# บทที่ 1
# บทนำ

## 1. แบคทีเรียในน้ำนม

แบคทีเรียที่พบในน้ำนมดิบมีมากมายหลายชนิด ทั้งนี้เนื่องจากน้ำนมเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ แต่แบคทีเรียที่มีความสำคัญและมีประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่มแลคติก แบคทีเรียในกลุ่มนี้ประกอบด้วย

### 1.1 แบคทีเรียในสกุล Lactobacillus

แบคทีเรียในสกุล ( Genus ) Lactobacillus จัดอยู่ในตระกูล ( Family ) Lactobacillaceae ( Diebel และ Seeley., 1974 ) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ มีลักษณะเซลล์รูปท่อน มักพบเป็นสายสั้นๆ เจริญได้ในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ มีความต้องการสารอาหารค่อนข้างซับซ้อนและสมบูรณ์ มักพบในอาหารหมักพวกเนื้อสัตว์ ผักและผลิตภัณฑ์นม ( Jeremy., 1986 )

### 1.2 แบคทีเรียในสกุล Leuconostoc

แบคทีเรียในสกุล Leuconostoc จัดอยู่ในตระกูล Streptococcaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ มีลักษณะเซลล์กลม มักพบเป็นคู่หรือเป็นสาย สามารถเจริญได้ทั้งในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ นิยมใช้เชื้อชนิดนี้เพื่อผลิตสารที่มีกลิ่นหอม ( นภา, 2535 )

### 1.3 แบคทีเรียในสกุล Pediococcus

แบคทีเรียในสกุล Pediococcus จัดอยู่ในตระกูล Streptococcaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ มีลักษณะเซลล์กลม มักพบเป็นคู่หรือเป็นกลุ่ม เจริญได้ ทั้งในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ มีความต้องการสารอาหารที่สมบูรณ์ แบคทีเรียกลุ่มนี้มักพบในอาหารหมักพวกผัก เนื้อสัตว์ ( ไส้กรอกเปรี้ยว ) เป็นต้น ( นภา, 2535 )

1.4 แบคทีเรียในสกุล Streptococcus

แบคทีเรียในสกุล Streptococcus ( Lactococcus ) จัดอยู่ในตระกูล Streptococcaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ มีลักษณะเซลล์กลมแบบ cocci หรือรี แบบ oval ขนาดเล็กกว่า 2 ไมโครเมตร จะพบเป็นคู่หรือสาย มีทั้งพวกที่ต้องการอากาศ ( aerobe ) หรือต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย ( microaerophile ) และบางพวกต้องการ $CO_2$ ในการเจริญ หรืออาจจะไม่ต้องการอากาศ ( strictly anaerobe ) แบคทีเรียกลุ่มนี้ มีความ ต้องการสารอาหารค่อนข้างซับซ้อนและสมบูรณ์ สามารถใช้อาหารพวกคาร์โบไฮเดรต และเปลี่ยนเป็นกรดแลคติคเป็นส่วนใหญ่ ( Jeremy. , 1986. )

แบคทีเรียในสกุลนี้แบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม ได้แก่

1.4.1 PYOGENIC STREPTOCOCCI

แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะย่อยสลายเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ ( β-hemolytic ) แต่บางสายพันธุ์ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงไม่สมบูรณ์ (α-hemolytic) หรืออาจไม่ย่อยสลายก็ได้ จะมี polysaccharide antigen ที่ผนังเซลล์ แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในคนและในสัตว์ โดยปกติแบคทีเรียกลุ่มนี้จะ เจริญในอาหารเป็นสายสั้นหรือยาว ในการเจริญแบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการสารอาหารค่อนข้างซับซ้อนและสมบูรณ์ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ คือ 37 $^{o}$C สามารถเจริญในสภาพมีอากาศ ( aerobe ) และถูกทำลายได้โดยความ ร้อนที่อุณหภูมิ 56 $^{o}$C ตัวอย่างของเชื้อในกลุ่มนี้ เช่น *Streptococcus pyogenes* , *Streptococcus pneumoniae* เป็นต้น

