หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

1. แลคติคแอสิดแบคทีเรีย

แลคติคแอสิดแบคทีเรียจัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae มีลักษณะทั้งที่เป็นท่อนยาวท่อนสั้นหรือกลม แกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ในการเจริญเติบโตส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (Microaerophile) บางชนิดเป็นพวกไม่ต้องการอากาศเลย (Strictly Anaerobe) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน (Frazier และ Westhoff, 1979) ความต้องการสารอาหารค่อนข้างสลับซับซ้อนและสมบูรณ์ (Prescott และ Dunn, 1959) เช่น ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะเจริญได้ดีในอาหารที่มี Growth Factor และ วิตามินหลายชนิดเช่น ไบโอติน (Biotin), ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) และส่วนใหญ่ต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูงเช่น แมงกานีส (Mn), แมกนีเซียม (Mg), ฟอสฟอรัส (P) (Tittsler และคณะ, 1952) แหล่งที่สามารถพบแลคติคแอสิดแบคทีเรียได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ ผลิตภัณฑ์นม อาหารหมักดองต่างๆ เป็นต้น (นภา โล่ห์ทอง, 2534) แลคติคแอสิดแบคทีเรียสามารถใช้อาหารพวกคาร์โบไฮเดรทและเปลี่ยนเป็นกรดแลคติค แบคทีเรียในตระกูลนี้สามารถแบ่งได้ 5 สกุล (Genus) (Buchanan และ Gibbons, 1974) ได้แก่

1. Genus *Streptococcus* (*Lactococcus*) แลคติคแอสิดแบคทีเรียชนิดนี้มีลักษณะกลมแบบ Cocci หรือรูปรีแบบ Oval ขนาดประมาณ 0.5-1.0 µm จะพบเป็นคู่หรือเป็นสาย มีทั้งพวกที่ต้องการอากาศ (Aerobe) หรือพวกต้องการอากาศเล็กน้อย (Microaerophile) *Streptococcus* จัดอยู่ในกลุ่ม Homofermentative Lactic Acid Bacteria เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมนมคือ ใช้ในการเตรียมเนยเนยแข็งและนมเปรี้ยว

2. Genus *Leuconostoc* แลคติคแอสิดแบคทีเรียชนิดนี้มีรูปร่างกลม (Cocci) จะพบเป็นคู่หรือเป็นสาย มีทั้งพวกที่ไม่ต้องการอากาศ (Anaerobe) หรือพวกที่ต้องการอากาศเล็กน้อย (Microaerophile) *Leuconostoc* จัดอยู่ในกลุ่ม Heterofermentative Lactic Acid Bacteria สามารถพบได้ทั่วๆไปในธรรมชาติ เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อการเริ่มต้นขบวนการหมักพวกผัก มีบางสายพันธุ์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นม เนื่องจากส่วนใหญ่ *Leuconostoc* จะเจริญในน้ำนมได้ช้าจึงไม่เหมาะในการใช้เป็นหัวเชื้อเพื่อผลิตกรด แต่มีสมบัติพิเศษที่สามารถเมตาโบไลซ์ได้เป็นสารพวกไดอะเซติล (Diacetyl) อะซิโตอิน (Acetoin) จึงมักนิยมใช้เพื่อผลิตสารที่มีกลิ่นหอม (นภา โลห์ทอง, 2522)

3. Genus *Pediococcus* แลคติคแอสิดแบคทีเรียชนิดนี้มีรูปร่างกลม (Cocci) ซึ่งอาจอยู่เป็นคู่ (Pairs) หรือกลุ่ม (Tetrads) จัดเป็นพวกที่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (Microaerophile) และเป็น Homofermentative Lactic Acid Bacteria ลักษณะพิเศษคือสามารถสร้าง Racemic (DL) Lactic Acid จากน้ำตาลกลูโคส แบคทีเรียพวกนี้มักพบในอาหารพวกผัก เนื้อ(ไส้กรอกเปรี้ยว) เป็นต้น

4. Genus *Lactobacillus* แลคติคแอสิดแบคทีเรียชนิดนี้อาจพบรูปร่างหลายแบบ เช่น Coccobacilli, Bent Rods, Coryneform หรือ Thread-Like จะเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ (Aerobe) หรือต้องการอากาศเล็กน้อย (Microaerophile) มีทั้งพวกที่เป็น Homofermentative และ Heterofermentative Lactic Acid Bacteria

5. Genus *Bifidobacterium* แลคติคแอสิดแบคทีเรียชนิดนี้มีการค้นพบในปี 1899 (Tissier และคณะ, 1899) ที่แยกจากอุจจาระเด็กทารกสุขภาพสมบูรณ์ที่ดื่มนมมารดา แต่เดิมเรียกว่า *Bacillus bifidum* ต่อมาเมื่อมีการศึกษาอย่างกว้างขวางจึงตั้งชื่อว่า *Bifidobacterium* สามารถพบได้หลายรูปร่างเช่น รูปตัว Y, V, Bent, Club จะไม่พบในลักษณะที่เป็นสายยาว เจริญได้ใน Obligately Anaerobe จัดเป็นพวก Heterofermentative Lactic Acid Bacteria ลักษณะพิเศษของ *Bifidobacterium* คือสามารถให้กรดแลคติค 1 โมลและกรดอะซิติค 1.5 โมลจากน้ำตาลกลูโคส 1 โมล

ดังสรุปรายละเอียดของการจัดกลุ่มแลคติคแอสิดแบคทีเรีย (ล.อ.บ.)ในตารางที่ 1.1

แลคติคแอสิดแบคทีเรียสามารถแบ่งตามลักษณะการหมักได้เป็น 2 กลุ่ม

1. Homofermentative Lactic Acid Bacteria คือ แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ตัว ให้กรดแลคติค 85-95 % ส่วนที่เหลืออาจนำไปใช้เพื่อให้พลังงาน เช่น *Lactobacillus acidophilus* (Lawrence และ Terence, 1979)

2. Heterofermentative Lactic Acid Bacteria คือ แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ตัว ให้กรดแลคติคประมาณ 50 % ส่วนที่เหลือเป็นกรดอะซิติคและเอธิลอัลกอฮอล์ 20-25 % และสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ 20-25 % เช่น *Leuconostoc mesenteroides* (Tamine, 1981)

ตารางที่ 1.1 แสดงการจัดกลุ่มของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

Genus	Morphology	Type of Lactic Acid Fermentation
Streptococcus (*Lactococcus*)	pairs or chains of cocci	Homofermentation
Pediococcus	chains of 4 cocci	Homofermentation
Leuconostoc	pairs or chains of cocci	Heterofermentation
Lactobacillus	rods	Homofermentation and Heterofermentation
Bifidobacterium	rods, polymorphic	Heterofermentation

ในปี ค.ศ. 1988 ได้มีการเสนอให้เปลี่ยนสกุล *Streptococcus* เป็นสกุล *Lactococcus* โดยยังคง species และ subspecies ไว้ตามเดิม (Sandine,1988) ซึ่งได้รับการยอมรับจาก International Union of Microbiology Societies ตัวอย่างของแบคทีเรียสกุลนี้ได้แก่ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (*Streptococcus lactis* subsp. *lactis*), *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* (*S. lactis* subsp. *diacetylactis*), *L. lactis* subsp. *cremoris* (*S. lactis* subsp. *cremoris*) อย่างไรก็ตามยังคงปรากฏชื่อ *Streptococcus lactis* ทั้งสาม subsp. ใน Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology เล่มล่าสุด (Schleifer, 1986)

แลคติคแอสิดแบคทีเรียนอกจากจะมีบทบาทที่สำคัญในการผลิตอาหารต่างๆ ดังกล่าวมาแล้วยังมีบทบาทอื่นๆ ที่สำคัญเช่น ใช้เป็นจุลชีพทดสอบ (Test Organism) ในการวิเคราะห์วิตามิน (Frazier และ Westhoff, 1979) บางสายพันธุ์อาจใช้เป็นอาหารเสริมในอาหารสัตว์แทนการใช้สารปฏิชีวนะ (เพิ่มพงศ์ ศรีประเสริฐศักดิ์, 2524)

2. กระบวนการหมักกรดแลคติค (Lactic Acid Fermentation)

เนื่องจากอาหารจะเป็นแหล่งที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้อย่างดี สำหรับการเจริญเติบโต กระบวนการหมักของอาหารทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารอาหาร เนื่องมาจากการกระทำของเอนไซม์ ซึ่งอาจจะเป็นเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่เกี่ยวกับกระบวนการหมักหรือเอนไซม์ที่มีอยู่ในอาหารนั้นๆ โดยทั่วไปในกระบวนการหมักจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องมักเป็นจุลินทรีย์จากธรรมชาติ แต่ในบางครั้งทางโรงงานอุตสาหกรรมจะมีการคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีรส กลิ่นและเนื้อสัมผัสตามต้องการ

สำหรับกระบวนการหมักที่เกิดกรดแลคติคจะมีระดับความเป็นกรดสูง เนื่องจากมีค่า pH ต่ำ ประสิทธิภาพการเกิด Oxidation-Reduction ก็จะต่ำทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ต้องการในกระบวนการหมักกรดแลคติค

ในอุตสาหกรรมอาหารกระบวนการหมักกรดแลคติคจะมีแบคทีเรียสำคัญหลายชนิด เช่น อุตสาหกรรมการหมัก ผัก ผลไม้ และ ธัญพืชจะมี *Lactobacillus plantarum, Lb. helveticus, Lb. fermenti, Leuconostoc mesenteroides* อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นมจะมี *Lb. bulgaricus, Lb. thermophilus, Lb. casei* ในอุตสาหกรรมการหมักเนื้อจะมี *Lb. plantarum* เป็นต้น

