธ์กับระยะการเจริญของเชื้อหรือไม่ก็ได้ กล่าวคือ เชื้อบางชนิดสามารถสร้างสารยับยั้งได้เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เชื้อเพิ่มจำนวนมากขึ้น (Yang and Ray, 1994) แต่เชื้อบางชนิดก็ไม่เป็นไปตามนี้คืออาจผลิตสารยับยั้งได้มากเมื่ออยู่ในระยะที่การเติบโตคงที่ และเชื้อบางชนิดสามารถผลิตสารยับยั้งได้ทุกระยะของการเลี้ยง

จากการศึกษาของ Desai และ Sheth (1997) พบว่าอัตราการผลิตกรดของเชื้อ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. lactis* BM–12, *P. pentocaceus* BM–13, *L. brevis* BP–14, *L. plantarum* BM–15, *Leuconostoc mesenteroides* BM – 16 และ *L. mesenteroides* BM –17 จะสูงสุดเมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 4 – 5 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่เชื้อเริ่มเจริญเข้าสู่ระยะ log

Biswas และคณะ (1991) พบว่า *P. acidilactici* H จะเจริญและเริ่มผลิตกรดได้ในอัตราสูงสุดเมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 4-8 ชั่วโมง ส่วน pediocin AcH จะผลิตในช่วงเวลา 8-16 ชั่วโมง พบว่าการสร้างกรดจะเกิดขึ้นในช่วงต้นของการเจริญ แต่สร้างแบคเทอริโอซินจะเกิดขึ้นหลังจากที่มีการผลิตกรดแล้ว จึงถือว่าเป็น secondary metabolite จากการศึกษาพบว่า *Lactobacillus* มีการผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงสุดในระยะต่างกัน คือ ระยะ log ได้แก่ plantaricin S, plantaricin 149, brevicin 286, และ fermencin B (Jimenez-Diaz *et al*., 1993; Kato *et al*., 1994; Conventry, 1996; Yan and Lee, 1997) ระยะ log จนถึง early stationary ได้แก่ plantaricin UG1 (Enan *et al*., 1996) และระยะ stationary ได้แก่ plantaricin KW30, plantaricin T (Kelly *et al.,* 1996; Jimenez-Diaz *et al*., 1993)

5. วิธีการผลิตและการตรวจสอบการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติก

5.1 การผลิตโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารวุ้นแข็ง

ส่วนใหญ่ใช้ในการศึกษาเพื่อตรวจหาว่าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ต้องการศึกษามีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งหรือไม่ นิยมใช้วิธีการหยดเชื้อแบคทีเรียแลกติกลงบนอาหารวุ้นแข็ง นำไปบ่ม จากนั้นนำอาหารวุ้นหลอมเหลวที่มีเชื้ออินดิเคเตอร์ผสมอยู่เททับลงบนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลกติกวางให้วุ้นแข็งนำไปบ่มแล้ววัดวงใสที่เกิดขึ้น แต่อย่างไรก็ตามนอกจากแบคทีเรียแลกติกจะผลิตแบคเทอริโอซินแล้วยังผลิตสารอื่น ได้แก่ กรดอินทรีย์ต่างๆ เช่น กรดแลกติก กรดอะซีติก และสารยับยั้งอื่นๆ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งสารเหล่านี้มีความสามารถในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้ด้วย ซึ่งจะเป็นปัญหาโดยเฉพาะการใช้เชื้ออินดิเคเตอร์ที่ไม่ใช่เชื้อแบคทีเรียแลกติกเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียอื่นจะไวต่อกรดมากกว่าเชื้ออินดิเคเตอร์ที่เป็นแบคทีเรียแลกติกด้วยกัน

การแก้ปัญหาที่เกิดจากสารยับยั้งอื่นที่ไม่ใช่แบคเทอริโอซิน เช่นการจำกัดผลจากกรดโดยการปรับสภาพความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ลดปริมาณของคาร์โบไฮเดรตในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือใช้เชื้ออินดิเคเตอร์ที่ไม่ถูกทำลายโดยกรด ขจัดผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยการเติมเอนไซม์ catalase ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Muriana and Luchansky, 1993)

โดยทั่วไปแล้วสามารถสังเกตเห็นฤทธิ์ในการยับยั้งของเชื้อที่ผลิตแบคเทอริโอซินเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็งได้ง่ายกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวเนื่องจากเห็นวงใสที่เกิดจากการยับยั้งได้ด้วยตาเปล่ารอบๆโคโลนีของเชื้อที่ผลิต และสามารถทดสอบหาเชื้อที่สร้างสารยับยั้งได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน

5.2 การผลิตโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว

แม้ว่าการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกในอาหารวุ้นแข็งจะสามารถมองเห็นได้ชัดแต่การศึกษาคุณสมบัติและการควบคุมสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อทำได้ยากกว่าในอาหารเหลว สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลอย่างยิ่งต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติก จึงมีการพยายามศึกษาวิจัยถึงสภาวะที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตแบคเทอริโอซินให้ได้มากที่สุดทั้งชนิดและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเติมสารต่างๆลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ (Hoover and Harlander, 1993) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้สำคัญมากโดยเฉพาะเมื่อผลิตในระดับ large scale (Wilaipan *et al*., 2002)

Muriana และ Luchansky (1993) ได้สรุปวิธีการที่ใช้ในการทดสอบการสร้างสารแบคเทอริโอซินได้อีกหลายวิธีดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 วิธีการตรวจสอบการสร้างแบคเทอริโอซิน