1.4.2 ORAL STREPTOCOCCI

แบคทีเรียกลุ่มนี้มักพบในช่องปากและทางเดินหายใจส่วนต้นของคนและสัตว์ แบคทีเรียกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงไม่สมบูรณ์ ( α- hemolytic ) ความสนใจที่จะศึกษา oral streptococci เพิ่มขึ้นอย่างมากในระยะที่ผ่านมานี้เนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้ทำให้เกิดโรคกับส่วนต่างๆ ของร่างกาย โดยเฉพาะ *Streptococcus mutans* ทำให้เกิดโรคฟันผุ

1.4.3 ENTEROCOCCI

แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียที่พบโดยทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ถึงแม้ว่าจะไม่มีความสำคัญมากนักในการทำให้เกิดโรค แต่ก็มีการศึกษากันมากเนื่องจากเชื้อเหล่านี้มักพบในน้ำและอาหารซึ่งมักจะสัมพันธ์กับการปนเปื้อน อุจจาระของคนและสัตว์ ตัวอย่างของเชื้อในกลุ่มนี้ เช่น *Streptococcus faecalis* , *Streptococcus avium* เป็นต้น

1.4.4 LACTIC ACID STREPTOCOCCI ( LACTOCOCCI )

Lactic acid streptococci ประกอบด้วย *Streptococcus lactis* สายพันธุ์ต่างๆ และ *Streptococcus raffinolactis* เชื้อในกลุ่มนี้จะย่อยสลายเม็ดเลือดแดงไม่สมบูรณ์ หรืออาจไม่ย่อยสลายก็ได้ มี Group N antigen เชื้อในกลุ่มนี้มีความสำคัญอย่างมากในอุตสาหกรรมนม

1.4.5 ANAEROBIC STREPTOCOCCI

แบคทีเรียกลุ่มนี้มักพบเป็นคู่หรือสายและผลิตกรดแลคติคเป็นผลผลิต หลักในการหมัก ซึ่งบางครั้งอาจจะมีการผลิตกรดอะซีติก กรดฟอร์มิก เอธานอล หรือ $CO_2$ ปนออกมาในปริมาณเล็กน้อย ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ เช่น *Streptococcus pleomorphus* ,*Streptococcus morbillorum* เป็นต้น

1.4.6 OTHER STREPTOCOCCI

แบคทีเรียในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง สามารถแยกได้ จากผิวของสัตว์และจากผลิตภัณฑ์นม ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ เช่น *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus uberis* เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การใช้ Lactic Streptococci ในผลิตภัณฑ์นม

Lactic Streptococci เป็นหัวเชื้อที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมเตรียมผลิตภัณฑ์นมพวกเนยแข็ง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1. แสดงการใช้ Lactic Streptococci ในผลิตภัณฑ์นมหมัก

( Skinner และ Quesnel., 1978. )

| CULTURE | PRODUCT |
|---|---|
| *St. cremoris*<br>*St. lactis*<br>*St. diacetylactis* | most hard cheese , including English terretorial ( e.g. Cheddar ) |
| *St. cremoris*<br>*St. lactis*<br>*St. diacetylactis*<br>*Leuconostoc* spp. | Mould - ripened cheese ( e.g. Stilton )<br>Dutch - type cheese ( e.g. Gouda ) |
| *St. cremoris*<br>*St. diacetylactis*<br>*Leuconostoc* spp. | Cottage cheese , cream cheese , cultured cream |
| *St. thermophilus* | Yoghurt , cooked cheese ( e.g. Emmental , Gruyere ) |

3. การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆโดย Lactic Streptococci

มีรายงานที่กล่าวถึงความสามารถของสารที่สร้างโดย Lactic Streptococci ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียและทำให้เกิดโรคในผู้บริโภค โดยสารที่ Lactic Streptococci สามารถสร้าง ได้แก่

3.1 กรดอินทรีย์ ( Organic Acid )

การสะสมของกรดอินทรีย์จะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง ซึ่งจะมีผลต่อจุลินทรีย์บางชนิดที่ไม่สามารถทนกรด เช่น *Bacillus sp.* , *E. coli* , *Pseudomonas sp.* เป็นต้น ( Charlotta และ Lindgreen., 1993. )