กระบวนการหมักที่เกิดกรดแลคติคที่สำคัญมี 2 กระบวนการคือ

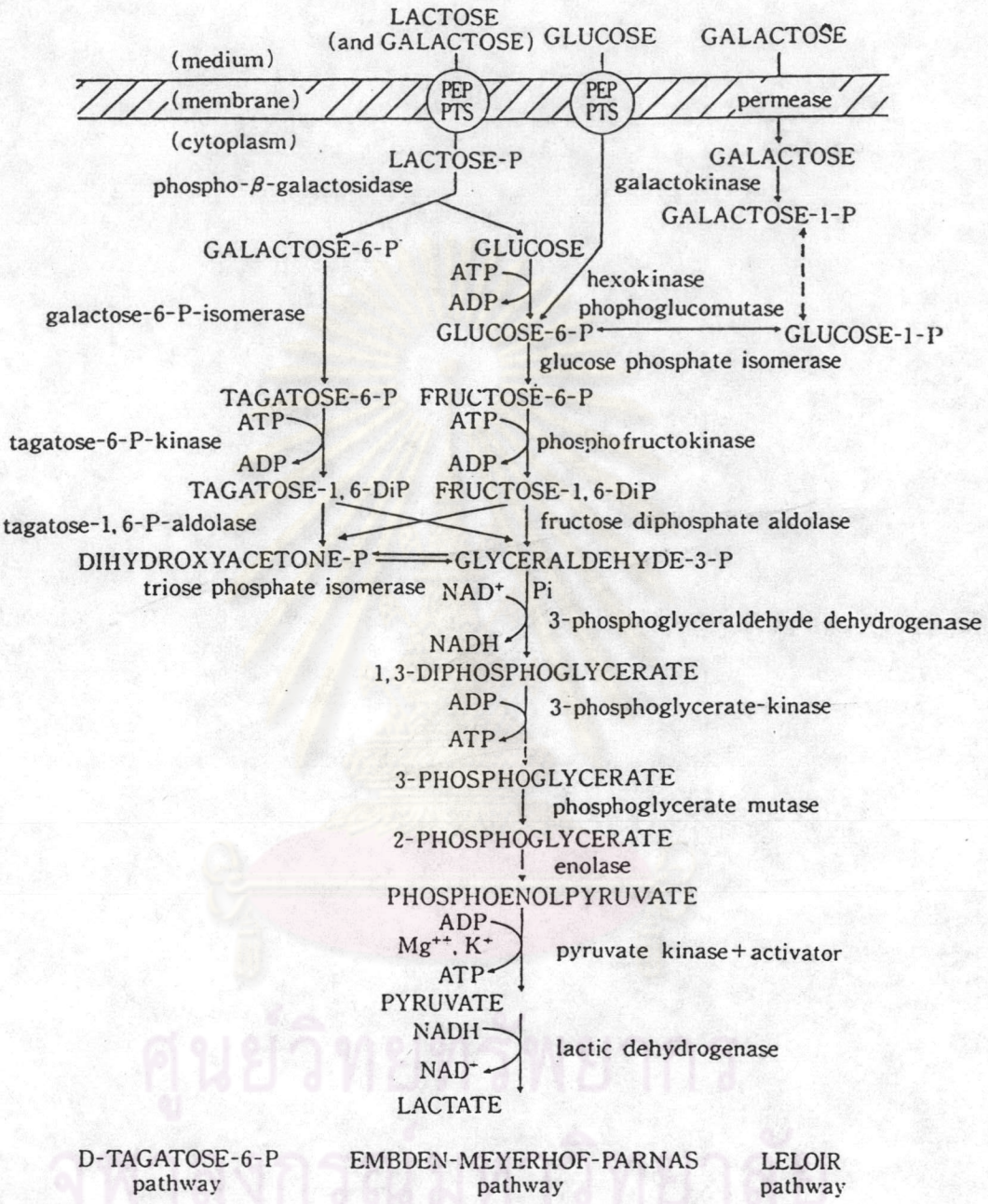
1. Homofermentation

เป็นกระบวนการที่เกิดกรดแลคติคเป็นส่วนใหญ่จากจุลินทรีย์พวก Homofermentative Lactic Acid Bacteria ขั้นตอนการสร้างกรดแลคติคเริ่มจากน้ำตาลแลคโตสจะผ่านเข้าสู่เซลล์ของแลคติคแอลิดแบคทีเรีย (ล.อ.บ.) โดยอาศัยเอนไซม์ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มไซโตพลาซึม (Cytoplasmic Membrane) ที่เรียกว่า Phosphoenol-Pyruvate-Dependent Phosphotransferase System (PEP-PTS) ทำให้แลคโตสเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่ฟอสเฟต (Phosphorylation) อยู่ในรูป Lactose-6-Phosphate จากนั้นจะถูกเอนไซม์ Phospho-β-Galactosidase ไฮโดรไลซ์ได้เป็น Galactose-6-Phosphate กับ Glucose ซึ่งกลูโคสจะผ่านเข้าสู่กระบวนการต่างๆของ Embden-Meyerhof-Parnas Pathway: EMP Pathway) จนได้เป็น Lactate ในขั้นตอนสุดท้ายซึ่งเปลี่ยนมาจาก Pyruvate โดยเอนไซม์ Lactic Dehydrogenase ส่วน Galactose-6-Phosphate จะเข้าสู่กระบวนการต่างๆใน D-Tagatose-6-Phosphate Pathway ได้เป็น Tagatose-1,6-Diphosphate และเปลี่ยนเป็น Dihydroxyacetone-Phosphate ท้ายสุดโดยเอนไซม์ Tagatose-1,6-Aldolase ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น Glyceraldehyde-3-Phosphate โดยเอนไซม์ Triose Phosphate Isomerase ซึ่ง Glyceraldehyde-3-Phosphate เป็นสารตัวกลางในกระบวนการ EMP Pathway และเปลี่ยนเป็น Lactate ในที่สุด

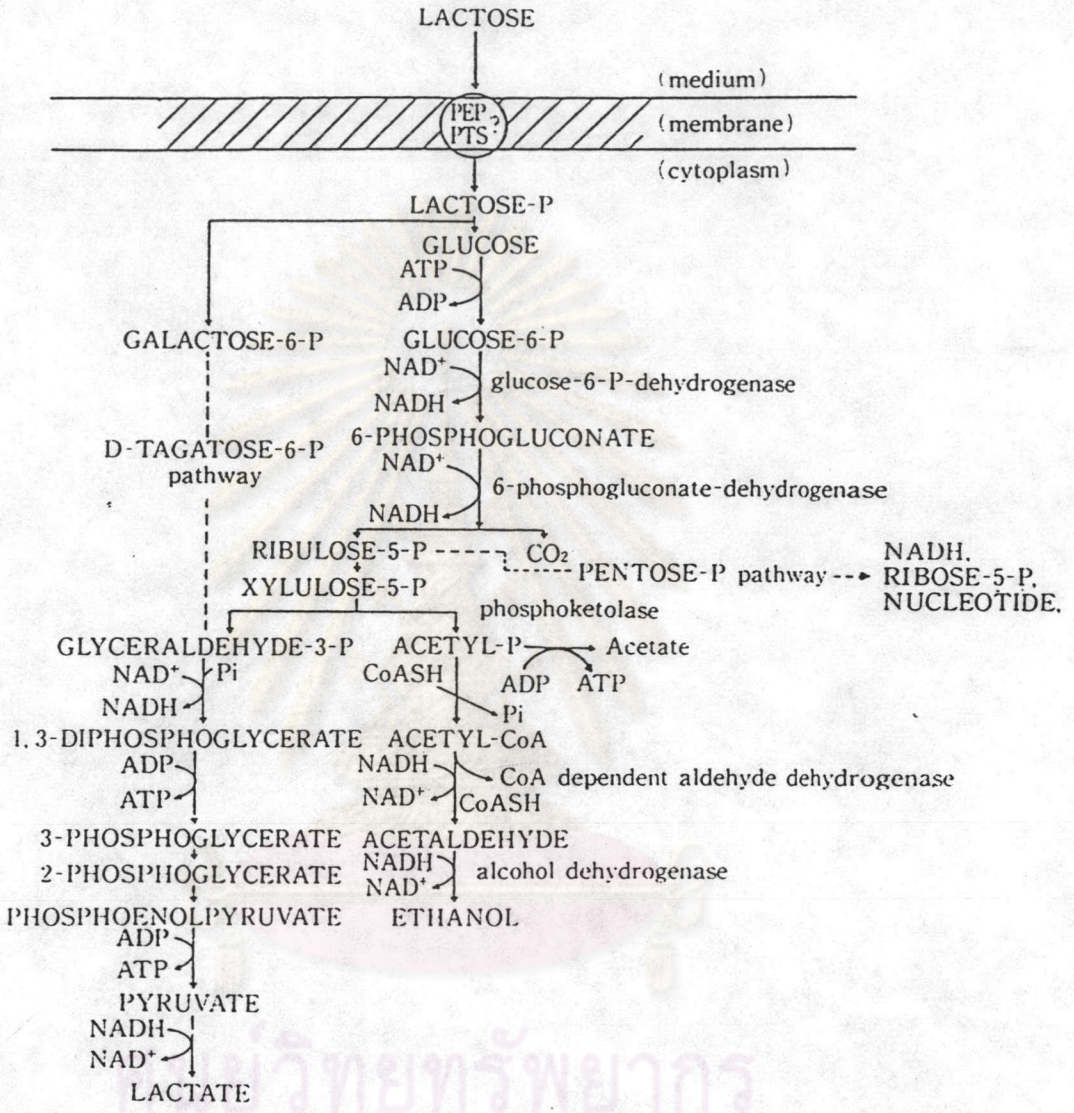
น้ำตาลกลูโคสจะสามารถเข้าสู่เซลล์ของ ล.อ.บ. โดยอาศัยเอนไซม์ PEP-PTS ทำให้กลูโคสอยู่ในรูป Glucose-6-Phosphate ซึ่งจะเข้าสู่ EMP Pathway ได้เป็น Lactate ในที่สุด ส่วนน้ำตาลกาแลคโตสจะสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลเมมเบรนได้เลย หลังจากถูกเติมหมู่ฟอสเฟตโดยเอนไซม์ Galactokinase ได้เป็น Galactose-1-Phosphate จากนั้นเข้าสู่ Leloir Pathway จนได้เป็น Glucose-1-Phosphate จากนั้นจะถูกเอนไซม์ Hexokinase Phosphoglucomutase เปลี่ยนเป็น Glucose-6-Phosphate ซึ่งเป็นตัวกลางใน EMP Pathway เปลี่ยนเป็น Lactate ในที่สุด แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่มีกระบวนการหมักแบบนี้ได้แก่ *Lb. bulgaricus, Lb. casei, Lb. plantarum* เป็นต้น (ดังแสดงในรูปที่ 1.1)

2. Heterofermentation

เป็นกระบวนการที่เกิดกรดแลคติคประมาณ 50 % และจะได้ผลิตภัณฑ์อื่นร่วมด้วย เช่น กรดอะซิติค เอธิลอัลกอฮอล์ และ คาร์บอนไดออกไซด์ โดยจุลชีพพวก Heterofermentative Lactic Acid Bacteria ซึ่ง ล.อ.บ. ในกลุ่มนี้จะไม่มีเอนไซม์ Aldolase ซึ่งเป็นเอนไซม์หนึ่งในกระบวนการ Glycolysis จึงทำให้ไม่สามารถย่อย Fructose-1,6-Diphosphate เป็น Triose-Phosphate จึงต้องออกซิไดซ์ Glucose-6-Phosphate ได้เป็น 6-Phosphogluconate จากนั้นเกิดปฏิกิริยา Decaboxylate ได้เป็น Pentose-Phosphate กับ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่ง Pentose-Phosphate จะแตกตัวเป็น Triose-Phosphate และ Acetyl-Phosphate โดยเอนไซม์ Phosphoketolase โดยที่ Triose-Phosphate จะเปลี่ยนเป็น Lactate ได้ ส่วน Acetyl-Phosphate จะเปลี่ยนเป็น Acetaldehyde และ Ethanol นอกจากนี้ ล.อ.บ. อาจจะใช้กระบวนการอื่นๆในการสร้างผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น กรดอะซิติค กรดฟอร์มิก กลีเซอรอล เป็นต้น แบคทีเรียที่มีกระบวนการหมักแบบนี้เช่น *Leuconostoc mesenteroides* เป็นต้น (ดังแสดงในรูปที่ 1.2)