ส่วนที่ใช้ทดสอบ	วิธีการดำเนินการ
สารละลายส่วนใส	1. Spot-on-lawn test (spot test) หยด culture broth ที่มีการปรับ pH และกรองแล้วลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียอินดิเคเตอร์
	2. Agar well diffusion เติม culture broth ที่มีการปรับ pH และกรองแล้วลงในหลุมของจานเพาะเชื้อที่มีแบคทีเรียอินดิเคเตอร์
	3. Activity assay หยด culture broth ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันลงบนจานเพาะเชื้อที่มีแบคทีเรียอินดิเคเตอร์
	4. Microtiter plate assay เติม culture broth ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันลงในหลุมของ microtiter plates แล้วใส่แบคทีเรียอินดิเคเตอร์จำนวนเท่ากันทุกหลุม อ่านผลการยับยั้งด้วย microplate reader
โคโลนีของเชื้อ	1. Flip plate method เลี้ยงเชื้อบนจานอาหารแข็งแล้วพลิกกลับอาหารให้ไปอยู่ด้านฝาจานแล้วเททับด้วยแบคทีเรีย อินดิเคเตอร์
	2. Sandwich overlay เลี้ยงเชื้อในจานอาหารแข็งให้มีความเข้มข้นเชื้อระดับต่างๆ ราดทับด้วยอาหารบ่มเชื้อจนเติบโตแล้วเททับด้วยแบคทีเรียอินดิเคเตอร์
	3. Lutri-plate เลี้ยงเชื้อบนจานอาหารด้านหนึ่ง ส่วนอีกด้านราดทับด้วยแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

6. การนำแบคทีเรีย *Lactobacillus* และสารที่เชื้อสร้างขึ้นไปใช้ในอาหาร

มีการนำ *Lactobacillus* มาใช้ในอาหารเป็นเวลานานแล้ว โดยส่วนใหญ่ถือได้ว่าเป็น biopreservative ในอาหารซึ่งอาจจะนำตัวเชื้อมาใช้ในลักษณะเป็นเชื้อเริ่มต้นในอาหารหมักต่างๆ หรือนำสารยับยั้งที่เชื้อผลิตได้ไปใช้ในอาหารก็ได้ การนำเชื้อเหล่านี้มาใช้โดยตรงมีความสำคัญมากในอาหารหมักทั้งพืช สัตว์ ผลิตภัณฑ์นมต่างๆ นอกจากจะช่วยให้สามารถเก็บรักษาอาหารได้นานแล้วยังช่วยให้เพิ่มมูลค่าและเพิ่ม รส กลิ่น สี ของอาหารด้วย (McMullen and Stile, 1996) ความสำคัญของแบคทีเรียเหล่านี้ เนื่องจากสามารถผลิตกรดซึ่งทำให้ pH ของสิ่งแวดล้อมลดลง เชื้ออื่นที่เจริญได้เฉพาะใน pH เป็นกลางก็ไม่สามารถเจริญปนเปื้อนได้ นอกจากนี้ยังสร้างสารยับยั้งอื่น ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ ไดอะซิทิล และแบคเทอริโอซิน ได้ด้วย

Desai และ Sheth (1997) นำแบคทีเรียแลกติก 6 สายพันธุ์ได้แก่ *L. lactis* BM-12, *L. brevis* BM-14, *L. plantarum* BM-15, *P. pentocaceus* BM-13, *L. mesenteroides* BM-16 และ *L. mesenteroides* BM-17 มาใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทำผักดองพบว่าสามารถเก็บผักดองที่อุณหภูมิ 28-30 °ซ ได้นานถึง 2 เดือน

Kato และคณะ (1999) นำเชื้อ *L.lactis* subsp. *lactic* IFO12007 nisin มาเป็นเชื้อเริ่มต้นในการผลิตถั่วหมัก พบว่าสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* ที่ปนเปื้อนภายหลังได้อย่างสมบูรณ์และยังมีคุณสมบัติที่ดีอีกหลายประการได้แก่ สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและผลิตสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้โดยไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ซึ่งจำเป็นในการผลิตถั่วหมัก ไม่ทำให้ pH ของถั่วหมักลดลงมากจนเกินไป และไม่เป็นเชื้อก่อโรค

Fiorentini และคณะ (2001) ทำการทดสอบพบว่า culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* BN ในอาหาร sugar cane molasses broth สามารถลดจำนวนเชื้อ psychrotrophic และ mesophilic ที่ปนเปื้อนในเนื้อวัวได้

Pol และคณะ (2001) พบว่า เมื่อใช้ nisin ร่วมกับ Pulse-Electro-Field สามารถทำลายเชื้อ *B. cereus* ในขณะงอกจาก spore ได้

Caridi (2003) พบว่า เชื้อ *L. paracasei* และ *L. curvatus* ที่แยกได้จากเนยแข็ง สามารถสร้างสารยับยั้งที่มีคุณสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซินและสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้

ปัจจุบันแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียเหล่านี้ได้รับความสนใจศึกษาค้นคว้าเพิ่มขึ้นมากด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้น แต่อย่างไรก็ตามในห้องปฏิบัติการพบว่า ยังมีปัจจัยหลายอย่างที่มีอิทธิพลต่อการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินในอาหารเช่น ส่วนประกอบของอาหาร ความสามารถในการแพร่ของแบคเทอริโอซินในอาหาร ชนิดของแบคทีเรียในอาหาร ความเป็นกรดด่างของอาหารและอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาอาหารนั้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรีย *Lactobacillus* ที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านไทย
2. เพื่อศึกษาลักษณะของสารยับยั้งของแบคทีเรีย *Lactobacillus*
3. เพื่อศึกษาลักษณะบางประการของสารยับยั้งกึ่งบริสุทธิ์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Lactobacillus*
4. เพื่อศึกษาการผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรีย *Lactobacillus* โดยการหมักแบบ batch