กรดอินทรีย์จะมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยการยับยั้งกระบวนการเมตาโบลิสมที่จำเป็นต่อการดำรงชีพ กรดอินทรีย์ที่อยู่ในรูปไม่แตกตัวจะสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้และแตกตัวเป็นอิออนภายใน ทำให้ระดับความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์ลดลง ขัดขวางการสร้างพลังงานและ การเคลื่อนที่ของประจุ ยับยั้งการขนส่งและการสังเคราะห์สารที่จำเป็นต่อเซลล์ หรืออาจเกิดปฏิกริยากับเซลล์ มีผลทำลายเซลล์หรือหน่วงเหนี่ยวการเจริญของจุลินทรีย์นั้นๆ ( Charlotta และ Lindgreen., 1993 ; Beuchat และ Golden., 1989 )

3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( Hydrogen peroxide; $H_2O_2$ )

Lactic Streptococci สามารถสร้าง $H_2O_2$ ระหว่างการเจริญได้ โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีอากาศโดยใช้ $O_2$ เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ปฏิกริยาที่ใช้มีหลายวิธี( Dasechel., 1989. ) ได้แก่

$$PYRUVATE + O_2 + PO_4^{3-} \xrightarrow{\text{pyruvate oxidase}} ACETYL\ PHOSPHATE + CO_2 + H_2O_2$$

$$LACTATE + O_2 \xrightarrow{\text{L-lactate oxidase}} PYRUVATE + H_2O_2$$

$$LACTATE + O_2 \xrightarrow{\text{NAD-independent D-lactate dehydrogenase}} PYRUVATE + H_2O_2$$

$$NADH + H^+ + O_2 \xrightarrow{\text{NADH-oxidase}} NAD + H_2O_2$$

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสะสมของ $H_2O_2$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้นเนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้ไม่มีเอ็นไซม์คะตะเลส ( Jeremy., 1986 ) การสร้างและการสะสมของ $H_2O_2$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถยับยั้งการเจริญของ *Stap. aureus* ( Dahiya และ Speck., 1968 ) และ *Pseudomonas* spp. ได้ ( Price และ Lee., 1970 ) โดย $H_2O_2$ จะทำปฏิกริยากับสารอื่นๆเพื่อสร้างสารต่อต้านจุลชีพ เช่น ในนมดิบ $H_2O_2$ จะทำปฏิกริยากับ Endogenous Thiocyanate โดยมีเอ็นไซม์ Lactoperoxidase สร้างสารตัวกลาง ( intermediate oxidation ) ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ กระบวนการนี้ เรียกว่า Lactoperoxidase Antibacterial System

3.3 ไดอะซิติล ( Diacetyl )

ไดอะซิติลมีชื่อทางเคมีว่า 2,3-butanedione จัดเป็นผลิตภัณฑ์ตัวสุดท้าย ที่สร้างมาจากตัวกลางไพรูเวท ไดอะซิติลมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการทำเนย เพราะเป็นสารที่มีกลิ่นหอม ไดอะซิติลสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยยีสต์และแบคทีเรียพวกแกรมลบจะมีความไวต่อไดอะซิติลมากกว่าแบคทีเรียพวกแกรมบวก ถึงแม้ว่าไดอะซิติลจะจัดอยู่ในบัญชี GRAS ( Generally Recognized As Safe ) แต่การใช้ในการถนอมอาหารยังจำกัด เพราะต้องใช้ในปริมาณมาก และมีกลิ่นที่รุนแรง ( Dasechel., 1989. ; Jay., 1982. ) กลไกการยับยั้งของไดอะซิติลคาดว่าเกิดจากการรบกวนตำแหน่งกรดอะมิโนอาร์จินีนโดยทำปฏิกริยากับอาร์จินีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนหรือเอนไซม์ของแบคทีเรีย

3.4 แบคทีริโอซิน ( Bacteriocin )