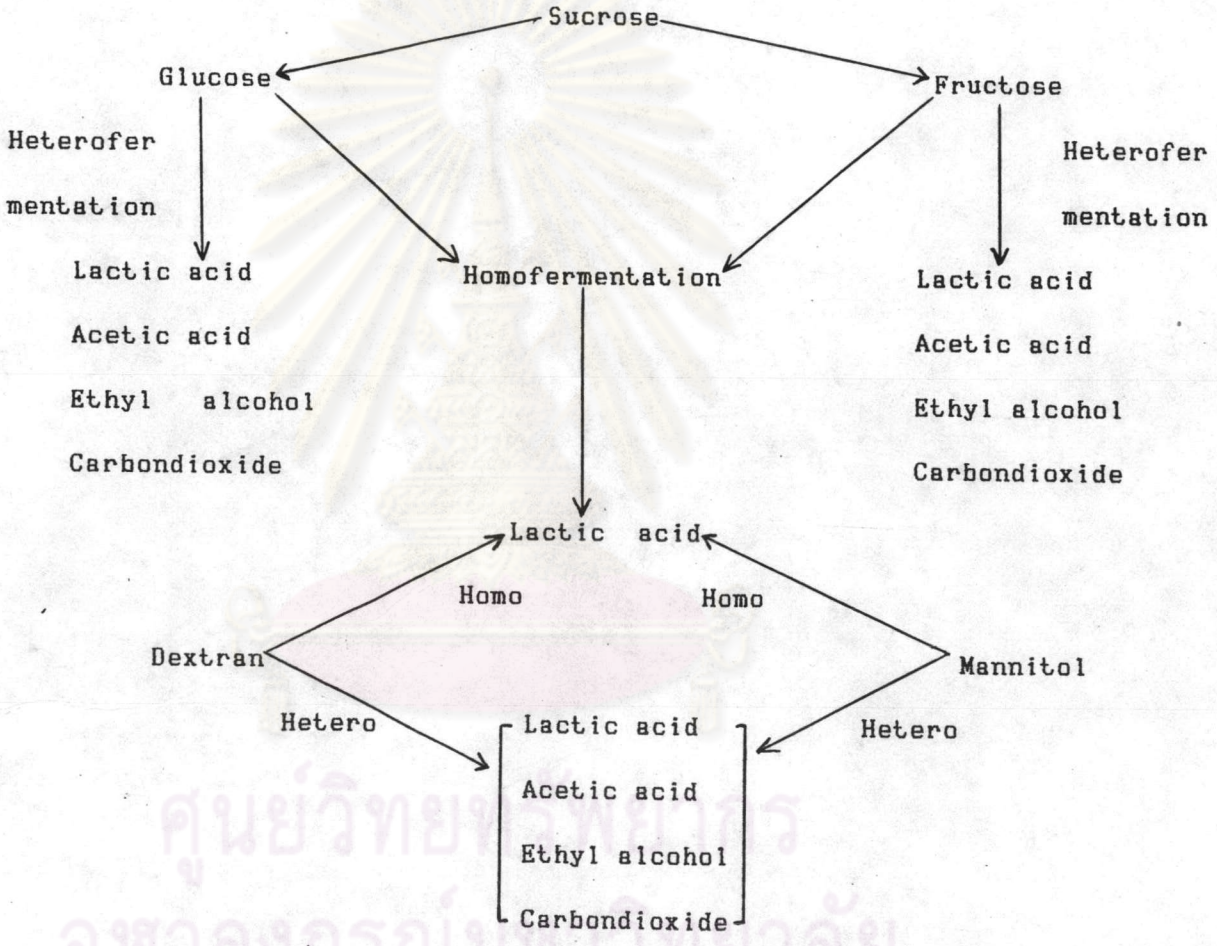


รูปที่ 1.1 แสดงการใช้น้ำตาลของพวก Homofermentative Lactic Acid Bacteria



รูปที่ 1.2 แสดงการใช้น้ำตาลของพวก Heterofermentative Lactic Acid Bacteria

ในกระบวนการหมักของอาหารจำพวกผักมีทั้ง Homofermentative และ Heterofermentative Lactic Acid Bacteria (ดังแสดงในรูปที่รูปที่ 1.3) นอกจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียจะผลิตกรดแลคติคแล้ว บางครั้งจะได้สารประกอบอื่นๆด้วยเช่น ถ้าหากมีน้ำตาลฟรุทโตสจะสามารถเปลี่ยนเป็น กรดแลคติค, แมนนิทอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ถ้าหากมีน้ำตาลซูโคสจะได้เดกซ์แทน หรือถ้ามีน้ำตาลไรโบสจะได้กรดอะซิติคเป็นผลพลอยได้



รูปที่ 1.3 แสดงสารเคมีที่สามารถพบในกระบวนการหมักน้ำตาลที่มีทั้ง Homofermentative และ Heterofermentative Lactic Acid Bacteria (อรพิณ ภูมิภมร, 2523)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ผักดองเปรี้ยวของไทย

ผักดองเปรี้ยวที่นิยมทั่วไปของไทยมี ผักกาดเขียวดอง หน่อไม้ดอง ผักเสี้ยนดองและต้นหอมดอง เป็นต้น โดยวิธีการดองผักของคนไทยมักจะเป็นกรรมวิธีชาวบ้านและทำกันในครัวเรือนเพื่อเก็บไว้เป็นอาหารกินได้นานๆเช่น หน่อไม้ดอง ชาวบ้านมักจะเก็บหน่อไม้มาจากป่าในฤดูฝนซึ่งมีจำนวนมากนำมาทำการดองเปรี้ยวและ เก็บไว้รับประทานเองหรือส่งขายไปยังสถานที่ต่างๆ

ผักกาดเขียวดอง

ผักกาดเขียว (Leaf Mustard) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Brassica juncea* เป็นพืชในตระกูล Cruciferae มีการศึกษาเกี่ยวกับการดองน้อยมาก กรรมวิธีโดยทั่วๆไปที่ชาวบ้านทำกัน โดยนำผักกาดเขียวมาริดใบที่มีตำหนิออกไป ล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้งในกะโล่จนผักเหี่ยวใช้เวลาประมาณ 6 ชม. จากนั้นนำมาผสมเกลือ 2.5 % บรรจุในภาชนะทิ้งไว้ 12 ชม. จะมีน้ำออกมาจากการหมักเกลือ เทน้ำออก เติมน้ำตาลหรือข้าวลงไป 3 % ทิ้งให้มีกระบวนการหมักเกิดขึ้นที่อุณหภูมิห้องนาน 3-5 วัน จะได้ผักกาดดองเปรี้ยว การใส่น้ำตาลหรือข้าวลงไปเพื่อให้เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรทต่อพวกแลคติคแอสิดแบคทีเรียเปลี่ยนเป็นกรดแลคติค

มิ่งขวัญ มิ่งเมือง (2517) ทำการดองผักกาดเขียวโดยใช้เกลือ 50-60 กรัม น้ำตาลหรือข้าว 60 กรัม น้ำ 1-2 ลิตรต่อผัก 1 กก. พบว่าผักดองจะใช้รับประทานได้เมื่อดองนาน 72 ชม. มีปริมาณกรด 0.7 % จุลินทรีย์ที่พบในการดองผักมีทั้ง Homofermentative และ Heterofermentative Lactic Acid Bacteria โดยในระยะเริ่มแรกของการหมักแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเป็น Heterofermentative Rod ได้แก่ *Lb. brevis* และ *Lactobacillus* sp. อื่นๆ ในระยะต่อมาจะพบแบคทีเรียพวก Homofermentative Cocci ได้แก่ *Pediococcus cerevisiae* และช่วงหลังการดองจะเป็นพวก Homofermentative Rod ได้แก่ *Lb. plantarum*

หน่อไม้ดองเปรี้ยว

หน่อไม้ (Bamboo Shoot) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Bambusa burmanica* หน่อไม้ดองเปรี้ยวมักจะทำกันในฤดูที่มีหน่อไม้มาก ซึ่งอยู่ในช่วงฤดูฝนโดยมักดองอัดใส่ปีปหรือไหไว้ สามารถเก็บไว้รับประทานเป็นปี กรรมวิธีการดองคือนำหน่อไม้เอามาตัดส่วนแข็งๆออก ล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นบางๆ ถ้าหน่อเล็กอาจดองทั้งหน่อก็ได้ ผสมน้ำเกลือ 2 % บรรจุใส่ไหดินไว้ โดยมีของหนักทับให้หน่อไม้จมอยู่ใต้น้ำเกลือ หมักที่อุณหภูมิห้องนาน 3-4 สัปดาห์ บางครั้งอาจเติมน้ำซาวข้าวลงไปเพื่อให้กระบวนการหมักเร็วขึ้น หน่อไม้ดองเปรี้ยวที่เหมาะต่อการนำมารับประทานจะมีกรดแลคติคประมาณ 0.98-1.16 %

Dhavises, (1972) รายงานว่าจุลินทรีย์ที่พบในระหว่างการดองหน่อไม้เปรี้ยวมีทั้ง Homofermentative และ Heterofermentative Lactic Acid Bacteria โดยระยะเริ่มหมักจะเป็น Homofermentative Cocci คือ *Pediococcus cerevisiae* ในชั่วโมงที่ 6 ของการหมักจะพบ Homofermentative Rod คือ *Lb. plantarum* ส่วนในระยะสุดท้ายจะพบพวก Heterofermentative Rod คือ *Lb. brevis* นอกจากนี้ยังมี *Lb. buchneri*, *Lb. fermenti* และ *Leuconostoc mesenteriodes*

4. ผลิตภัณฑ์จากการหมักเนื้อสัตว์

อาหารหมักที่ใช้เนื้อสัตว์เป็นวัตถุดิบและเกี่ยวข้องกับแลคติคแอสิดแบคทีเรีย ที่พบในประเทศไทยและเรารู้จักดีคือ แหนมและไส้กรอกเปรี้ยว ซึ่งอาจจะจัดอยู่ในประเภทเดียวกันกับไส้กรอกหมัก ของต่างประเทศ แต่มีกรรมวิธีแตกต่างกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไส้กรอกเปรี้ยว

เป็นอาหารพื้นบ้านของไทยที่นิยมบริโภคทั่วไป มักเป็นการผลิตในระดับครัวเรือน เพราะมีกรรมวิธีการผลิตง่าย ต้นทุนต่ำแต่สูตรในการทำยังไม่ค่อยมีการเปิดเผยนัก ส่วนประกอบของไส้กรอกเปรี้ยวที่สำคัญคือ เนื้อหมูสด มันหมู หนังหมู มีการเติมข้าวสุกลงไปด้วยเพื่อเพิ่มสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรทให้กับจุลินทรีย์และลดต้นทุนการผลิต ใส่น้ำตาลเพื่อให้จุลินทรีย์เปลี่ยนเป็นกรดเกิดการหมักได้เร็วขึ้น ใส่เกลือเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดที่ทำให้เกิดอาหารเน่าเสีย และช่วยเพิ่มกลิ่นรสให้ดียิ่งขึ้น ใส่เพคพาวเดอร์ (Praque powder) ซึ่งเป็นสารผสมของไนเตรท และ ไนไตรท์ ในอัตราส่วน 100:1 ผงนี้ทำให้เกิดสีแดงและรักษาสีแดงของเนื้อให้คงอยู่ โดยปรกติเนื้อจะมีไมโอโกลบิน (Myoglobin) เมื่อถูกกับอากาศจะกลายเป็นออกซีไมโอโกลบิน (Oxymyoglobin) ที่มีสีแดง ถ้าถูกออกซิไดซ์ต่อไปจะได้เมทไมโอโกลบิน (Metmyoglobin) ที่มีสีน้ำตาลคล้ำ แต่ถ้าเติมเพคพาวเดอร์ที่มีไนเตรทและไนไตรท์จะทำให้เนื้อมีสีแดง เพราะจะทำให้เกิดไนตริกออกไซด์ (Nitricoxide) ที่ไปรวมตัวกับไมโอโกลบินได้เป็น ไนโตรโซไมโอโกลบิน (Nitrosomyoglobin) ที่มีสีแดงไม่เปลี่ยนแปลงแต่ปริมาณไนไตรท์ในอาหารตามกฎหมายกำหนดไม่ให้เกิน 200 ppm. ในรูปของเกลือโซเดียมหรือโปตัสเซียมไนไตรท์ เนื่องจากไนไตรท์ที่มีมากเกินพอจะสามารถรวมตัวกับเอมีน (Amine) กลายเป็นไนโตรซามีน (Nitrosamine) ที่อาจทำให้เกิดมะเร็ง นอกจากนี้ยังมีเครื่องปรุงรสต่างๆ เช่น เครื่องเทศ และผงชูรสเพื่อเพิ่มรสชาติ ไส้ที่บรรจุมักจะใช้ไส้แท้ของหมูโดยนำมาล้างน้ำให้สะอาด ขูดเมือกและสิ่งสกปรกออก ล้างน้ำอีกครั้งแล้วอาจนำมาใช้ได้เลย หรืออาจจะไปหมักกับเกลือผึ่งให้แห้งก็ได้ จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการทำไส้กรอกเปรี้ยวจะมีพวก Lactobacilli และ Streptococci ซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 45 °ซ ค่า pH ต่ำกว่า 4.6 ใช้เวลาประมาณ 6 วัน การเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีผลทำให้แบคทีเรียแกรมลบและพวก Coliform ลดจำนวนลงเนื่องจาก pH ไม่เหมาะต่อการเจริญ (Lucke, 1985)