แบคทีริโอซินจัดเป็นสารต่อต้านจุลชีพ ( Antimicrobial substance ) ที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ ( Dasechel., 1989. ) โดยสารต่อต้านจุลชีพต่างชนิดกันจะมีลักษณะผลการยับยั้งจุลินทรีย์ ( Antimicrobial spectrum ) แตกต่างกันไปทั้งในแง่การทำลาย,กลไกการทำงาน ( Mode of Action ) และสมบัติทางเคมี แบคทีริโอซินเป็นสารที่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบจะมีฤทธิ์ในการฆ่าหรือทำลายแบคทีเรียที่มีภูมิรับไว ( susceptible bacteria ) และจำเพาะต่อบริเวณรับแบคทีริโอซิน ( Bacteriocin Recepter ) บนเซลล์แบคทีเรียด้วย ( Tagg และคณะ, 1976. )

การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียที่สร้างแบคทีริโอซินเริ่มศึกษาใน *E. coli* ที่สร้างสารโคลิซิน ( colicins ) ซึ่งได้มีการศึกษาอย่างละเอียดถึงกลไกการทำงาน ( Mode of action ), ผู้ถูกอาศัย ( Host Range ), ลักษณะทางพันธุกรรม ( genetic determination ) และการทำบริสุทธิ์ ( purification ) เป็นต้น

แบคทีริโอซินของแบคทีเรียกลุ่มแลคติคสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ( Venema และคณะ , 1993. )

ก) พวกแลนติไบโอติก ( Lantibiotic )

เป็นแบคทีริโอซินที่มีขนาดเล็ก ประกอบด้วยกรดอะมิโนบางชนิดที่ต่างไป เช่น ดีไฮโดรอะลานีน ( dehydroalanine ) , แลนทิโอนีน ( lantionine ) และ บีตา-เมทิลแลนทิโอนีน ( β-methyllanthionine ) ตัวอย่างที่รู้จักกันดีของแบคทีริโอซินพวกนี้ ได้แก่ ไนซิน ( Nisin )

ข) พวกที่ไม่ใช่แลนติไบโอติก ( Non-lantibiotic )

เป็นแบคทีริโอซินที่มีขนาดต่างๆกัน ระหว่าง 2.5-37 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนปกติ ( regular amino acid ) ตัวอย่างของแบคทีริโอซินพวกนี้ ได้แก่ แลคโตคอคซิน ( Lactococcin ) ซึ่งมีขนาดเล็ก 5-10 กิโลดาลตัน

4. <u>แบคทีริโอซินที่สร้างโดย Lactic Streptococci</u>

4.1 ดิพโพลคอคซิน ( Diplococcin )

ดิพโพลคอคซินเป็นแบคทีริโอซินที่สร้างโดย *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* stain *346* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ M 17 และในน้ำนม โดยสร้างในช่วงต้นของ stationary phase ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยกระบวนการทางโครมาโตกราฟี พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,300 ดาลตัน ( Davey และ Pearce., 1982. ) ดิพโพลคอคซินไม่เสถียรที่อุณหภูมิห้อง สลายอย่างรวดเร็วเมื่อถูกความร้อนหรือถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ย่อยโปรตีน ( proteolytic enzyme ) เช่น ไคโมทริปซิน ( chymotrypsin ) , ทริปซิน ( trypsin ) และ โปรเนส ( pronase ) จากการวิเคราะห์ส่วนประกอบของกรดอะมิโน พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดที่เป็นกรดและเป็นกลาง และมีกรดอะมิโนที่เป็นเบสน้อย ดิพโพลคอคซินมีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน และยับยั้งการสร้าง DNA และ RNA ในเซลล์ที่ไวต่อดิพโพลคอคซิน เช่น *L. lactis* subsp. *lactis* และ *L. lactis* subsp. *cremoris* ซึ่งจะทำให้เซลล์ตายโดยไม่เกิดการแตกของเซลล์ ( Catherine และ Barefoot., 1993. )

4.2 แลคโตสเตรปซิน ( Lactostrepcins )

แลคโตสเตรปซินเป็นแบคทีริโอซินที่ทนกรด สร้างโดย *L. lactis* biovar. *diacetylactis* ( สายพันธุ์ที่ไม่สร้างไนซิน ) บางสายพันธุ์ของ *L. lactis* subsp.*cremoris* และ *L. lactis* subsp. *diacetylactis* ( Zejdel และ คณะ , 1985. ) การทำงานสูงสุดของแลคโตสเตรปซินจะเกิดขึ้นที่ระดับความเป็นกรดด่างน้อยกว่า 5 และจะสูญเสียสภาพการทำงานเมื่ออยู่ในระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 แลคโตสเตรปซินจะถูกย่อยโดยเอ็นไซม์ย่อยโปรตีน ทนความร้อนที่ 121$^{o}$C 10 นาที และจะสร้างขึ้นในน้ำนมและในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการให้อากาศ โดยจะสร้างในช่วงต้นของการเจริญในระยะ log phase เมื่อนำไปผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์บางขั้นตอนโดยทำไดอะไลซิสและ ultrafiltration พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 ดาลตัน แลคโตสเตรปซินจะมีผลยับยั้งเซลล์ Lactococci Group A, C, G , Streptococci , *Lb. helveticus* , *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* , *Ln. paracitrovorum* และ *B. cereus* ( Kozak และคณะ , 1978. )

แลคโตสเตรปซิน 5 สร้างโดย *L. lactis* subsp. *cremoris* 202 จากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี SDS - PAGE พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 20,000 ดาลตัน และจะพบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการให้อากาศ โดยจะสร้างในช่วงต้นของการเจริญในระยะ log phase แลคโตสเตรปซิน 5 สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ และยังมีผลรบกวนการขนส่งยูริดีน ( uridine ) รวมทั้งยับยั้งการสร้าง DNA , RNA และ โปรตีน ( Zajdel และคณะ , 1985. )

4.3 แลคโตคอคซิน 1 ( Lactococcin I )

แลคโตคอคซิน 1 เป็นแบคทีริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* subsp. *cremoris* strain AC 1 สามารถยับยั้งพวก Lactobacilli สายพันธุ์อื่นและ Clostridia บางสายพันธุ์ พบว่าแลคโตคอคซิน 1 จะสร้างขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ lactic broth และในน้ำนม โดยจะสร้างในช่วงของการเจริญระยะ log phase เมื่อผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์พบว่าแลคโตสเตรปซินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 6,000 ดาลตัน ทนความร้อน 99$^{o}$C 30นาที และมีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรด - ด่าง ในช่วง 4.5 - 7.0 ( Geis และ Teuber., 1983. )

4.4 แลคโตคอคซิน เอ ( Lactococcin A )

แลคโตคอคซิน เอ ที่สร้างโดย *L. lactis* subsp. *cremoris* LMG 2130 ในอาหาร M17 ( Parente และ Hill., 1992. ) มีฤทธิ์ในการฆ่า *L. lactis* subsp. *cremoris* , *L. lactis* subsp. *diacetylactis* และ Clostridia เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,778 ดาลตัน มีค่า I.S. ( isoelectric point ) 9.2 ไม่ละลายน้ำ ถูกย่อยโดยเอ็นไซม์ย่อยโปรตีน มีความเสถียรในสารละลาย 60% เอธานอล ที่ 20°C และ 2.5 mM Sodium Phosphate ( pH.7.3 ) แลคโตคอคซิน เอ จะมีผลต่อเซลล์เมมเบรนทำให้เกิดการแตกขององค์ประกอบต่างๆภายในเซลล์ นอกจากนี้แลคโตคอคซิน เอ อาจสร้างจาก *L. lactis* subsp. *cremoris* สายพันธุ์อื่นๆ เช่น 9B4 , *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* WM 4 ( Holo และคณะ , 1991. )

4.5 ไนซิน ( Nisin )