แหนม

แหนมหรือหมูส้มเป็นอาหารหมักประเภทเนื้อชนิดหนึ่งของไทย (Sundhakul และคณะ, 1975) เป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายในทุกภาคของประเทศ ได้จากการนำเนื้อหมูบดละเอียดผสมกับหนังหมู เครื่องเทศต่างๆ เช่น เกลือ ดินประสิว กระเทียม ข้าวสุก พริกไทย พริกขี้หนู นำส่วนผสมต่างๆ มาเคล้าให้เข้ากัน ห่อด้วยพลาสติกหรือใบตองให้แน่นป้องกันอากาศ เข้าบ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-4 วันก็สามารถนำไปบริโภคได้ จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักนี้ได้แก่พวก *Pediococcus* และ *Lactobacillus* (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2518) โดยที่ในช่วง 24 ชม. หลังการหมักจะมีจุลินทรีย์ที่สร้างกรดได้ดีและเจริญในสภาวะที่มีอากาศน้อยพวก Heterofermentative Lactobacilli เจริญไปพร้อมๆกับ Homofermentative Lactobacilli ได้แก่ *Pediococcus cerevisiae* และ *P. acidilactici* (Tanasupawat และ Daengsubha, 1983) หลังจาก 72 ชม. ไปแล้วจะพบพวก Homofermentative Lactobacilli ได้แก่ *Lb. plantarum* ที่จะเจริญและสร้างกรดต่อมา ในกรณีที่ยังเหลือ *Pediococcus* และ Heterofermentative Lactobacillus อยู่บ้างในวันที่ 4 จะมีค่าความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 4.5 และมีกรดแลคติคสูงกว่า 0.5 % ซึ่งจะทำให้จุลินทรีย์บางชนิดรวมทั้งแบคทีเรียพวกโคลิฟอร์มและซัลโมเนลลาตายเกือบหมด (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2518; สุขใจ โสมะฐิติ, 2525)

5. โยเกิร์ต

โยเกิร์ตเป็นผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวที่มีแหล่งกำเนิดในคาบสมุทรบอลข่านเขตตะวันออกกลางในประเทศบัลกาเรียซึ่งเรียกว่า ยาเอิร์ต (Yaourt) ก่อนปี ค.ศ. 1950 โยเกิร์ตยังไม่เป็นที่นิยมในประเทศแถบยุโรปตะวันตกและอเมริกาเหนือเท่าใดนัก เนื่องจากโยเกิร์ตแบบจืดจะมีกรดสูง เปรี้ยวจัดเกินไปไม่เป็นที่นิยม ต่อมาในปี ค.ศ. 1960 ได้มีการพัฒนาอุตสาหกรรมโยเกิร์ตในประเทศสวิสเซอร์แลนด์โดยทำออกมาสู่ตลาดหลายลักษณะ เช่น โยเกิร์ตเจือผลไม้

(Fruit flavoured yogurt) และโยเกิร์ตหวาน (Sweetened yogurt) หลังจากนั้นโยเกิร์ตก็เป็นที่นิยมบริโภคและแพร่หลายสู่ประเทศต่างๆทั่วโลก

นมเปรี้ยวในที่ต่างๆจะมีชื่อเรียกแตกต่างกันเช่น อินเดียเรียกว่า ดะฮี (Dahi) ซึ่งทำจากนมโคหรือนมกระบือ รัสเซียเรียกว่า คูมิส (Kumiss) ทำจากนมม้าซึ่งมีปริมาณน้ำตาลแลคโตสสูง ในคูมิสจะมีอัลกอฮอล์ จะมีมากหรือน้อยตามสภาพการหมัก บางแห่งจะมีการกลั่นได้กลิ่นคล้ายบรั่นดี เช่นเดียวกับคีเฟอร์ ที่เป็นนมเปรี้ยวทำมาจากนมโค แพะ แกะ ซึ่งจะมีอัลกอฮอลล์ปนอยู่ลักษณะเหนียวข้น และเป็นเม็ดคล้ายเมล็ดข้าวโพด

เชื้อโยเกิร์ตประกอบด้วยแลคติคแอสิดแบคทีเรีย 2 ชนิดคือ *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ซึ่ง ล.อ.บ. ทั้ง 2 ตัวนี้เป็นแบคทีเรียทนร้อน (Thermophilic Lactic Acid Bacteria) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40-45 °ซ และเจริญเป็นแบบซิมไบโอซิส (Symbiosis) จากรายงานของ Oral Jensen (1931) พบว่า *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ทั้งในกรณีที่เลี้ยงร่วมกับ S. *salivarius* subsp. *thermophilus* หรือเลี้ยงแยกกันจะมีจำนวนเซลล์ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ S. *salivarius* subsp. *thermophilus* จะมีจำนวนเซลล์จากการเลี้ยงแบบผสมมากกว่าการเลี้ยงแต่ละเชื้อแยกกัน โดยเมื่อเลี้ยงรวมกัน S. *salivarius* subsp. *thermophilus* จะเติบโตในขั้นแรกหลังจากใส่หัวเชื้อลงไปประมาณ 1 ชม. เชื้อพวกนี้จะสร้างกรดเมื่อสร้างกรดมากขึ้น *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* จะเริ่มเติบโตและผลิตกรดและมีการย่อยสลายเคซีน ทำให้เกิดกรดอะมิโนจำเป็นคือ วาลีน กรดอะมิโนจำเป็นนี้จะช่วยเร่งการเจริญของพวกที่มีรูปร่างกลม ส่วนพวกที่มีรูปร่างแท่งที่เจริญและสร้างกรดในช่วงหลัง เมื่อความเป็นกรดลดลงจาก pH 6.4 เป็น 4.4-4.2 หลังการบ่ม 4-5 ชม. น้ำตาลแลคโตสประมาณ 90 % จะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวทและเปลี่ยนเป็นกรดแลคติคในที่สุด แต่ไพรูเวทบางส่วนจะเปลี่ยนเป็นอะเซททาลดีไฮด์ และ ไดอะเซททิล ซึ่งเป็นกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ยังสามารถผลิตอะเซททาลดีไฮด์ได้ด้วย (Marshall, 1986) การที่เชื้อทั้ง 2 ชนิดของโยเกิร์ตสามารถเจริญร่วมกันได้ เนื่องมา

จากต่างก็สร้างสารกระตุ้นการเจริญเติบโตให้กันและกัน ทำให้แบคทีเรียทั้ง 2 ขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วและก่อให้เกิดประโยชน์ต่อคุณสมบัติของโยเกิร์ต

การทำโยเกิร์ตรับประทานเองอย่างง่ายๆในบ้าน นำน้ำนมสดที่ขายในท้องตลาดถ้านมจืดใส่น้ำตาลประมาณ 5 % นมผงพร่องมันเนย 5 % เพื่อเพิ่มปริมาณ solid content ซึ่งทำให้ลักษณะตะกอนของผลิตภัณฑ์คงตัวดีขึ้น (Silliker, 1980) ถ้าเป็นนมหวานก็ลดปริมาณน้ำตาลลง นำส่วนผสมมาปั่นให้เข้ากันแล้วอุ่นในหม้อน้ำเดือดจนนมมีอุณหภูมิประมาณ 70-80 °ซ นาน 30 นาที ยกลงทิ้งให้นมเย็นประมาณ 42 °ซ เติมหัวเชื้อโยเกิร์ตโดยอาจจะใช้โยเกิร์ตครีมรสธรรมชาติที่เพิ่งวางตลาด (เพื่อความสดใหม่) ประมาณ 3 % เทใส่ภาชนะปิดให้สนิทตั้งทิ้งจนได้โยเกิร์ตที่มีเนื้อข้นแข็งคล้ายเต้าฮวยสีขาว รสเปรี้ยว พร้อมกินได้ทันที

การรับประทานโยเกิร์ตจะมีประโยชน์อย่างมากสำหรับคนที่มีอาการแพ้หลังจากดื่มนมเข้าไปแล้วมีอาการท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน เพราะร่างกายขาดเอนไซม์แลคเตส (Lactase) ย่อยน้ำตาลแลคโตสในนม ซึ่งมักพบในหมู่ชนชาวเอเชียมากกว่าชนชาติตะวันตก โยเกิร์ตจึงเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้ที่ดื่มนมไม่ได้ เพราะจุลินทรีย์ในโยเกิร์ตจะย่อยน้ำตาลแลคโตสในน้ำนมไปแล้ว

6. การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆโดยแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

มีรายงานเป็นจำนวนมากกล่าวถึง ความสามารถของสารที่สร้างโดยแลคติคแอสิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย และเกิดโรคในผู้บริโภคโดยสารที่แลคติคแอสิดแบคทีเรียสามารถสร้างได้แก่

1. กรดอินทรีย์

การสะสมของกรดอินทรีย์ซึ่งจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงในช่วงเริ่มต้นของการหมักจะมีผลต่อจุลินทรีย์บางชนิดที่ไม่สามารถทนกรดเช่น *Bacillus* sp., *Escherichia*

coli, *Pseudomonas* sp. เป็นต้น กรดอินทรีย์จะมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยการยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมที่จำเป็นต่อการดำรงชีพ กรดอินทรีย์ที่อยู่ในรูปไม่แตกตัวจะสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้และแตกตัวเป็นอิออนภายใน ทำให้ระดับความเป็นกรดด่างภายในเซลล์ลดลงหรืออาจเกิดปฏิกิริยากับเซลล์มีผลทำลายเซลล์หรือ หน่วงเหนี่ยวการเจริญของจุลินทรีย์นั้นๆ

Ingram, Ottowan และ Coppock (1956) ได้กล่าวว่า ปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อกลไกการถนอมอาหารที่เป็นกรดมี 3 ประการ คือ ผลของความเป็นกรดด่าง ผลของกรดอินทรีย์ และ ผลจำเพาะต่อโมเลกุลของเซลล์ Sorrel และ Speck (1970) พบว่า *Leuconostoc citrovorum* ซึ่งเป็นพวก Heterofermentative Lactic Acid Bacteria สามารถผลิตกรดอะซิติคและให้ผลการยับยั้งที่ดีกว่ากรดแลคติค Lubis (1983) พบว่าเมื่อระดับ pH สูงขึ้นจาก 4.0-5.5 จนเป็นกลาง (pH 7) จะทำให้สมบัติการยับยั้งการเจริญหมดไป Rubin, Vaughan และ Nerad (1982) พบว่าโมเลกุลของกรดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นได้ดีกว่าระดับ pH

2. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

แลคติคแอสิดแบคทีเรียสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ระหว่างการเจริญเติบโตได้ โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีอากาศโดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอน ปฏิกิริยาที่ใช้มีหลายวิธี

$$\text{Pyruvate} + O_2 + PO_4^{3-} \xrightarrow{\text{pyruvate oxidase}} \text{Acetylphosphate} + CO_2 + H_2O_2$$

$$\text{Lactate} + O_2 \xrightarrow[\text{D-lactate dehydrogenase}]{\text{L-lactate oxidase /or NAD-independent}} \text{pyruvate} + H_2O_2$$

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

ที่มา Gotz, Sedewitz และ Elster (1980)

อาหารเลี้ยงเชื้อของแลคติคแอสิดแบคทีเรียจะมีปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สะสมอยู่มากเพราะแลคติคแอสิดแบคทีเรียไม่มีเอนไซม์คะตะเลส การสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะสามารถยับยั้งการเจริญของ S. aureus, *Salmonella typhimurium*, Enterogenic *E. coli*, *Cl. perfringens* โดยที่ S. aureus และ *Cl. perfringens* จะถูกยับยั้งได้ดีกว่า S. *thyphimurium* และ *E. coli* โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะเกิดการออกซิไดซ์อย่างรุนแรงภายในเซลล์ ทำลายโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ภายในเซลล์ (Gilland และ Speck, 1977) นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ และ สร้างสารต่อต้านจุลชีพได้ เช่น ในน้ำนมดิบ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับ Endogenous Thiocyanate โดยมีเอนไซม์ Lactoperoxidase สร้างสารตัวกลาง (Intermediate Oxidation) ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ เราเรียกขั้นตอนนี้ว่า Lactoperoxidase Antibacterial System (Banks, Broad และ Sparks, 1986; Reiter และ Harnulv, 1984)

3. ไดอะซิติล (Diacetyl)

ไดอะซิติลมีชื่อทางเคมีว่า 2,3-butanedione จัดเป็นผลิตภัณฑ์ตัวสุดท้ายที่แลคติคแอสิดแบคทีเรียสร้างมาจากตัวกลางไพรูเวท (Pyruvate) ไดอะซิติลมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการทำเนยเพราะเป็นสารที่มีกลิ่นหอม และยังจัดอยู่ในบัญชี GRAS (Generally Recognized as Safe) ไดอะซิติลสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบจะมีความไวต่อไดอะซิติลมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Jay, 1982) กลไกการยับยั้งของไดอะซิติลคาดว่าเกิดจากการรบกวนตำแหน่งกรดอะมิโนอาร์จินีน โดยทำปฏิกิริยากับอาร์จินีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนหรือเอนไซม์ของแบคทีเรีย

4. แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคเทอริโอซินจัดเป็นสารต่อต้านจุลชีพ (Antimicrobial Substance) ซึ่งสารต่อต้านจุลชีพต่างชนิดกันจะมีลักษณะผลการยับยั้งจุลินทรีย์ (Antimicrobial Spectrum) แตกต่างกันไปทั้งในแง่การทำลาย กลไกการทำงาน (Mode of Action) และสมบัติทางเคมี สารต่อต้านจุลชีพจะเป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบ หรือโปรตีนที่มีคาร์โบไฮเดรทร่วมอยู่ด้วย มีขนาดใหญ่กว่าสารปฏิชีวนะ จะมีฤทธิ์ในการฆ่าหรือทำลายแบคทีเรียที่มีภูมิรับไว (Susceptible Bacteria) และจำเพาะต่อบริเวณรับแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin Receptor) บนเซลล์แบคทีเรียด้วย (Tagg, Dajanii และ Wannamaker, 1976) อย่างไรก็ตามแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียต่างสายพันธุ์กัน จะมีผลต่อการยับยั้งในกลุ่มแบคทีเรียที่ใกล้เคียงกัน มีลักษณะทางชีวเคมี พันธุศาสตร์คล้ายคลึงกัน แต่แตกต่างกันในการยับยั้งจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน

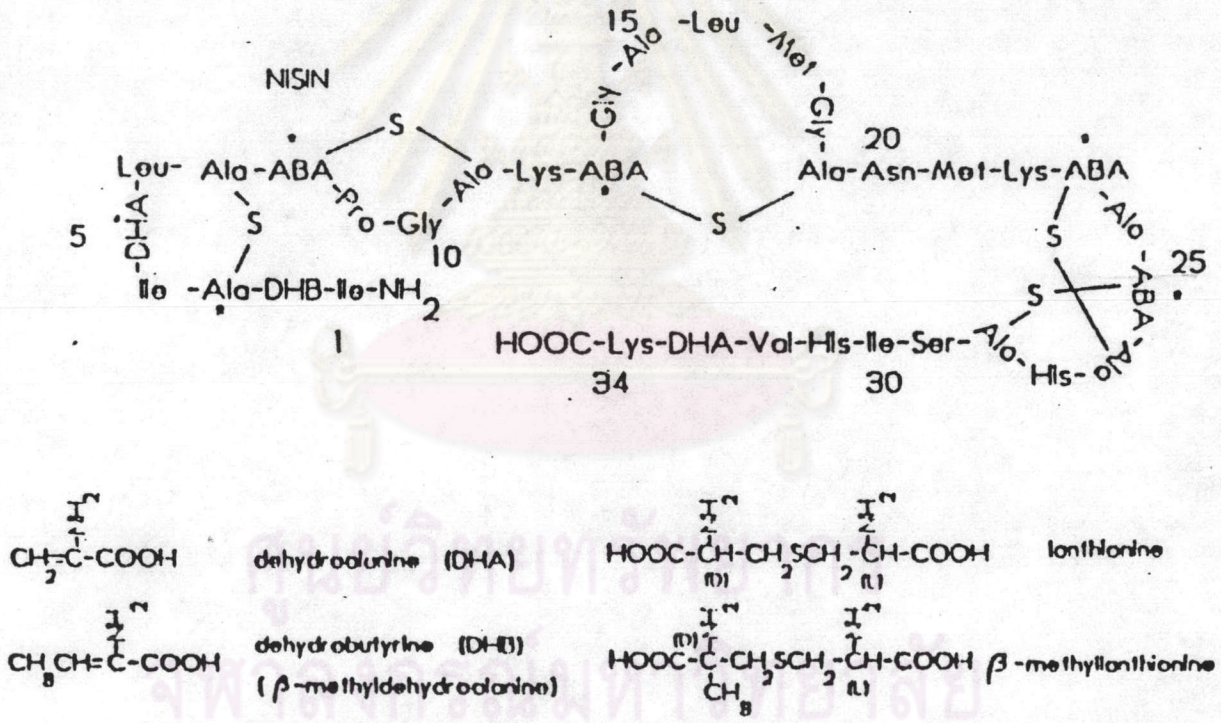
การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินเริ่มศึกษาใน *Escherichia coli* ที่สร้างสารโคลิซิน (Colicins) ซึ่งได้มีการศึกษาอย่างละเอียดถึงกลไกการทำงาน (Mode of Action) ผู้ถูกอาศัย (Host Range) ลักษณะทางพันธุกรรม (Genetic Determination) การทำบริสุทธิ์ (Purification) เป็นต้น การศึกษาการสร้างสารต่อต้านจุลชีพที่สร้างโดยพวกแลคติคแอสิดแบคทีเรียเช่น *Lb. fermentum* (Deklerk, 1967; Deklerk และ Smit, 1967), *Lb. helveticus* (Upreti และ Hindsdill, 1973), *Lb. acidophilus* (Barefoot และ Klaenhammer, 1983; 1984) และ *Lb. plantarum* (Daeschel, Mckenny และ McDonald, 1986)

ในปี 1988 Klaenhammer จัดแบ่งสารต่อต้านจุลชีพที่สร้างโดยแลคติคแอสิดแบคทีเรียเป็น 2 ประเภทตามลักษณะผลของการยับยั้งจุลินทรีย์

1. สารต่อต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ในกลุ่มที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน เช่นแลคติคแอสิดแบคทีเรีย และแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด

2. สารต่อต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่กว้างขึ้น โดยมีผลยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเช่น *Clostridium botulinum, Listeria monocytogenes*

ในปี ค.ศ. 1928 Roger ได้รายงานผลการยับยั้งการเจริญของ *Streptococcus lactis* ที่มีต่อเชื้อ *Lb. bulgaricus* โดยพบว่า *S. lactis* สร้างสารที่เป็นพวกโพลีเปปไทด์ ต่อมาภายหลังเรียกชื่อว่าไนซิน (Nisin) การยับยั้งจุลินทรีย์ของไนซินจะอยู่ในช่วงแคบ คือ จะมีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Streptococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp. ปัจจุบันไนซิน (สูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 1.4) ใช้เป็นยาปฏิชีวนะที่ยอมรับในการเติมในผลิตภัณฑ์อาหาร (Liu และ Hanson, 1990)



รูปที่ 1.4 แสดงโครงสร้างของไนซิน ที่มา Liu และ Hanson, 1990

7. แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคโตคอคไช (Bacteriocin of Lactococci)

แลคโตคอคไช (Lactococci) หรือสเตรปโตคอคไช (Streptococci) ซึ่งเรามักพบว่าเป็นหัวเชื้อในอุตสาหกรรมนม และ ล.อ.บ.ในกลุ่มนี้หลายสายพันธุ์สามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพได้ เช่น *Lactococcus lactis* และ subspecies สร้างดิปโพลคอคซิน (Diplococcin), แลคโตคอคซิน (Lactococcin), แลคโตสเตรปซิน (Lactostrepcins) หรือ ไนซิน (Nisin)

ดิปโพลคอคซิน (Diplococcin)

ดิปโพลคอคซิน เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain 346 (Oxford, 1944) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ M17 โดยสร้างในช่วงต้นของ Stationary Phase ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยกระบวนการทางโครมาโตกราฟีพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,300 ดาลตัน (Davey และ Richardson, 1981) ดิปโพลคอคซินจะสลายได้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อถูกความร้อนหรือถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteolytic Enzymes) เช่น ไคลโมทริปซิน (Chymotrypsin), ทริปซิน (Trypsin), โปรเนส (Pronase)

ดิปโพลคอคซินจะมีผลยับยั้งการสร้างดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ (DNA and RNA Synthesis) ในเซลล์ที่ไวต่อดิปโพลคอคซินเช่น *L. lactis* subsp. *lactis* และ *L. lactis* subsp. *cremoris* ซึ่งจะทำให้เซลล์ตายโดยไม่เกิดการไลซิส (Lysis) (Davey, 1981)

แลคโตสเตรปซิน (Lactostrepcins)

แลคโตสเตรปซิน เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* biovar *diacetylactis* (สายพันธุ์ที่ไม่สร้างไนซิน) บางสายพันธุ์ของ *L. lactis* subsp. *cremoris* และ *L. lactis* subsp. *diacetylactis* (Kozak, Bardwoski และ Dobrzanski, 1978: Zajdel, Ceglowski และ Dobrzanski, 1985) แลคโตสเตรปซินจะสร้างในช่วงต้นของ Logarithmic Phase ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ทนความร้อนที่ 121 °ซ 10 นาที มีแอคติวิตี้สูงที่ระดับความเป็นกรดด่างน้อยกว่า 5 และสูญเสียแอคติวิตี้เมื่ออยู่ในระดับความเป็นกรดด่าง 7 (Kozak และคณะ, 1978) เมื่อผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์บางขั้นตอนโดยทำไดอะไลซิส และ Ultrafiltration พบว่ามีขนาดน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 ดาลตัน แลคโตสเตรปซินจะมีผลยับยั้ง (Antagonistic Activity) เซลล์ Lactococci, Group A, C, G Streptococci, *Lb. helveticus*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *L. paracitrovorum* และ *B. cereus* (Kozah และคณะ, 1978)

แลคโตสเตรปซิน 5 (Lactostrepcin 5) สร้างโดย *L. lactis* subsp. *cremoris* 202 จะสามารถทำลายเซลเมมเบรน และ ยังมีผลรบกวนการขนส่งยูริดีน (Uridine) รวมทั้งยับยั้งการสร้างดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน (Zajdel และคณะ, 1985)

แลคโตคอคซิน 1 (Lactococcin 1)

แลคโตคอคซิน 1 เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* subsp. *cremoris* strain AC1 สามารถยับยั้งพวก Lactobacilli สายพันธุ์อื่น และ Clostridia บางสายพันธุ์ เมื่อผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ Geis, Singh และ Teuber (1983) พบว่าแลคโตคอคซิน 1 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 6,000 ดาลตัน สามารถทนความร้อนที่ 99 °ซ 30 นาที

แลคโตคอคซิน A (Lactococcin A)

แลคโตคอคซิน A เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* subsp. *cremoris* strain LMG2130 มีฤทธิ์ในการฆ่า *L. lactis* subsp. *lactis* เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อจาก M17 มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 28 % นำมาผ่าน cation Exchange Chromatography และ Reverse Phase Chromatography (Holo, Nilssen และ Nes, 1991) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,778 ดาลตัน มีค่า I.S. (Isoelectric Point) 9.2 ไม่ละลายในน้ำ ถูกย่อยโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน แต่แอคติวิตี้ไม่สูญเสียเมื่ออยู่ในสารละลาย 60 % เอทธานอล และ 25 mM โซเดียมฟอสเฟต pH 7.3 ที่ -20 °ซ แลคโตคอคซิน A จะมีผลต่อเซลเมมเบรนทำให้เกิดการแตกขององค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ นอกจากนี้แลคโตคอคซิน A อาจสร้างโดย *L. lactis* subsp. *cremoris* strain อื่นๆ เช่น strain 9B4 (Neve, Geis และ Teuber, 1984), *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* WM4 (Scherwitz, Baldwin และ Mckay, 1983; Stoddard และคณะ, 1992)

ไนซิน (Nisin)

ไนซินเป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* serological group N ที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางมานาน ไนซินจัดเป็น Lantibiotics; เป็นกลุ่มของเปปไทด์ที่มีการต่อกันด้วยพันธะซัลเฟอร์ระหว่าง Alanine กับ Alanine เรียกว่า Lanthionine และ Aminobutyric Acid (ABA) กับ Alanine เรียกว่า β-Methyllanthionine (Gross และ Morell, 1967; 1970) สร้างในช่วง Logarithmic Phase มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,500 ดาลตัน มีฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวก Lactococci, Bacilli, Micrococci, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* (Hurst, 1983) จากการทดลองของ Lee และ Kim

(1986) ได้รายงานว่า ไนซินที่ความเข้มข้น 200 หน่วยสากลต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Streptococcus thermophilus* ATCC 10987 ได้อย่างสมบูรณ์และยังพบว่าไนซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นๆได้เช่น *Lb. bulgaricus, Lb. casei, Lb. plantarum, Lb. helveticus, Lb. acidophilus, Bacillus subtilis, B. megaterium, B. coagulants* และ *B. cereus* นอกจากนี้ไนซินยังทำให้การงอกของสปอร์ลดลง สามารถทนความร้อนที่ 100 °ซ 10 นาที ทนต่อเอนไซม์โปรเนส, ทริปซิน ในสภาวะที่เป็นกรด แต่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไคลโมทริปซิน (Gross และ Morell, 1967; 1970) ไนซินจะมีผลโดยตรงต่อเซลเมมเบรน ทำให้เกิด Efflux ของกรดอะมิโนและพวกประจุบวก (Ruhr และ Sahl, 1985; Gao, Abee และ Konings, 1991) ทำให้ไม่เกิดกระบวนการ Proton Motive Force และยังรบกวนกระบวนการ Cellular Biosynthesis ทำให้เกิดการสูญเสีย Membrane Potential เซลล์จึงตายในที่สุด

แลคติซิน 481 (Lacticin 481)

แลคติซิน 481 เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* subsp. *lactis* CNRZ481 จัดเป็น Lantibiotics จากการทำให้แลคติซิน 481 ให้บริสุทธิ์โดยผ่านกระบวนขบวนการ Ultrafiltration และ Gel Filtration Chromatography พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,000-10,000 ดาลตัน จะมีผลต่อ Lactococci, Lactobacilli, Leuconostocs และ *Clostridium tyrobutyricum* (Piard และคณะ, 1992)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยพิดิโอคอคไช (Bacteriocins of Pediococci)

พิดิโอคอคไช (Pediococci) เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทอย่างมากในอุตสาหกรรมผัก ดอง, เนย, เนื้อและ Sausage Products พิดิโอซิน (Pediocins) สร้างโดย *Pediococcus* 3 สายพันธุ์ได้แก่ *P. acidilactici*, *P. cerevisiae* and *P. pentosaceus* จะมีผลต่อจุลินทรีย์แกรมบวกหลายชนิดทั้งแลคติคแอสิดแบคทีเรีย, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* และ Clostridia

พิดิโอซิน AcH (Pediocin AcH)

พิดิโอซิน AcH เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *P. acidilactici* strain H ที่แยกมาจาก Fermented Sausage (Bhunia, Johnson และ Ray, 1987) สร้างขึ้นในช่วง Stationary Phase ใน TGE (Trypicase, Glucose, Yeast Extract) Broth ที่ระดับความเป็นกรดด่าง 6.5 (Biswas และคณะ, 1991) ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 70 % ทำไดอะไลซ์ในน้ำไม่มีประจุ นำมาละลายใน 6 M ยูเรีย ที่มีแอมโมเนียมอะซิเตรท จากนั้นนำมาทำ Gel Filtration และ Anion Exchange Chromatography พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2,700 ดาลตัน ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนแต่ทนความร้อนที่ 121 °ซ 15 นาที ทนความเป็นกรดด่างได้ตั้งแต่ 2.5-9.0 (Bhunia และ Johnson, 1988) พิดิโอซิน AcH จะมีผลในการยับยั้งการสร้าง ATP ทำให้ระบบขนส่ง (Transport Systems), กระบวนการซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ (Permeability) ของสารต่างๆเสียไป (Bhunia, Johnson และ Kalchayanand, 1991) นอกจากนี้ พิดิโอซิน AcH สามารถถูกดูดกลืนโดยพวกแบคทีเรียแกรมบวกได้เนื่องจาก พิดิโอซิน AcH จะจับกับ Non Specific Receptor ซึ่งอาจเป็น LTA (Lipotechoic Acids) บนผนังเซลล์ เมื่อ Non Specific Site อิ่มตัวด้วยโมเลกุลของ พิดิโอซิน AcH แล้ว โมเลกุลที่เหลือจะจับกับ Specific Receptor แล้วทำให้ผนังเซลล์เปลี่ยนแปลง มีผลทำให้

เซลล์เสียโปตัสเซียมไอออน และ/หรือ การดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเล็ต สูญเสียความสามารถในการเพิ่มจำนวนตัวเอง (Replicate) มีผลทำให้ o-Nitrophenyl-β-D-Galacto-spyranoside (ONPG) เข้าสู่เซลล์มากเกินไปเซลล์จึงเกิดการไลซิสในที่สุด

พิดิโอซิน PA-1 (Pediocin PA-1)

พิดิโอซิน PA-1 เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *P. acidilactici* strain PAC-1.0 ในช่วง Stationary Phase เมื่อนำมาผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต, ไดอะไลซิส, Ion Exchange Chromatography Gonzalez และ Kunka (1987) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 16,500 ดาลตัน ถูกย่อยโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนแต่ไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ไลเปส, ฟอสโฟไลเปส, ไลโซไซม์, ดีเอ็นเนส (DNase), อาร์เอ็นเนส (RNase) สามารถทนอุณหภูมิสูง 80-100 °ซ และระดับความเป็นกรดด่าง 4-7 ได้ นอกจากนี้พิดิโอซิน PA-1 ยังมีฤทธิ์ยับยั้ง Pediococci, Lactobacilli, *L. mesenteroides* และ *L. monocytogenes* (Pucci และคณะ, 1988)

แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยลิวโคนอสตอก (Bacteriocins of Leuconostocs)

Leuconostoc spp. เป็นแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่พบใน ผลิตภัณฑ์นม, กะหล่ำปลีดอง และกระบวนการหมักไวน์ สารต่อต้านจุลชีพที่สร้างจากพวกนี้มักมีคุณสมบัติเป็น Antagonistic Compounds ที่ไม่ใช่แบคเทอริโอซิน แต่เป็นสารพวก อะซีเตท (Acetate) หรือ ไดอะซิติล (Diacetyl) (Klenhammer, 1988) แต่พวก *Leuconostoc* spp. ที่แยกได้จากไวน์และ ผลิตภัณฑ์นม สามารถสร้าง Bacteriocin-Like Compound มีฤทธิ์ต่อพวก *L. lactis* subsp. *lactis* (Orberge และ Sandine, 1984)

เมดเซนเทอรอยซิน 5 (Mesenteroicin 5)

เมดเซนเทอรอยซิน 5 เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* strain UL5 ที่แยกได้จากเนย โดยสร้างในช่วง Stationary Phase เมื่อผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 60 % แล้วนำมาทำ ไดอะไลซ์, Ultrafiltration และ SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4,500 ดาลตัน ถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส ทนความร้อนที่ 100 °ซ นาน 30 นาที เมดเซนเทอรอยซิน 5 มีฤทธิ์ในการยับยั้งพวกแบคทีเรียแกรมบวกเช่น *L. monocytogenes*, *S. faecalis*, *Brevibacterium linens* และ *P. pentosaceus* (Daba และคณะ, 1991)

ลิวโคซิน A (Leucocin A)

ลิวโคซิน A เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. gelidum* ที่แยกมาจากเนื้อที่เก็บใน 30 % คาร์บอนไดออกไซด์ โดยสร้างในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวช่วง Log Phase ที่ 37 °ซ pH 6.0 เมื่อผ่านการกำจัดผลของกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (pH 2.5), ผ่าน Amberlite XAD-2, Sephadex G-25 และ HPLC พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2,500-3,000 ดาลตัน (Hastings และ Stiles, 1991) ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนหลายตัวเช่น โปรติเอส, ไคโมทริปซิน, ทริปซิน, ปาเปน, เปปซิน และมีความเสถียรที่ระดับความเป็นกรดด่าง 2-3 ทนอุณหภูมิที่ 62 °ซ 30 นาทีได้ ลิวโคซิน A มีฤทธิ์ในการยับยั้ง Leuconostocs, Lactobacilli, Pediococci, *S. faecalis* และ *L. monocytogenes*

ลิวโคโนซิน S (Leuconocin S)

ลิวโคโนซิน S เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. paramesenteroides* strain OX ที่แยกจากเนื้อ (Lewus, Kaiser และ Montville,1991) โดยสร้างในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเอพีที (APT Broth) ในช่วง Stationary Phase (12 ชม., pH 6.5) ลิวโคโนซิน S เป็นสารพวกไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) ที่ทนอุณหภูมิสูง 60 °ซ 60 นาที ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส, ทริปซิน, ไคโมทริปซิน, โปรติเอส, โปรติเอส เค ลิวโคโนซินพบว่ายังมีผลต่อ *L. monocytogenes*, S. aureus, *Lb. sake*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* และบางสายพันธุ์ของ *Cl. botulinum* (Lewus, Sun และ Montville, 1992) โดยพบว่า Crude Bacteriocin จะมีผลต่อ Proton Motive Force ของพวก *Lb. sake* ซึ่งมีผลทำให้เกิดการยับยั้ง (Bacteriostatic) ต่อเซลล์

คาโนซิน (Canocin)

คาโนซิน เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. carnosum* LA44A ที่แยกได้จาก Vacuum Packaged Vienna Type Sausage โดยสร้างในอาหารเหลวดัดแปลงเอ็มอาร์เอส (Modified MRS: ไม่เติมสารสกัดเนื้อ และ ทวีน 80) pH 6.5 ในช่วงตอนปลายของ Logarithmic Phase ที่ 18 ชม. อุณหภูมิ 25 °ซ หรือ ที่ 148 ชม. อุณหภูมิ 10 °ซ จากนั้นนำมาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 60 % แล้วนำมาทำไดอะไลซ์ และ SDS-PAGE พบว่า Crude Bacteriocin มีน้ำหนักโมเลกุล 2,510-6,000 ดาลตัน ถูกย่อยโดยเอนไซม์ไคโมทริปซิน, ทริปซิน และอะไมเลส ไม่ทนความร้อนที่ 121 °ซ 15 นาที แต่จะยังคงมีแอคติวิตี้ที่ pH 2-10 ทนความร้อนที่ 100 °ซ 15 นาที คาโนซินมีฤทธิ์ต่อ Lactobacilli, Carnobacteria, Enterococci, Pediococci, Leuconostocs และ *Listeria* spp. (Vaan Laack, Schillinger และ Holzapfel, 1992)

แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคโตบาซิไล (Bacteriocins of Lactobacillis)

แลคโตบาซิไลสามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพได้มากมายหลายชนิดเช่น กรด, Lactoperoxidase, ไดอะซิติล, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Daeschel, 1989; Klenhammer, 1988) แต่เมื่อกำจัดผลของสารยับยั้งดังกล่าวข้างต้นพบว่า แลคโตบาซิไลสามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ เราแบ่งแลคโตบาซิไลได้เป็น พวกที่ไม่ได้ใช้ในผลิตภัณฑ์นม และ พวกที่ใช้ในผลิตภัณฑ์นม

แลคโตบาซิไลที่ไม่ได้ใช้ในผลิตภัณฑ์นม (Non-Dairy Lactobacilli)

พลาทาริซิน A (Plataricin A)

พลาทาริซิน A เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lb. plantarum* strain C-11 ที่แยกได้จาก Silage และ/หรือ ผักดอง สร้างขึ้นในช่วงกลางของ Logarithmic Phase หยุดสร้างในช่วงปลาย Logarithmic Phase จัดเป็นโปรตีนที่มีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ (Bactericidal Protein) แลคติคแอสิดแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (Daeschel และคณะ, 1990) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 6,000 ดาลตัน ยังคงมีแอคติวิตี้ที่อุณหภูมิ 100 °ซ 30 นาที ที่ pH 4-6.5

พลาทาซิน B (Platacin B)

พลาทาซิน B เป็น Bacteriocin-Like Inhibitor สร้างโดย *Lb. plantarum* strain NCDO 1193 พลาทาซิน B ถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ไลเปสและอะไมเลสจึงจัดเป็นสารประเภทโปรตีนที่มีคาร์โบไฮเดรท และ ไขมัน เป็นองค์ประกอบ มีฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์พวก *Lb. plantarum* สายพันธุ์อื่น *L. mesenteroides* และ *P. damnosus* เป็นต้น (West และ Waner, 1988)

ซาคาซิน A (Sakacin A)

ซาคาซิน A เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lb. sake* strain 706 ในช่วงตอนกลางหรือตอนปลายของ Logarithmic Phase เป็นสารที่ทนความร้อนที่ 100 °ซ 20 นาที เมื่อนำมาทดสอบในอาหารเหลวและแข็งเอ็มอาร์เอสพบว่า ซาคาซิน A สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* แต่เมื่อนำมาทดสอบในเนื้อพบว่าไม่มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าว โดยพบว่า ซาคาซิน A จะดูดซึมลงในเนื้อในส่วนที่เป็นไขมัน และในเนื้อยังมีเอนไซม์ที่ทำให้ซาคาซิน A สูญเสียแอคติวิตี้ (Schilling, Kaya และ Lucke, 1991)

ซาคาซิน M (Sakacin M)

ซาคาซิน M เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lb. sake* strain 148 ที่แยกมาจาก Spanish Dry Fermented Sausage แล้วนำมาเลี้ยงใน Semi-Synthetic Media ที่เติม 1.5 % ทริปโตน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำให้แห้งภายใต้สูญญากาศละลายในยูเรียความเข้มข้น 1 M ที่ระดับความเป็นกรดด่าง 5.6, ผ่าน Gel Filtration พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4,640 ดาลตัน ทนความร้อนที่ 80 °ซ 60 นาที และ 150 °ซ 9 นาที ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน, เปปซิน, โปรติเอส ซาคาซิน M มีฤทธิ์ต่อ Lactobacilli, Leuconostocs, Carnobacteria, *L. monocytogenes*, S. aureus (Sobrino และคณะ, 1992)

ซาคาซิน P (Sakacin P)

ซาคาซิน P เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lb. sake* strain LTH673 ที่แยกมาจากเนื้อ เมื่อทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต, Cation Exchange Chromatography, Hydrophobic Interaction, Reversed Phase

Chromatography พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,000-5,000 ดาลตัน ถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเนส เค และ ทริปซิน แต่ทนต่อเอนไซม์เปปซิน และทนความร้อนที่ 100 °ซ 7 นาที ซาคาซิน P มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ Lactobacilli, Leuconostocs, Carnobacteria, Enterococci, *Brochothrix thermosphacta*, *Listeria* spp. (Tichaczek และคณะ, 1992)

แลคโตซิน S (lactocin S)

แลคโตซิน S เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lb. sake* strain L45 ที่แยกจาก Dry Sausage สร้างขึ้นในช่วงปลายของ Exponential Phase เมื่อนำมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตจะมีแอคติวิตี้เพิ่มขึ้น 30 เท่า ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Ion Exchange Chromatography, Phenyl-Sepharose Chromatography, Gel Filtration, Reverse Phase Chromatography พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ดาลตัน แลคโตซิน S เป็นโปรตีนทนร้อนที่มีฤทธิ์ต่อ *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* (Mortvedt และคณะ, 1991)

เคอวาซิน A (Curvacin A)

เคอวาซิน A เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lb. curvatus* strain LTH1174 แยกมาจากเนื้อ เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ผ่าน Cation Exchange Chromatography, Hydrophobic Interaction, Reversed Phase Chromatography, SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,000-6,000 ดาลตัน ถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเนส เค, ทริปซิน แต่ยังคงมีแอคติวิตี้ที่อุณหภูมิ 100 °ซ 3 นาที เคอวาซิน A จะมีฤทธิ์ต่อ Lactobacilli สายพันธุ์อื่น, Leuconostocs, Carnobacteria, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* แต่มีผลยับยั้ง Micrococci และ Staphylococci ได้น้อยมาก (Tichaczek และคณะ, 1992)

แลคโตบาซิไลที่ใช้ในผลิตภัณฑ์นม (Dairy Lactobacilli)

แลคโตซิน 27 (Lactocin 27)

แลคโตซิน 27 เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lb. helveticus* strain LP27 นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนการเติมคลอโรฟอร์ม นำมาผ่าน Sephadex G-200, Sephadex G-25 และ SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 12,400 ดาลตัน และเป็นไกลโคโปรตีนที่ทนความร้อน ออกฤทธิ์ต่อ Lactobacilli โดยจะทำให้เกิด Efflux ของโปตัสเซียมไอออน และ Influx ของโซเดียมไอออนเนื่องจาก แลคโตซิน 27 จะทำปฏิกิริยากับเซลเมมเบรน แต่ไม่มีผลต่อการสร้างดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ (Upreti และ Hinsdill, 1973;1975)

เฮลวิทิซิน J (Helveticin J)

เฮลวิทิซิน J เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lb. helveticus* 481 เลี้ยงในถังหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 22 ชม. 37 °ซ pH 5.5 จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปรับให้มีค่า pH 3.0 นำไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 50 % ละลายตะกอนแล้วนำไปทำไดอะไลซ์ ผ่านลงใน Gel Chromatography (Sephadex G-200, Sephadex G-25) และ SDS-PAGE พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 37,000 ดาลตัน (Joerger และ Klaenhammer, 1986) ออกฤทธิ์กับพวก Lactobacilli

เฮลวิทิซิน V-1829 (Helveticin V-1829)

เฮลวิทิซิน V-1829 เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lb. helveticus* 1829 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเอ็มอาร์เอส pH 5.5 โดยจะสร้างในช่วง Logarithmic Phase

นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30 และ 60 % จากนั้นนำตะกอนไปละลายและนำมาไดอะไลซ์ พบว่า Partially Purified ของเฮลวิทิซิน V-1829 ถูกย่อยโดยเอนไซม์โปรติเนส เค, ฟิซิน, ทริปซิน, โปรเนส, ความร้อน และ pH มากกว่า 7.0 แต่จะยังคงมีแอคติวิตี้ที่ช่วง pH 2.5-6.5, ความร้อน 45 °ซ 120 นาที เฮลวิทิซิน V-1829 ออกฤทธิ์กับ Lactobacilli (Vaughan, Daly และ Fitzgerald, 1992)

แลคตาซิน F (Lactacin F)

แลคตาซิน F เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lb. acidophilus* 11088 ในช่วงต้นของ Stationary Phase หลังจากนั้นนำไปตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40 % หาน้ำหนักโมเลกุลโดยผ่าน Gel Filtration พบว่ามีขนาด 2,500 ดาลตัน โดยจะพบแอคติวิตี้ของแลคตาซิน F ในส่วนของ Surface Flocculate จากนั้นนำมาทำ Ultrafiltration, Gel Filtration Chromatography พบว่าถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนหลายชนิดเช่น โปรติเนส เค, ทริปซิน, ฟิซิน, ซับทิลิซิน (Subtilisin) แต่ยังคงมีแอคติวิตี้เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์, ไลเปส และ α-อะไมเลส สามารถทนอุณหภูมิ 121 °ซ 15 นาที สามารถยับยั้ง *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* (*Lb. leichmannii*), *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. fermentum* และบางสายพันธุ์ของ *S. faecalis* (Muriana และ Klaenhammer, 1987;1991)

แลคตาซิน B (Lactacin B)

แลคตาซิน B เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lb. acidophilus* strain N2 นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Ion Exchange Chromatography, Ultrafiltration และ Gel Filtration พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 6,500 ดาลตัน

มีคุณสมบัติเป็นพวก Non Volatine, Non Dialyzable, ไม่ไวต่อเอนไซม์คะตะเลส ถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเนส เค แต่ยังคงมีแอคติวิตี้ใน Chaotropic Agents (SDS, Urea) ทนความร้อนที่ 100 °ซ 3 นาที ที่ pH 5.0 แลคตาซิน B มีฤทธิ์ยับยั้ง *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* (*Lb. leichmannii*), *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helviticus* การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นได้แก่ *Proteus*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* ซึ่งสารนี้สามารถยับยั้งได้อย่างกว้างขวาง (Barefoot และ Klaenhammer, 1983;1984)

8. สมบัติของสารต่อต้านจุลชีพ

Antimicrobial Spectrum and Mode of Action

การเลือกใช้สารต่อต้านจุลชีพมักจะขึ้นอยู่กับความสามารถของการยับยั้งหรือหน่วงเหนี่ยวการเจริญของจุลินทรีย์ มีสารต่อต้านจุลชีพเพียง 2-3 ชนิดเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด การพิจารณา Spectrum ของสารต่อต้านจุลชีพจะดูจากการติดตามการเจริญของเชื้อทดสอบที่ความเข้มข้นของสารต่อต้านจุลชีพต่างๆ วิธีที่นิยมใช้ในการติดตามการเจริญคือ Disk or Agar Well Assay ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วแต่จะต้องคำนึงถึง ชนิดและขนาดของแผ่นกรอง, ความสามารถของสารต่อต้านจุลชีพในการซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ, สมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อ, ชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ เราอาจใช้อีกวิธีการคือ การทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยติดตามความขุ่นที่เกิดขึ้นภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะบอกถึงความสามารถของสารต่อต้านจุลชีพต่อการเจริญของเชื้อทดสอบได้เช่นกัน

การเลือกใช้สารต่อต้านจุลชีพในอาหารชนิดใดๆนั้น จำเป็นต้องมีการทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ของสารต่อต้านจุลชีพนั้นๆในอาหารด้วย เพราะองค์ประกอบของอาหารและสมบัติของอาหารอาจทำให้การออกฤทธิ์ของสารต่อต้านจุลชีพเปลี่ยนแปลงไป อาจจะมีผลจำกัดการออกฤทธิ์ของสารต่อต้านจุลชีพ

สารต่อต้านจุลชีพที่เราใช้ในการถนอมอาหารอาจจะทำหน้าที่ ในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์หรือทำลายจุลินทรีย์ (Bacteriostatic or Bacteriocidal) ลักษณะในการออกฤทธิ์ของสารต่อต้านจุลชีพอาจแบ่งได้เป็น

1. การทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell Membrane) ทำลายความสามารถในการผ่านเข้าออก (Permeability) และทำให้ลักษณะของเซลล์เสียความสมดุลไป

2. ทำให้เอนไซม์บางชนิดทำงานไม่ได้

3. ทำให้สารพันธุกรรมเสียรูปร่างหรือหน้าที่ไปจากเดิม (Davidson และ Branen, 1981)

โดยปกติสารต่อต้านจุลชีพจะทำปฏิกิริยาที่บริเวณไม่เฉพาะเจาะจง บนผิวเยื้อหุ้มเซลล์ทำให้สูญเสียความสามารถในการทำงานเช่น ความสามารถของสารต่อต้านจุลชีพที่มีลักษณะเป็น Hydrophobic Compounds จะจำกัดการเจริญของแบคทีเรียพวกแกรมลบ เนื่องจากสารต่อต้านจุลชีพชนิดนี้สามารถซึมเข้าสู่ผนังเซลล์ในชั้น Lipopolysaccharide ได้ง่าย

9. สมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของสารต่อต้านจุลชีพ

สมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของสารต่อต้านจุลชีพที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ที่ควรคำนึงถึงคือ

1. ความมีประจุ (Polarity) เป็นปัจจัยที่สำคัญของสารต่อต้านจุลชีพในการออกฤทธิ์โดยสารต่อต้านจุลชีพที่ดีควรจะมีส่วนที่มีความสามารถในการละลายน้ำ (Solubility or Hydrophilic Properties) ซึ่งมีความจำเป็นอย่างมากในการออกฤทธิ์ของสารต่อต้านจุลชีพเพราะส่วนที่เป็นน้ำมักจะมีจุลินทรีย์อาศัยอยู่ (Robach, 1980) ส่วนด้านที่ละลายน้ำได้น้อย (Hydrophobic or Lypophilic Properties) ส่วนนี้จะสามารถทำลายบริเวณเยื้อหุ้มเซลล์ (Branen, Davision และ Katz, 1980) ดังนั้นการมีลักษณะเป็น Emulsifier ของสารต่อต้านจุลชีพจะทำให้สารนั้นออกฤทธิ์ได้ดี

2. จุดเดือด (Boiling Point) มีผลต่อการออกฤทธิ์โดยตรงเนื่องจากถ้าอาหารมีการให้ความร้อนระหว่างขบวนการผลิตอาหาร สารที่สลายได้ง่ายก็จะสูญเสียไปในขณะที่มีการให้ความร้อนเช่น สารประกอบฟีนอลิก และยังอาจให้สารที่มีกลิ่นไม่ดีกับอาหารด้วย

3. การแตกตัวเป็นอิออน จะขึ้นกับระดับความเป็นกรดด่างของอาหารนั้นๆ โดยทั่วไปเซลล์ของจุลินทรีย์จะมีกลไกป้องกันตัวเองเช่น ที่บริเวณผนังเซลล์จะมีกลไกการคัดเลือกสารที่ผ่านเข้าออกเซลล์ โดยทั่วไปผิวของเซลล์จะมีประจุลบอยู่ และจะผลักสารประกอบใดๆที่มีประจุลบไม่ให้เข้ามาภายในเซลล์ ส่วนพวกที่มีประจุบวกจะถูกกักไว้เช่นกัน โดยที่ pH ภายในเซลล์ประมาณ 7 เซลล์แบคทีเรียส่วนใหญ่จะไม่ยอมให้สารต่อต้านจุลชีพที่แตกตัวผ่านเข้าออกได้ แต่จะยอมให้สารต่อต้านจุลชีพที่ไม่แตกตัวผ่านเข้าออกได้ โดยเมื่อผ่านเข้ามาในเซลล์แล้วจะเกิดการแตกตัว และทำปฏิกิริยากับเซลล์หรือหน่วงเหนี่ยวการเจริญของจุลชีพ

4. ปฏิกิริยาทางเคมีของสารต่อต้านจุลชีพกับสารประกอบอื่นๆในอาหาร สารต่อต้านจุลชีพสามารถทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบของอาหารเช่น คาร์โบไฮเดรท, โปรตีน, ไขมัน จะทำให้ประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของสารต่อต้านจุลชีพลดลง และอาจทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติที่ไม่ต้องการ

10. การใช้สารต่อต้านจุลชีพหรือแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สร้างสารต่อต้านจุลชีพในอุตสาหกรรมอาหาร

ได้มีการใช้แบคเทอริโอซินหรือแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อการถนอมอาหาร และป้องกันการสูญเสียเนื่องจากแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคได้มีนักวิจัยรายงานว่า แบคเทอริโอซินที่สร้างมาจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียสามารถยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวกได้หลายชนิด รวมทั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค เช่น S. aureus, *L. monocytogenes* และ *Cl. botulinum* และอาจมีผลยับยั้งต่อแบคทีเรียแกรมลบได้ถ้ามีการใช้แบคเทอริโอซินกับ Chelating Agents อื่นๆ (Steven และคณะ, 1991;1992)

แบคเทอริโอซินที่ได้กล่าวมาทั้งหมดนี้จะมี ไนซิน ที่ได้รับการยอมรับจาก GRAS (Generally Recognized as Safe) และสามารถใช้ได้ในสหรัฐอเมริกา (Food & Drug Administration, 1988) โดย *L. lactis* (S. *lactis*) จะใช้ในอุตสาหกรรมการทำเนย (Ripened Cheese) ส่วนไนซินจะใช้เป็น Food Additive ในขั้นตอนการทำ Cheese Spreads โดยที่ยังคงมีแอคติวิตี้และความเสถียรเหมือนเดิม

I17192250

การใช้แบคเทอริโอซินในอาหารจำเป็นต้องคำนึงถึงองค์ประกอบหลายอย่างเช่น โครงสร้างและองค์ประกอบของอาหาร ปริมาณไขมันในอาหารจะมีผลต่อแอคติวิตี้ของแบคเทอริโอซิน ได้มีการศึกษาพบว่า แบคเทอริโอซินรวมทั้งไนซินจะสามารถจับกับไขมันจึงทำให้ประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยากับแบคทีเรียลดลง (Schillinger และคณะ, 1991) นอกจากนี้อุณหภูมิ, ค่าความเป็นกรดด่าง การมี Exogenous Enzymes เช่น โปรติเอส รวมทั้ง Endogenous Protease หรือ โปรติเนส, Gastrointestinal Enzymes เช่น ไคโมทริน หรือ ทริปซิน ก็จะมีผลต่อความคงตัวของแบคเทอริโอซินในอาหารหรือเครื่องดื่ม

แต่อย่างไรก็ตามมักนิยมใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตสารต่อต้านจุลชีพลงในอาหารต่างๆ มากกว่าการเติมแบคเทอริโอซินอย่างเดียว (Hoover, 1992) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเทคโนโลยีทางด้านพันธุศาสตร์ในการโคลนยีนที่เกี่ยวกับการสร้างแบคเทอริโอซินหลายๆชนิด เข้าไปในแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ไม่ทำให้เกิดโรค (Joerge และ Klaenhammer, 1990) หรือ *E. coli* (Van Belkum และคณะ, 1992) ทำให้สามารถสร้าง Hybrid Bacteriocin Molecules (Lozano และคณะ,1992) ซึ่งทำให้แบคทีเรียสามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้หลายชนิด ทำให้เรามีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซิน ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ และทนต่อสภาวะต่างๆได้มากขึ้น มีฤทธิ์ทำลายระบบต่างๆได้กว้างมากขึ้น ขณะเดียวกันยังสามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพหลายๆชนิดที่มีฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียและเกิดโรคได้ จึงนับว่าเป็นประโยชน์ของการพัฒนาเทคโนโลยีทางด้านพันธุกรรมและอุตสาหกรรมอาหาร

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. คัดเลือกแลคติคแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักที่สร้างสารต่อต้านจุลชีพ และให้ผลการหมักในการเตรียมผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต
2. แยกสารต่อต้านจุลชีพและศึกษาสมบัติบางประการของสารต่อต้านจุลชีพ