ไนซินเป็นแบคทีริโอซินที่สร้างจาก Lactic acid bacteria ที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางมานาน ( Liu และ Hansen., 1990. ; Catherine และ Barefoot., 1993. ) ไนซินจัดเป็น Lantibiotic เป็นกลุ่มของเปปไทด์ที่มี $\alpha,\beta$-unsaturated amino acid ( dehydroalanine และ dehydrobutyrine ) และ thioether amino acid ( lanthionine และ $\beta$-methyllanthionine ) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,500 ดาลตัน มีการทำงานต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวก รวมทั้ง Lactococci , Bacilli , Micrococci , *S. aureus* , *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium botulinum* ( Hurst., 1983. ) ไนซินทนความร้อน 100 °C 10 นาที แต่จะสลายได้ด้วย ไคโมทริปซิน ( chymotrypsin ) และ ทนต่อโปรเนส ( pronase ) และ ทริปซิน ( trypsin ) ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ไนซินมีผลโดยตรงต่อเซลล์เมมเบรน ทำให้เกิด efflux ของกรดอะมิโนและประจุบวก ทำให้ไม่เกิดกระบวนการ proton motive force และยังรบกวนกระบวนการ cellular biosynthesis ทำให้เกิดการสูญเสีย membrane potential เซลล์จึงตายในที่สุด

4.6 แลคติซิน 481 ( Lacticin 481 )

แลคติซิน 481 เป็นแบคทีริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* subsp. *lactis* 481 ( Piard และคณะ , 1992. ) จัดเป็น lantibiotic มีฤทธิ์ในการต่อต้าน Lactococci , Lactobacillus , Leuconostoc spp. และ *Clostridium tyrobutyricum* แลคติซิน 481 ทนความร้อน 100°C 1ชั่วโมง มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,000-10,000 ดาลตัน แลคติซิน 481 จะถูกสร้างขึ้นในช่วงต้นของระยะ Stationary phase ในอาหาร EGP broth ( Elliker broth ที่เติม Sodium-$\beta$-Glycerophosphate 15 g/l )

5.สมบัติของสารต่อต้านจุลชีพ

การคัดเลือกสารต่อต้านจุลชีพมักขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความสามารถของการยับยั้งหรือหน่วงเหนี่ยวการเจริญของจุลินทรีย์ , คุณสมบัติทางเคมีของสารต่อต้านจุลชีพ การพิจารณาความสามารถในการยับยั้งจุลชีพของสารต่อต้านจุลชีพจะดูจากการเจริญของเชื้อทดสอบที่ความเข้มข้นของสารต่อต้านจุลชีพต่างๆ ( Braren และ Davidson., 1983 ) วิธีที่นิยมใช้ในการติดตามดูการเจริญ คือ Disk or Agar Well Assay ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วแต่ได้ผลไม่แน่นอน เพราะการตรวจสอบด้วยวิธีนี้จะต้องคำนึงถึง ชนิดและขนาดของแผ่นกรองหรือหลุม , ความเป็นกรด-ด่าง และ ความเข้มข้นของเกลือที่ใช้ ความสามารถในการซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อของสารต่อต้านจุลชีพ สมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อ และชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ( Davidson และ Parish., 1989 ; Braren และ Davidson., 1983 ) ปัญหาเหล่านี้ทำให้อาจต้องใช้วิธีการอื่นในการตรวจสอบ นั่นคือ การทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ( Tube Test ) โดยติดตามความขุ่นที่เกิดขึ้นภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะบอกถึงความสามารถของการต่อต้านจุลชีพต่อการเจริญของเชื้อทดสอบได้เช่นกัน และในการเลือกใช้สารต่อต้านจุลชีพในอาหารชนิดใดๆนั้น จำเป็นต้องมีการทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ของสารต่อต้านจุลชีพนั้นๆในอาหารด้วย เพราะองค์ประกอบและสมบัติของอาหารอาจจะมีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารต่อต้านจุลชีพ

สารต่อต้านจุลชีพจะมีผลในการถนอมอาหาร โดยทำหน้าที่ควบคุมการเจริญ หรือทำลายจุลินทรีย์ ซึ่งลักษณะในการทำงานของสารต่อต้านจุลชีพจะเป็นในลักษณะต่อไปนี้

1) การทำปฏิกริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ โดยทำลายความสามารถในการผ่านเข้าออก ( permeability ) และทำให้เซลล์เสียสมดุลไป
2) ทำให้เอนไซม์ที่สำคัญบางชนิดทำงานไม่ได้
3) ทำให้สารพันธุกรรมเสียรูปร่างหรือหน้าที่ไปจากเดิม

โดยปกติสารต่อต้านจุลชีพที่ทำปฏิกริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ในรูปแบบที่ไม่จำเพาะจะมีช่วงการทำงานที่กว้าง อย่างไรก็ตาม ชนิดของเยื่อหุ้มเซลล์อาจมีผลทำให้สารต่อต้านจุลชีพสูญเสียความสามารถในการทำงานได้ เช่น ความสามารถของสารต่อต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็น hydrophobic compounds จะถูกจำกัดในการเจริญของแบคทีเรียพวกแกรมลบ เนื่องจากสารต่อต้านจุลชีพชนิดนี้ไม่สามารถซึมผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์ในชั้น Lipopolysaccharide ได้

6.สมบัติทางเคมีและฟิสิกส์

สมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของสารต่อต้านจุลชีพที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ที่ควรคำนึงถึง คือ

6.1 ความมีประจุ ( polarity )

เป็นสมบัติทางฟิสิกส์ที่มีความสำคัญ สารต่อต้านจุลชีพที่ดีควรจะมีส่วนที่มีความสามารถในการละลายน้ำ ( solubility or hydrophilic properties ) ซึ่งมีความจำเป็นอย่างมากในการออกฤทธิ์ของสารต่อต้านจุลชีพ เพราะส่วนที่เป็นน้ำมักจะมีจุลินทรีย์อาศัยอยู่ อย่างไรก็ตามด้านที่ละลายน้ำได้น้อย ( hydrophobic or lipophilic properties ) ก็มีความจำเป็น เพราะจะเป็นส่วนที่ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นการที่มีลักษณะเป็น emulsifier ของสารต่อต้านจุลชีพจะทำให้สารนั้นออกฤทธิ์ได้ดี

6.2 จุดเดือด ( boiling point )

จุดเดือดมีอิทธิพลต่อการออกฤทธิ์โดยตรง โดยเฉพาะสมบัติที่คงอยู่ของสารต่อต้านจุลชีพ เนื่องจากถ้าอาหารต้องผ่านการให้ความร้อนระหว่างกระบวนการผลิตสารประกอบที่ระเหยง่าย เช่น สารประกอบฟีนอลิก ( phenolic compound ) จะระเหยและสูญเสียไประหว่างกระบวนการผลิต ซึ่งอาจทำให้สูญเสียฤทธิ์ในการต่อต้านจุลชีพ และยังทำให้เกิดกลิ่นไม่ดีกับอาหารด้วย

6.3 การแตกตัวเป็นอิออน

การแตกตัวเป็นอิออนจะขึ้นกับระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารนั้นๆ โดยปกติค่าความเป็นกรด-ด่างที่ทำให้สารต่อต้านจุลชีพมีประจุ จะทำให้มีฤทธิ์ในการทำงานน้อย แต่ถ้าไม่มีประจุ หรืออยู่ในสภาพเป็นกลาง จะสามารถผ่านผนังเซลล์เข้าทำปฏิกริยากับเซลล์ และทำลายจุลินทรีย์หรือยับยั้งการเจริญได้

6.4 ปฏิกิริยาทางเคมีของสารต่อต้านจุลชีพกับสารประกอบอื่นๆในอาหาร

สารต่อต้านจุลชีพสามารถทำปฏิกริยากับส่วนประกอบของอาหาร เช่น ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และ สารปรุงแต่งอื่นๆ ซึ่งอาจมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของสารต่อต้านจุลชีพลดลงและอาจทำให้เกิดกลิ่น รส ที่ไม่ต้องการได้

7.การใช้สารต่อต้านจุลชีพ หรือ Lactic Streptococci ที่สร้างสารต่อต้านจุลชีพใน อุตสาหกรรมอาหาร

มีการใช้แบคทีริโอซิน หรือ แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพ ในอาหารและเครื่องดื่ม เพื่อป้องกันอันตรายที่จะเกิดจากแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดความเสียหาย หรือก่อให้เกิดโรคโดยมีกำเนิดจากอาหาร นักวิจัยรายงานว่าแบคทีริโอซินจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียสามารถยับยั้งจุลินทรีย์พวกแกรมบวก รวมทั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* และ *Cl. botulinum* และอาจเพิ่มการต่อต้านแบคทีเรียพวกแกรมลบได้โดยการเติม chelating agents อื่นๆ ( Stevens และ คณะ , 1991 ; 1992 )

แบคทีริโอซินที่ได้กล่าวมาทั้งหมดนี้จะมีเพียง ไนซิน เท่านั้นที่ได้รับการยอมรับให้จัดกลุ่มในบัญชี GRAS ( Generally Recognized as Safe ) และมีการใช้มากในประเทศสหรัฐอเมริกา ( Food and Drug Administration., 1988 ) แบคทีเรียที่สามารถ สร้าง ไนซิน คือ *L. lactis* ( *S. lactis* ) ในอุตสาหกรรมการทำเนยแข็ง ใช้ไนซินเป็นสารปรุงแต่ง ( Food Additive ) ในเนยแข็งชนิดทาโดยยังคงมี activity และความเสถียรคงเดิม และพบว่าไนซินสามารถประยุกต์ใช้กับอาหารอื่นๆได้ เช่น ใช้เติมลงในผักกระป๋อง น้ำมะเขือเทศกระป๋อง เป็นต้น ( Delves - Broughton., 1990 )

การใช้แบคทีริโอซินในอาหารจำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ โครงสร้างและองค์ประกอบของอาหาร เช่น ปริมาณไขมันในอาหารจะมีผลต่อการออกฤทธิ์ของแบคทีริโอซิน จากการศึกษาพบว่า แบคทีริโอซินรวมทั้งไนซิน สามารถจับกับไขมัน จึงทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียลดลง ( Schillinger., 1991 ) นอกจากนี้ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง การมี Exogenous Enzymes เช่น โปรติเอส มีผลต่อความคงตัวของแบคทีริโอซินในอาหารหรือเครื่องดื่ม เนื่องจากแบคทีริโอซินมีค่าความเป็นกรด-ด่างในการทำงานแคบ - ดังนั้นจึงควรใช้ในอาหารหรือเครื่องดื่มที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ใกล้กับค่าที่เหมาะสมในการทำงาน เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการทำงานสูงสุด แบคทีริโอซินของแลคติกแอสิดแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นโปรตีนขนาดเล็ก ทนความร้อนจึงนิยมใช้ในอาหารที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนหรืออาหารแช่แข็ง และเนื่องจากแบคทีริโอซินเป็นสารประกอบโปรตีน ดังนั้นจึงถูกทำลายได้ด้วย Endogenous proteases หรือเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนในอาหาร ( Dasechel., 1989 )

อย่างไรก็ตามพบว่า มีความนิยมใช้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารต่อต้านจุลชีพ ในการผลิตหรือเตรียมผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆมากกว่าการเติมแบคทีริโอซินอย่างเดียว โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ใน

ผลิตภัณฑ์นม ซึ่งนิยมใช้แลคติกแอสิดแบคทีเรีย เช่น *St. lactis* , *St. cremoris* , *St. thermophilus* ในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ

การพัฒนาเทคโนโลยีทางด้านพันธุศาสตร์ในการโคลนยีนที่เกี่ยวกับการสร้างแบคทีริโอซิน หลายๆชนิดเข้าไปในแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ไม่ทำให้เกิดโรค (Joerger และ Klaenhammer., 1990) หรือ *E. coli* ( Holo และคณะ , 1991 ) ทำให้สามารถสร้าง Hybrid Bacteriocin Molecules ซึ่งทำให้แบคทีเรียสามารถสร้างแบคทีริโอซินได้หลายชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ และทนต่อสภาวะต่างๆได้มากขึ้น จึงนับว่าเป็นประโยชน์ของการพัฒนาเทคโนโลยีทางด้านพันธุกรรมและอุตสาหกรรมอาหาร

ในงานวิจัยนี้จะศึกษาเฉพาะ *Streptococcus* spp. ที่พบในน้ำนมดิบและเป็นเชื้อที่ไม่ก่อให้เกิดโรคเท่านั้น

8.<u>วัตถุประสงค์ของการทดลอง</u>

1) คัดเลือก *Streptococcus* spp. สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพจากน้ำนมดิบ
2) แยกสารต่อต้านจุลชีพและศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารต่อต้านจุลชีพ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย