# บทที่ 2

# วารสารปริทัศน์

## 1. อาหารหมัก

การหมักเป็นวิธีการถนอมอาหารที่มนุษย์รู้จักกันมานาน โดยช่วงเริ่มต้นมีจุดประสงค์เพียงเพื่อยืดอายุการเก็บของผลิตผลทางการเกษตร ให้ยาวนานขึ้น ป้องกันการเน่าเสีย ซึ่งยึดหลักที่ว่าการเก็บเกี่ยว และการเก็บรักษาที่ถูกวิธีจะทำให้ผลิตผลนั้นมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และลักษณะเฉพาะทางประสาทสัมผัสไปในทางที่ดี และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค แต่ต่อมาได้มีการขยายการผลิตมากขึ้นจนถึงระดับการค้าตั้งแต่ระดับตลาดย่อยไปจนถึงระดับการค้าระหว่างประเทศ ซึ่งอาหารหมักของไทยมีมากมายหลายชนิด โดยอาศัยการหมักที่เป็นธรรมชาติ และอาศัยเชื้อที่ติดมากับวัตถุดิบที่ใช้ โดยทั่ว ๆ ไปการหมักจะขึ้นกับเชื้อที่ติดมา และต้องควบคุมสภาวะการเจริญที่เหมาะสม (วิเชียร, 2534) อาหารหมักดองเหล่านี้ แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1. อาหารหมักดองจากพืช ประกอบด้วย :

1.1 ผัก ได้แก่ กระเทียมดอง ขิงดอง กังฉ่าย ซีเซ็กฉ่าย ใบเมี่ยง ตังฉ่าย ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง ผักกุ่มดอง หัวไชโป๊ และหน่อไม้ดอง

1.2 ผลไม้ ได้แก่ ท้อดอง มะม่วงดอง และอื่นๆ

1.3 โกโก้ และกาแฟ

1.4 ธัญญพืช ได้แก่ ขนมจีนหมัก

1.5 ถั่วเหลือง ได้แก่ ซีอิ้ว เต้าเจี้ยว

2. อาหารหมักดองจากสัตว์ ประกอบด้วย :

2.1 ผลิตภัณฑ์จากนม ได้แก่ นมเปรี้ยว โยเกิร์ต เนยแข็ง และเนยเหลว

2.2 ผลิตภัณฑ์จากเนื้อ ได้แก่ หมูอวน แหนม และไส้กรอกเปรี้ยว

2.3 ผลิตภัณฑ์จากปลา ได้แก่ กะปิ กุ้งจ่อม หรือกุ้งส้ม กุ้งเจ่า ไตปลา น้ำเคย น้ำบูดู น้ำปลา ปลาจ่อม หรือปลาส้ม ปลาเจ่า ปลาทูเค็ม ปลาแป้งข้าวหมาก ปลาร้า ปลาหมักส้มฟัก และหอยดอง

ปัจจุบันมีการพัฒนาการศึกษาทางด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีมากขึ้น มีการศึกษากลไกการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักเหล่านั้น และพบว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดจากกระบวนการหมักทางจุลชีวิทยา โดยเชื้อจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ซึ่งมีทั้งพวก homofermentative และ heterofermentative lactic acid bacteria ทั้งนี้ขึ้นกับผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้น ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลิตผลหลักที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารคาร์โบไฮเดรตโดยเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญในผลิตภัณฑ์

| แบคทีเรีย | ผลิตผลหลักของการหมัก |
|---|---|
| Homofermentative Lactic Acid Bacteria (*Lactococci*, some *Lactobacilli* etc.) | กรดแลคติก |
| Heterofermentative Lactic Acid Bacteria (*Leuconostoc* and some *Lactobacilli*) | กรดแลคติก, เอธานอล, คาร์บอนไดออกไซด์ |
| *Bacillus* species (particularly in the presence of nitrate) | กรดแลคติก, กรดอะซิติก, คาร์บอนไดออกไซด์ |
| *Clostridium* species | คาร์บอนไดออกไซด์ , ไฮโดรเจน , กรดอะซิติก, กรดบิวทาริก, กรดแลคติก, อะซิโตน, บิวทานอล |

ที่มา Frazier, 1979

2. การหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ ( Daly, 1973)

การทำงานของแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะก่อให้เกิดกรดขึ้นช้า ๆ ปฏิกิริยาการหมักจึงเริ่มตั้งแต่การเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดแลคติก จนทำให้ความเป็นกรดด่างของอาหารลดลง ซึ่งสามารถแบ่งวิธีการหมักเพื่อให้เกิดกรดโดยจุลินทรีย์ได้ 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ

2.1 การหมักที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติ

กรรมวิธีนี้ขึ้นกับโอกาสของการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ถ้าจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์มีเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง ก็จะไม่ได้กลิ่นรส และลักษณะเนื้อสัมผัสของ

ผลิตภัณฑ์ตามต้องการ ในการพยายามให้เกิดการหมักที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง คือ back slopping ทำได้โดยหมักเนื้อที่สภาวะเหมาะสมก่อนในลักษณะ batch วากนั้นจึงเติมลงในเนื้อที่ต้องการหมักในลักษณะของ starter (Daly, 1973) อย่างไรก็ตามข้อเสียในการหมักโดยวิธีนี้ ได้แก่

- ใช้เวลานาน โดยทั่วไปประมาณ 3-7 วัน เป็นการสิ้นเปลืองทั้งแรงงานคน และเวลา
- มาตรฐานคุณภาพของผลิตภัณฑ์ในแต่ละครั้งมักไม่เท่ากัน เพราะขึ้นกับโอกาสการปนเปื้อนของเชื้อ
- back slopping สามารถทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการเจริญได้ดีเท่ากับเชื้อที่ต้องการ โดย Jensen (1942) กล่าวว่า วิธีนี้ไม่ใช้ในการค้าระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่

2.2 การหมักที่เกิดจากเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

ในปี 1940 Jensen และ Paddock ( 1940) พบว่า เชื้อจุลินทรีย์พวก *Lactobacillus* สามารถใช้เป็นเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นได้ Deibel (1974) กล่าวว่าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นที่ใช้ในไส้กรอกหมักควรมีลักษณะดังนี้

-สามารถเจริญในสภาวะไร้อากาศ ภายในชิ้นผลิตภัณฑ์ได้
-สามารถใช้น้ำตาลที่เติมลงไป และทำให้ผลิตกรดในผลิตภัณฑ์ได้
-ทนต่อเกลือ และสามารถเจริญเติบโตได้เร็วในภาวะที่มีเกลืออย่างน้อย 6.0 เปอร์เซ็นต์
-ต้องไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายมนุษย์

3. แลคติกแอซิดแบคทีเรีย

แลคติกแอซิดแบคทีเรียจัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae มีลักษณะทั้งที่เป็นท่อนยาว ท่อนสั้น หรือกลม แกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ในการเจริญเติบโตส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophillic) บางชนิดเป็นพวกที่ไม่ต้องการอากาศเลย ( strictly anaerobe) เป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน (Frazier และ Westhoff, 1979) มีความต้องการสารอาหารที่ซับซ้อน และค่อนข้างสมบูรณ์ในการเจริญ (Prescott และ Dunn, 1959) แหล่งพลังงาน ได้จากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน ต้องการแหล่งไนโตรเจนรวมทั้งวิตามิน และ growth factor หลายชนิดในการเจริญ เช่น riboflavin, biotin และกรดอะมิโนต่างๆ สำหรับความต้องการ organic growth factor เช่น adenine, guanine และ uracil ของจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ส่วนเกลืออนินทรีย์ที่จุลินทรีย์กลุ่มนี้บางชนิดต้อง

การในการเจริญ ได้แก่ แมงกานีส แมกนีเซียม โปแตสเซียม และฟอสเฟต (Tittsler และ คณะ, 1952 , Rogosa และคณะ, 1961 )

แลคติกแอซิดแบคทีเรียพบทั่วไปในอาหาร เช่น อาหารหมัก ผัก ผลไม้ และผลิตภัณฑ์นม ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ และสัตว์ สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคจะอยู่ในสายพันธุ์ Streptococci แลคติกแอซิดแบคทีเรียมีความสำคัญอย่างมากในอุตสาหกรรมอาหาร และอาหารสัตว์ โดยมีบทบาทที่สำคัญคือ ผลิตกรดแลคติกได้เป็นจำนวนมาก และ สร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ที่ก่อให้เกิดอาหารเน่าเสีย และ อาหารเป็นพิษได้

แบคทีเรียในตระกูลนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 10 จีนัส (Genus) ( Pot และ คณะ, 1993 a) ได้แก่

1. *Lactobacillus*

เชื้อจีนัสนี้ถูกพบโดย Beijerinck ในปี ค.ศ. 1901 ประกอบด้วย 64 สปีชี่ส์ Orla-Jensen ( 1942) ได้จัดแบ่งเชื้อในสายพันธุ์นี้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การใช้แหล่งคาร์บอน ลักษณะการใช้สารอาหาร ช่วงอุณหภูมิสำหรับการเจริญ และผลของการ agglutination และยังแบ่งเชื้อในจีนัสนี้ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มแรกประกอบด้วย *Thermobacterium*, *Streptobacterium* และ *Streptococcus* ซึ่งทั้งหมดจะให้ผลคะตาเลสเป็นลบ ผลผลิตส่วนใหญ่คือกรดแลคติก ที่เหลือจะเป็นสารอื่นเพียงเล็กน้อย ในกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยกลุ่ม *Betabacterium* และ *Betacoccus* ให้ผลคะตาเลสเป็นลบ แต่จะสร้างกาซในปริมาณที่ตรวจสอบได้ และผลผลิตอื่นๆ นอกเหนือจากกรดแลคติก ในกลุ่มที่ 3 คือ *Microbacterium* และ *Tetracoccus* จะให้ผลคะตาเลสเป็นบวก

แลคติกแอซิดแบคทีเรียในจีนัสนี้อาจพบรูปร่างหลายแบบเช่น coccobacillus, bent, rods, coryneform หรือ Thread--like จะเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ (aerobe) หรือต้องการอากาศเล็กน้อย ( microaerophile) มีทั้งพวกที่เป็น homofermentative และ heterofermentative lactic acid bacteria

2. *Carnobacterium*

เชื้อจีนัสนี้ถูกค้นพบโดย Collins และคณะ, 1981 โดยดูลักษณะทางสรีระวิทยา ทางเคมี และชีวเคมี พบว่ามีความเหมือนกับเชื้อในจีนัส *Lactobacillus* มาก แต่ไม่สามารถเจริญบนอาหารแข็ง หรืออาหารเหลวอะซิเตทได้ เชื้อในจีนัสนี้มีอยู่ด้วยกัน 4 สปีชีส์ คือ *Carnobacterium divergens* , *C. gallinarum, C. mobile* และ *C. piscicola* จัดเป็นพวก heterofermentative lactic acid bacteria ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างแท่ง อาจพบเดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น สามารถผลิต กรด L-lactic จากน้ำตาลกลูโคสได้

3. *Streptococcus*

เชื้อจีนัสนี้มีลักษณะกลมแบบ cocci หรือรูปรีแบบ oval ไม่สร้างสปอร์ มีขนาดประมาณ 0.5-1.0 ไมโครเมตร จะพบเป็นคู่ หรือเป็นสาย มีทั้งพวกที่ต้องการอากาศ (aerobe) หรือพวกที่ต้องการอากาศเล็กน้อย (microaerophile) Streptococcus จัดอยู่ในกลุ่ม homofermentative lactic acid bacteria คือหมักคาร์โบไฮเดรต แล้วได้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ เป็นแบคทีเรียที่พบมากในฐานะเป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์ และมนุษย์ ในปาก และระบบทางเดินอาหารของสัตว์ และมนุษย์ ในนมดิบ ผลิตภัณฑ์จากนม และพืช

4. *Lactococcus* ( N-*Streptococcus* )

ในปี ค.ศ. 1988 ได้มีการเสนอให้เปลี่ยนจีนัส *Streptococcus* เป็นจีนัส *Lactococcus* โดยยังคง species และ subspecies ไว้ตามเดิม ซึ่งได้รับการยอมรับจาก International Union of Microbiology Societies ตัวอย่างของแบคทีเรียสกุลนี้ ได้แก่ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ( *Streptococcus lactis* subsp. *lactis*), *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactic* (*S. lactis* subsp. *diacetylactis*), *L .lactis* subsp. *cremoris (S. lactis* subsp. *cremoris)* อย่างไรก็ตาม ยังคงปรากฏชื่อ *Streptococcus lactis* ทั้ง 3 subspecies ใน Bergey' s Manaul of Systematic Bacteriology 8 $^{th}$ edition ( Schleifer, 1986)

5. *Leuconostoc*

เชื้อจีนัส *Leuconostoc* มีอยู่ด้วยกัน 10 สปีชีส์ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างไปจากเชื้อในจีนัส *Lactobacillus* อย่างชัดเจน แลคติกแอซิดแบคทีเรียชนิดนี้มีรูปร่างกลม

(cocci) จะพบเป็นคู่ หรือเป็นสาย มีทั้งพวกที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobe) หรือพวกที่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) *Leuconostoc* จัดอยู่ในกลุ่ม heterofermentative lactic acid bacteria สามารถพบได้ทั่วๆ ไปในธรรมชาติ เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อการเริ่มต้นขบวนการหมักพวกผัก มีบางสายพันธุ์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมนม เนื่องจากส่วนใหญ่ *Leuconostoc* จะเจริญในน้ำนมได้ช้า จึงไม่เหมาะสมในการใช้เป็นหัวเชื้อเพื่อการผลิตกรด แต่มีสมบัติพิเศษที่สามารถเมตาโบไรท์ได้เป็นสารพวกไดอะซิติล ( Acetyl) จึงมักนิยมใช้เพื่อผลิตสารที่มีกลิ่นหอม (นภา โล่ห์ทอง, 2522)

6. *Pediococcus*

เชื้อจีนัสนี้มีรูปร่างกลม (cocci) ซึ่งอาจอยู่เป็นคู่ (pairs) หรือกลุ่ม (tetrads) จัดเป็นพวกที่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) และเป็น homofermentative lactic acid bacteria ลักษณะพิเศษคือสามารถสร้าง racemic (DL) lactic acid จากน้ำตาลกลูโคส แบคทีเรียพวกนี้มักพบในอาหารพวกผัก เนื้อ (ไส้กรอกเปรี้ยว) เป็นต้น ( Kandler และ Weiss, 1986)

7. *Aerococcus*

เชื้อจีนัสนี้ จะมีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อในจีนัส *Pediococcus* มาก โดยผลการทดสอบทางสัณฐานวิทยา และ สรีระวิทยา ของเชื้อในจีนัส *Aerococcus* และ *Pediococcus* ยังคลุมเครือไม่สามารถแยกออกจากกันได้ชัดเจน เชื้อในจีนัสนี้มี 1 สปีชีส์ คือ *Aerococcus viridans* Dellagio และคณะ, 1981 พบว่า *A. viridans* และ *P. urinaeequi* จะมีฟีโนไทป์ที่เหมือนกันมาก และพบว่า DNA : DNA hybridization มีความสัมพันธ์กันมาก

8. *Tetragenococcus*

Collin และคณะ, 1990 พบว่าเชื้อ *P. halophilus* มี 16S RNAs ที่ต่ำกว่าเชื้ออื่น ๆ ในกลุ่ม *Pediococcus* และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดพบว่าเชื้อนี้มี phylogenetic ที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อในจีนัส *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าเชื้อในจีนัส *Pediococcus* หรือ *Lactobacillus* ดังนั้นจึงมีการจัดใหม่เป็น *Tetragenococcus halophilus*

9. *Bifidobacterium*

เชื้อจีนัสนี้มีการค้นพบในปี 1900 (Tissier และคณะ ,1900) ที่แยกจากอุจจาระเด็กทารกสุขภาพสมบูรณ์ที่ดื่มนมมารดาแต่เดิมเรียกว่า *Bacillus bifidus communis* ต่อมาเมื่อมีการศึกษาอย่างกว้างขวางจึงตั้งชื่อว่า *Bifidobacterium bifidum* สามารถพบได้หลายรูปร่าง เช่น รูปตัว Y , V , bent, club จะ ไม่พบในลักษณะที่เป็นสายยาว เจริญได้ใน obligate anaerobe. จัดเป็นพวก heterofermentative lactic acid bacteria ลักษณะพิเศษของ *Bifidobacterium* คือ สามารถให้กรดแลคติก 1 โมล และกรดอะซิติก 1.5 โมลจากน้ำตาลกลูโคส 1 โมล เชื้อในกลุ่มนี้มีความสำคัญมากในระบบทางเดินอาหาร

10. *Enterococcus*

ในปี 1937 Sherman ได้มีการเปลี่ยน *Streptococcus faecalis, S. faecium, S. faecium subsp. casseliflavus* และ *S. avium* เป็นกลุ่ม *Enterococcus* เนื่องจากเชื้อทั้งหมดมีแอนติเจนชนิด group D ซึ่งไม่พบใน *Streptococcus* สปีชี่ส์อื่น ส่วน S. bovis, S. equinus นั้นก็มีแอนติเจนชนิด group D แต่ไม่จัดอยู่ในจีนัส *Enterococcus* เนื่องจากมีคุณสมบัติบางประการแตกต่างไปจากเชื้อในกลุ่ม *Enterococcus*

แลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถแบ่งตามลักษณะการหมักได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. Homofermentative lactic acid bacteria

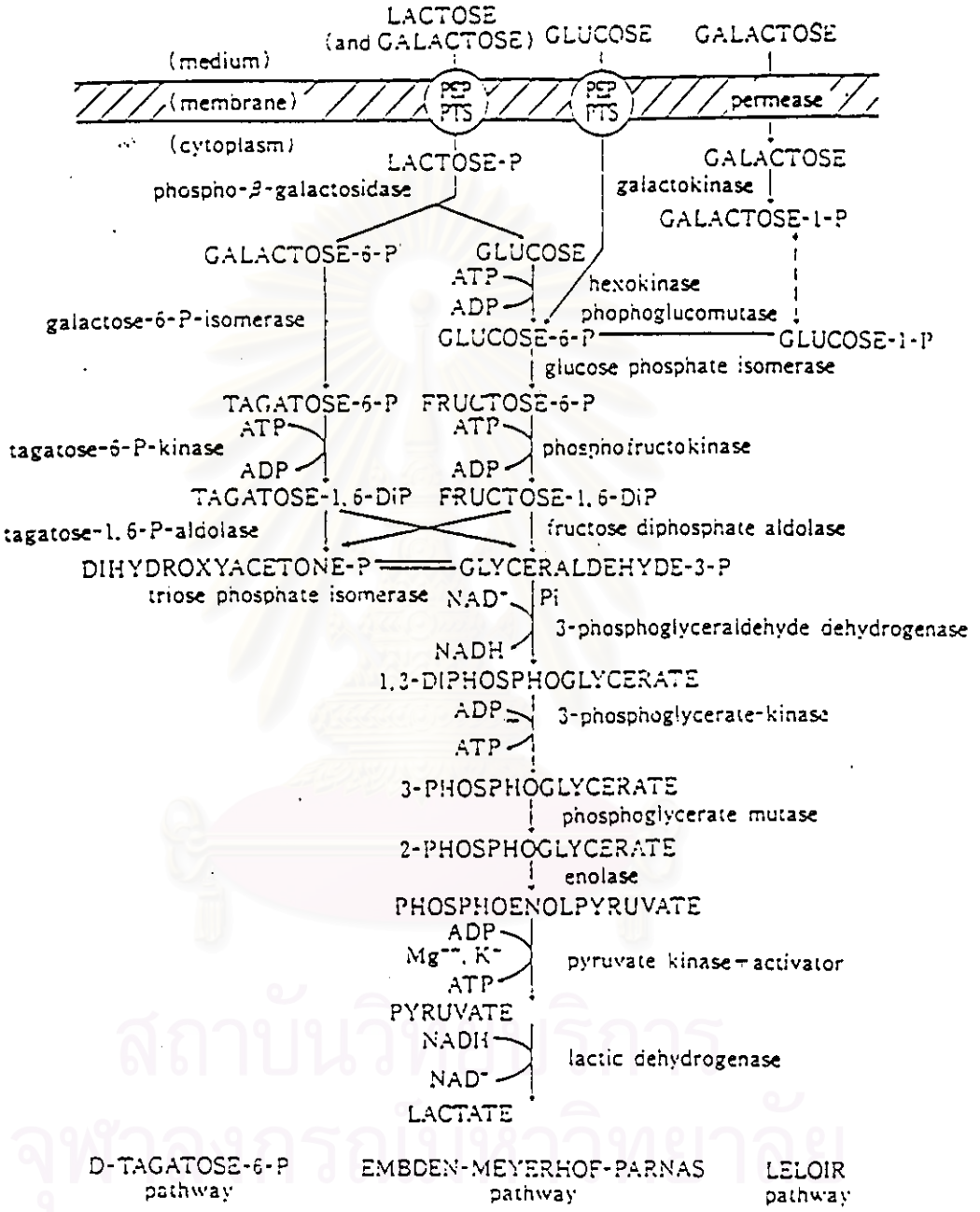
คือ แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ให้กรดแลคติก 85-95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำตาลที่เหลือเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกและคาร์บอนไดออกไซด์เล็กน้อย ขั้นตอนการสร้างกรดแลคติกเริ่มจากน้ำตาลแลคโตสจะผ่านเข้าสู่เซลของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย โดยอาศัยเอนไซม์ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม ที่เรียกว่า Phosphenol-Pyruvate-Dependent Phosphotransferase System (PEP-PTS) ทำให้แลคโตสเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) อยู่ในรูป lactose-6-phosphate จากนั้นจะถูกเอนไซม์ phospho-β- galactosidase ไฮโดรไลซ์ได้เป็น galactose-6-phosphate กับ glucose ซึ่งกลูโคสจะผ่านเข้าสู่กระบวนการต่างๆ ของ Embden-Meyerhof-Parnas Pathway : (EMP Pathway) จนได้เป็น lactate ในขั้นตอนสุดท้ายซึ่งเปลี่ยนมาจากไพรูเวต โดยเอนไซม์ lactic dehydrogenase ส่วน galactose-6-phosphate จะเข้าสู่กระบวนการต่างๆ ใน D-tagatose-

6-phosphate pathway ได้เป็น tagatose-1,6-diphosphate และเปลี่ยนเป็น dihydroxyacetone-phosphate ท้ายสุดโดยเอนไซม์ tagatose- 1,6-aldolase ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น glyceraldehyde-3-phosphate โดยเอนไซม์ triosephosphate isomerase ซึ่ง glyceraldehyde-3-phosphate เป็นสารตัวกลางในกระบวนการ EMP pathway และเปลี่ยนเป็น lactate ในที่สุด

น้ำตาลกลูโคสจะสามารถเข้าสู่เซลของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 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 แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีกระบวนการหมักแบบนี้ได้แก่ *L. bulgaricus, L. casei, L. plantarum* และ *L. acidophilus* เป็นต้น (Lawrence และ Terence, 1979) ( ดังแสดงในรูปที่ 1 )

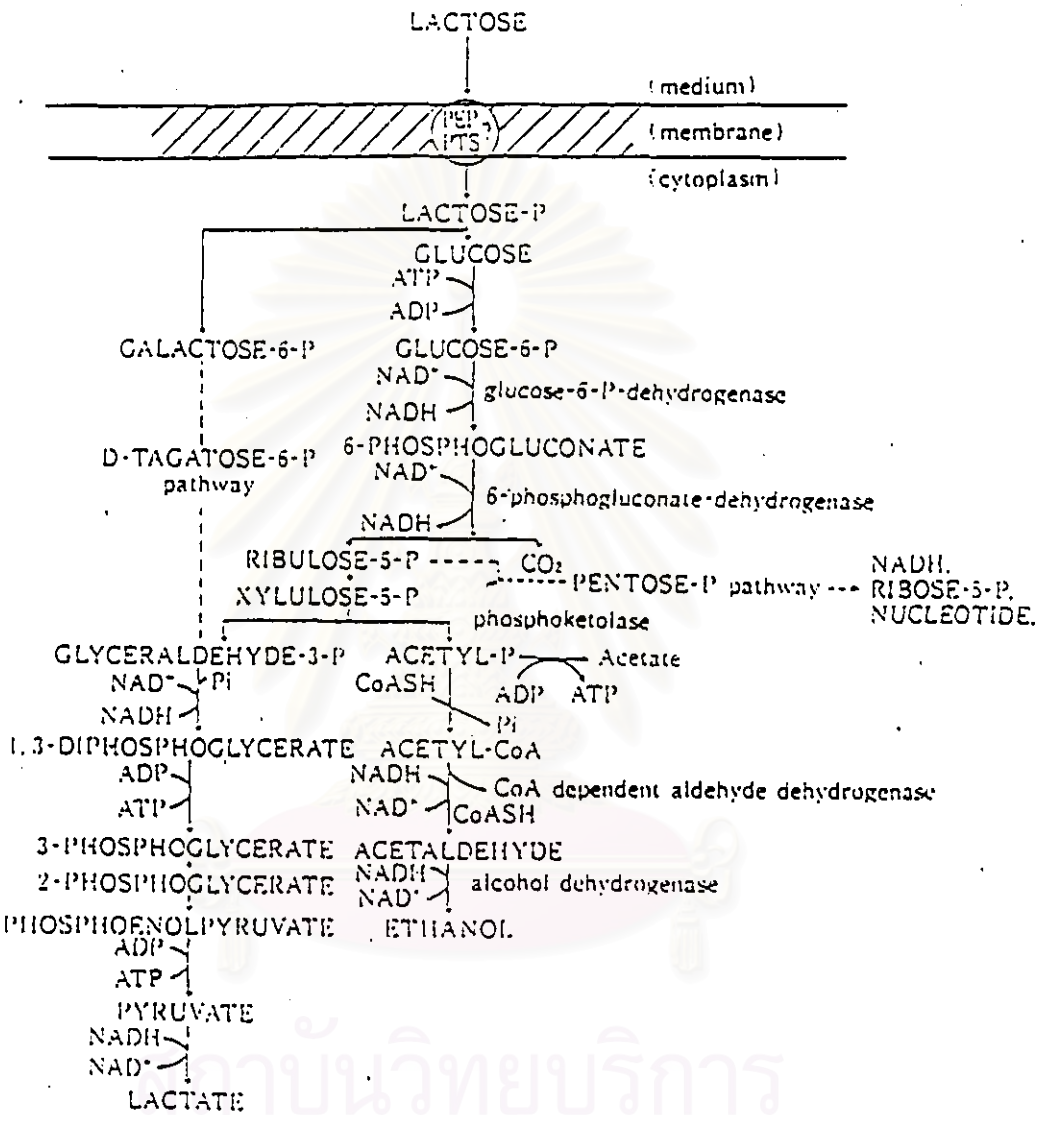
2. Heterofermentative lactic acid bacteria

แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ให้กรดแลคติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำตาลที่เหลือเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติก และเอธิลอัลกอฮอล์ 20-25 เปอร์เซ็นต์ และสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ 20-25 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างเช่น *Leuconostoc mesenteroides* (Tamine, 1981) แลคติกแอซิดแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะไม่มีเอนไซม์ aldolase ซึ่งเป็นเอนไซม์หนึ่งในกระบวนการไกลโคไลซิส จึงทำให้ไม่สามารถย่อย fructose-6-phosphate ได้เป็น triose-phosphate จึงต้องออกซิไดซ์ glucose-6-phosphate ได้เป็น 6-phosphogluconate จากนั้นเกิดปฏิกิริยา decarboxylate ได้เป็น pentose-phosphate กับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่ง pentose-phosphate จะแตกตัวเป็น และ triose-phosphate และ acetyl-phosphate โดยเอนไซม์ phosphoketolase โดยที่ triose-phosphate จะเปลี่ยนเป็น lactate ได้ ส่วน acetyl-phosphate จะเปลี่ยนเป็น acetaldehyde และ ethanol นอกจากนี้แลคติกแอซิดแบคทีเรียอาจจะใช้กระบวนการอื่นๆ ในการสร้างผลิตภัณฑ์ต่าง ๆเช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกลีเซอรอล เป็นต้น ( ดังแสดงในรูปที่ 2)




**รูปที่1** แสดงการใช้น้ำตาลของพวก homofermentative lactic acid bacteria

**ที่มา** Lawrence และ Terence, 1979




**รูปที่ 2 แสดงการใช้น้ำตาลของพวก** heterofermentative lactic acid bacteria

**ที่มา** Tamine, 1981

ลักษณะ และวิธีการจำแนกชนิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ( Vuyst และ Vandamme, 1994)

โดยดูรูปร่างเซล การจัดเรียงตัวของเซล ดูการเคลื่อนที่ การย้อมสีแกรม ดูการสร้างแคปซูล แฟลกเจลล่า พบว่าเชื้อจีนัส *Pediococcus, Lactococus, Streptococcus* และ *Enterococcus* พบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน สามารถแยกออกจากจีนัสอื่นได้ ในขณะที่เชื้อในจีนัส *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ แต่ *Lactobacillus* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา แตกต่างไปจากเชื้อในจีนัส *Streptococcus* ( *Lactococcus, Enterococcus* ) และ *Bifidobacterium* ในทางปฏิบัติพบว่าสภาวะการเจริญ และระยะการเจริญของเซล จะมีผลอย่างมากต่อลักษณะรูปร่างของเซล

2. ลักษณะทางสรีระวิทยา ( Vuyst และ Vandamme, 1994)

เกี่ยวข้องกับความต้องการออกซิเจน ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ความเข้มข้นของอิออนต่าง ๆ และ hydrostatic pressure ความแตกต่างระหว่างเชื้อในจีนัส *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* พบว่าเชื้อ *Carnobacterium* ไม่สามารถเจริญได้ที่ความเป็นกรดด่าง 4.5 หรือบนอาหารแข็งอะซิเตท แต่สามารถเจริญได้ที่ความเป็นกรดด่าง 9.0 ( Hammes และคณะ, 1991) สำหรับการแยกความแตกต่างของเชื้อในกลุ่มใหญ่ โดยใช้วิธีการทดสอบทางสรีระวิทยาอาจจะไม่เพียงพอ โดยอาจจะต้องใช้การทดสอบอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น ดูรูปแบบการหมักแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ ร่วมด้วย

3. รูปแบบการหมักแหล่งคาร์บอน ( Vuyst และ Vandamme, 1994)

เป็นวิธีที่ใช้ในการแยกชนิดของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารอาหารแตกต่างกันมาก เราจึงใช้จำแนกเชื้อได้เป็นสายพันธุ์ต่าง ๆ การศึกษาดูการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้น โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่ใส่ธาตุอาหารบางอย่างลงไป แล้วสังเกตุการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเกิดกรด การเกิดก๊าซ การเกิดสารบางชนิด เป็นต้น จากวิธีดังกล่าวทำให้สามารถทราบปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซล แต่ละขั้นตอนได้ (Bridge และ Sneath, 1982)

4. Cell Wall Composition ( Kandler และ Weiss, 1986)

การจำแนกโดยอาศัยลักษณะนี้ จะดูว่ามี หรือไม่มีสาร meso-diaminopimelic acid ในผนังเซล ซึ่งสารตัวนี้ใช้เป็น key characteristic ตรวจสอบได้โดยใช้วิธี thin-layer chromatography ลักษณะนี้นี้สามารถจำแนกเชื้อจำนวนมากออกเป็นสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้ ( Kandler และ Weiss, 1986)

ผนังเซลของแบคทีเรียแกรมบวก ประกอบด้วย peptidoglycan ที่มีกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ( Schleifer และ Kandler, 1972) และพบว่า peptidoglycan ชนิด Lys-D-Asp จะเป็นลักษณะส่วนใหญ่ของเชื้อในจีนัส *Lactobacillus* ซึ่งองค์ประกอบของ peptidoglycan นี้ ใช้เป็นวิธีการที่เร็วที่สุดที่จะจำแนกเชื้อ *L. reuteri* และ *L. fermentum* ออกจากกันได้

5. Electrophoretic Mobility of Lactic Acid Dehydrogenase
( Hensel และคณะ, 1977)

วิธี Electrophoretic Mobility of Lactic Acid Dehydrogenase (LDH) ใน starch gel หรือ polyacrylamide gel ( Hensel และคณะ, 1977) เป็นวิธีที่พบว่ามีประโยชน์ และเชื่อถือได้ในการจำแนกความแตกต่างของสปีชีส์ของเชื้อที่ใกล้เคียงกันมาก เช่น *L. acidophilus, L. crispatus, L. gallinarum, L. gasseri* และ *L. johnsonii* ( Fujisawa และคณะ, 1992)

6. SDS-PAGE Of Whole Cell Protein (Pot และคณะ, 1993a)

หลักการของวิธีนี้ คือ เชื้อที่มีสายพันธุ์ต่างกันจะให้รูปแบบของโปรตีนที่ไม่เหมือนกัน ทำให้เราสามารถแยกความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ได้ โดยใช้ sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าวิธีนี้มีความแน่นอนในระดับสปีชีส์ และ/หรือในระดับ subspecies (Pot และคณะ, 1993a) การจำแนกแลคติกแอซิดแบคทีเรียโดยวิธีนี้สามารถใช้จำแนกเชื้อที่มีปัญหาได้ เช่น *Lactococcus* ( Jarris และ Wolff, 1979) *L. kefir, L. reuteri* (Dicks และ Van Vuren, 1987) และ *Leuconostoc* ( Barreu และ Wagener, 1990)

การจำแนกเชื้อโดยวิธี SDS-PAGE นี้ จะทำได้ง่าย รวดเร็ว และ เชื่อถือได้ มีประโยชน์ในการจัดกลุ่มของเชื้อที่มีเป็นจำนวนมาก เชื้อที่จำแนกแล้วอาจนำไปทดสอบยืนยันเพิ่มเติมโดยวิธีการทางจีโนไทป์ และฟีโนไทป์ ต่อไปได้

7. Serology (Lancefield, 1933)

เป็นวิธีการที่สำคัญในการแยกและจำแนกเชื้อในจีนัส *Streptococcus* Lancefield (1933) ได้จัดแบ่งเป็นกลุ่ม และใช้ตัวอักษรแทนในแต่ละกลุ่มนั้นๆ กลุ่มแอนติเจนเฉพาะที่มีโพลีแซคคาไรด์อยู่รวมในส่วนของผนังเซล จะเรียกว่า group A, B, C, E, F และ G หรือ ที่มีteichoic acid อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซล และผนังเซลชั้นใน (group D และ N) การจำแนกโดยวิธีนี้ ใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่าง pathogenic β-haemolytic Streptococci จากโรคติดเชื้อของมนุษย์ และสัตว์ แต่ไม่สามารถใช้ในการจำแนกเชื้อ non-haemolytic หรือ α - haemolytic ชนิดต่างๆ

8. การศึกษา DNA base composition และ DNA : DNA hybridization ( Boehringer, 1995)

วิธีนี้มีหลักการ คือ สายดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกันจะสามารถจับคู่กันได้ โดยดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีความเหมือนกัน และสามารถเข้าคู่กันได้ วิธีนี้ทำโดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จะใช้เป็น probe มาติดฉลาก ซึ่งอาจติดโดยใช้สารกัมมันตรังสี (radioactive label) หรืออาตใช้สารปลอดรังสี (non-radioactive label) จากนั้นนำ probe ที่ได้ไปทำ hybridization กับดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ ถ้าสามารถเข้าคู่กันได้จะปรากฏสัญญาณ (signal) ขึ้นมา ซึ่งการตรวจสอบจะใช้เครื่องมือที่แตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของ probe

DNA base composition และ % ของ DNA similarity ภายหลังการเกิด DNA : DNA hybridization ของ type strain ของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย จะใช้เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกแลคติกแอซิดแบคทีเรียในสปีชีส์ต่าง ๆ เชื้อที่มี DNA base composition ที่เหมือนๆ กัน ไม่จำเป็นที่จะต้องมีความใกล้เคียงกัน การจำแนกโดยวิธีนี้ได้มีผู้ประยุกต์ใช้ในการศึกษาการจำแนกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ได้แก่ Simonds และคณะ, 1971 ; Vescovo และคณะ, 1979 ได้ศึกษาใน *Lactobacillus* sp., Garvie( 1976) ได้ศึกษาใน *Leuconostoc* sp. , Dellaglio และ Torriani ( 1986 ) ได้ศึกษาใน *Pediococcus* sp. และ Jarvis และ Jarvis ( 1981) ; Collins และคณะ, 1984bได้ศึกษาใน *Lactococcus* sp. , *Enterococcus* sp. และ *Streptococcus* sp.

9. การศึกษา plasmid profile ( Josephson และ Nielsen, 1988)

แลคติกแอซิดแบคทีเรียบางสปีชีส์จะมีพลาสมิดอยู่ในเซลซึ่งควบคุมคุณสมบัติพิเศษบางอย่างของเชื้อ เช่น การผลิตเมือก การผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ต่าง ๆ เป็นต้น โดย

พลาสมิดของเชื้อที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันจะมีจำนวน ขนาด และลำดับเบสที่เหมือนกันเมื่อแยกพลาสมิดจากเซลแล้วนำมาตัดโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ทราบตำแหน่งการตัดที่แน่นอน แล้วนำมาทำเจล อิเลคโตรโฟลิซิส จะได้รูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นส่วนของพลาสมิด ซึ่งสามารถนำรูปแบบที่ได้นี้มาเปรียบเทียบกันได้โดยถ้าเป็นเชื้อในสปีชีส์เดียวกันจะมีรูปแบบที่เหมือนกัน ความคลาดเคลื่อน หรือความไม่แน่นอนของคุณสมบัติในการเมตาบอไรท์ และลักษณะทางกายภาพของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย สามารถทดสอบยืนยันเพิ่มเติมได้โดยการดูพลาสมิดที่มีอยู่ในเซล ความหลากหลายของจำนวน และขนาดของพลาสมิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรียในสปีชีส์เดียวกัน จะใช้เป็นลักษณะที่สำคัญสำหรับการกำหนดลักษณะ และใช้จำแนกแลคติกแอซิดแบคทีเรียออกจากกันได้

10. การศึกษา DNA : rRNA hybridization (Garvie และ Farrow , 1981)

วิธี DNA : rRNA hybridization นี้ ใช้จำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ โดยการวิเคราะห์ลำดับของ rRNA (rRNA sequence) วิธีนี้เริ่มแรกใช้ในการจำแนกเชื้อ *Streptococcus* sp. และใช้เป็นลักษณะสำคัญในการใช้สำหรับการจำแนกเชื้อในจีนัส *Enterococcus* sp. และ *Lactococcus* sp. (Garvie และ Farrow, 1981) และ DNA : rRNA hybridization นี้ถูกนำมาใช้โย Garvie (1981) และ Schillinger และคณะ, 1989 ในการศึกษาความสัมพันธุ์ระหว่างเชื้อ *Leuconostoc* sp. และ *Lactobacillus* sp. บางสายพันธุ์

11. 16S rRNA cataloquing
(Vuyst และ Vandamme, 1994 ; Collins และคณะ, 1993)

วิธีนี้ทำได้โดยการตรวจสอบลำดับเบส บนสาย RNA ของไรโบโซมขนาด 16S โดยจะมีบริเวณที่ประกอบด้วยยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะพื้นฐานประจำ ซึ่งจะไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงไปจากบรรพบุรุษ การตรวจสอบลำดับเบสบริเวณนี้จึงสามารถบอกได้ว่าเชื้อเหล่านั้นอยู่ในสปีชีส์เดียวกันหรือไม่

ในการจำแนกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียโดยวิธีนี้จะประสบความสำเร็จอย่างดี ต้องใช้การวิเคราะห์ที่ยุ่งยาก และใช้เวลานานมาก แต่ได้มีนักวิจัย 2 ท่านคือ Stackebrandt และคณะ (1983) ; Ludwig และคณะ (1985) ได้ใช้วิธีนี้ในการจำแนกเชื้อ แต่ในเวลาต่อมาได้มีนักวิจัยอื่นได้ใช้วิธีการจำแนกเชื้อโดยใช้ rRNA sequence แทนการจำแนกโดยวิธี 16S rRNA cataloquing นี้

12. Restriction Fragment Length Polymorphism ( RFLP)
( Hertel และคณะ, 1993)

เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างในระดับสปีชีส์ โดยนำดีเอ็นเอทั้งจีโนม (genomic DNA) ของเซลมาตัดย่อยโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ทราบตำแหน่งการตัดที่แน่นอน โดยเอนไซม์จะตัดดีเอ็นเอออกเป็นชิ้นที่มีขนาดต่าง ๆกัน โดยเชื้อที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันดีเอ็นเอจะถูกตัดได้ขนาดชิ้นต่าง ๆ เหมือนกัน การตรวจสอบขนาดชิ้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดนี้ทำได้โดยวิธีเจล อิเลคโตรโฟลิซิส

13. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)
(William และคณะ, 1991)

วิธีนี้เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มซึ่งอาศัยปฏิกิริยา PCR แต่วิธีนี้จะใช้ oligonucleotide primer สายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสที่ไม่จำเพาะเจาะจงกับยีนใดยีนหนึ่งบนสาย DNA template เรียกว่า arbitary primer และไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสบนสาย DNA template ก่อน โดย primer นี้ จะเข้าไปสุ่มจับกับสาย DNA template ณ ตำแหน่งต่าง ๆ ที่เบสสามารถเข้าคู่กันได้ ดังนั้นเชื้อที่อยู่ในสายพันธุ์เดียวกัน และมีลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอเหมือนกันก็จะถูกสุ่มจับโดย primer นั้น ๆ ณ ตำแหน่งเดียวกัน จึงใช้วิธีนี้ในการจำแนกสายพันธุ์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียว่าเป็นสายพันธุ์ใด และ ยังสามารถใช้ในการตรวจตามการถ่ายทอดพันธุกรรมได้อีก

แลคติกแอซิดแบคทีเรียนอกจากจะมีบทบาทที่สำคัญในการผลิตอาหารต่าง ๆ ดังกล่าวมาแล้ว ยังมีบทบาทอื่น ๆ ที่สำคัญ เช่น ใช้เป็นจุลชีพทดสอบ (Test organisms) ในการวิเคราะห์วิตามิน (Frazier และ Westhoff, 1979) บางสายพันธุ์ใช้ผสมในอาหารสัตว์แทนการใช้สารปฏิชีวนะ

การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ โดยแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

ผลการถนอมอาหารของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ระหว่างการผลิต และการเก็บรักษาอาหารหมัก ที่สำคัญ คือ สภาวะกรด โดยเกิดขึ้นในอาหารระหว่างการหมัก การสร้างกรดนี้ จะเป็นขั้นตอนแรกของการหมักโดยการเปลี่ยนสารคาร์โบไฮเดรต ในอาหารไปเป็นกรดอินทรีย์ (กรดแลคติก และกรดอะซิติก) โดยเกิดขึ้นพร้อมกับการลดลงของความเป็นกรดด่างของอาหาร มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มอายุการเก็บ และความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์สุดท้าย นอกจากนี้ แลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถผลิตและปลดปล่อยสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่นนอกเหนือไปจากกรดแลคติก และกรดอะซิติก สารเหล่านี้จะยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด และมีผลสำคัญช่วยในการถนอมอาหาร โดยสารเหล่านี้จะผลิตออกมาในปริมาณที่น้อยกว่ากรดแลคติกและ กรดอะซิติก ซึ่งสารเหล่านี้ได้แก่ กรดฟอร์มิก กรดไขมันอิสระ แอมโมเนีย เอธานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิติล อะซิโตอิน 2,3- บิวทาไดออล อะซิทัลดีไฮด์ เบนโซเอท เอนไซม์แบคเทอริโอไลติก แบคเทอริโอซิน และ แอนติไบโอติก (Klaenhammer,1988 ; Daeschel, 1989 ; Lindgren และ Dobrogosz, 1990 ; Schillinger, 1990 และ Piard และ Desmazeaud, 1991) สารเหล่านี้บางตัวมีผลยับยั้งต่อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดอาหารเน่าเสีย และจุลินทรีย์ที่ทำให้ก่อโรค เช่น psychrotrophic Lactobacilli และ *Leuconostoc* , *Bacillus cereus, Clostridium botulinum, Cl. perfringens, Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น

1. กรดอินทรีย์

การสะสมของกรดอินทรีย์ซึ่งจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงในช่วงเริ่มต้นของการหมักจะมีผลต่อจุลินทรีย์บางชนิดที่ไม่สามารถทนกรด เช่น *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp. เป็นต้น กรดอินทรีย์จะมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยการยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมที่จำเป็นต่อการดำรงชีพ กรดอินทรีย์ที่อยู่ในรูปไม่แตกตัวจะสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้ และแตกตัวเป็นอิออนภายใน ทำให้ระดับความเป็นกรดด่างภายในเซลล์ลดลง หรืออาจเกิดปฏิกิริยากับเซลล์ มีผลทำลายเซล หรือหน่วงเหนี่ยวการเจริญของจุลินทรีย์นั้น ๆ (Orla-Jensen, 1919)

Ingram, Ottowan และ Coppock (1956) กล่าวว่า ปัจจัยที่มีผลต่อกลไกการถนอมอาหารที่เป็นกรด มี 3 ประการ คือ ผลของความเป็นกรดด่าง ผลของกรดอินทรีย์ และผลจำเพาะต่อโมเลกุลของเซลล์ Sorrel และ Speck (1970) พบว่า *Leuconostoc citrovorum* ซึ่งเป็นพวก heterofermentative lactic acid bacteria สามารถผลิตกรดอะซิติก และให้ผล

การยับยั้งที่ดีกว่ากรดแลคติก Lubis (1983) พบว่าเมื่อระดับ pH สูงขึ้นจาก 4.0-5.5 จนเป็นกลาง (pH7.0) จะทำให้คุณสมบัติการยับยั้งการเจริญหมดไป Rubin, Vaughan และ Nerad (1982) พบว่าโมเลกุลของกรดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นได้ดีกว่าระดับความเป็นกรดด่าง

2. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

แลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ($H_2O_2$) ระหว่างการเจริญเติบโตได้ โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงเซลในสภาวะที่มีอากาศ โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ flavoprotein oxidase หรือเอนไซม์ NADH peroxidaseโดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอน เคลื่อนย้ายอิเลคตรอนผ่านเอนไซม์ flavin ซึ่งอาจเกิดได้หลายทางดังปฏิกิริยา

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

$2NADH + 2H^+ + O_2 \xrightarrow{NADH : H_2O \text{ oxidase}} 2NAD^+ + 2H_2O$

$NADH + H+ + H_2O_2 \xrightarrow{NADH \text{ peroxidase}} NAD+ + 2H_2O$

$2O_2 + 2H^+ \xrightarrow{\text{superoxide dismutase}} H_2O_2 + O_2$

$2H_2O_2 \xrightarrow{Mn^{2+}\text{-pseudocatelase}} 2H_2O + O_2$

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

$\alpha\text{-glycerophosphate} + O_2 \xrightarrow{\alpha\text{-glycerophosphate oxidase}} \text{dihydroxyacetone-phosphate} + CO_2 + H_2O_2$

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

ที่มา Gotz, Sedewitz และ Elster (1980)

อาหารเลี้ยงเชื้อของแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะมีปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สะสมอยู่มาก เพราะแลคติกแอซิดแบคทีเรียไม่มีเอนไซม์แคตาเลส ที่จะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Kandler และ Weiss, 1986) การสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะสามารถ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นที่รู้จักกันดี เช่น *Staphylococcus aureus* , *Salmonella typhimurium*, Enterogenic *E. coli*, *Clostridium perfringens* โดยที่ *S. aureus* และ *Cl. perfringens* จะถูกยับยั้งได้ดีกว่า *S. typhimurium* และ *E. coli* โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะเกิดการออกซิไดซ์อย่างรุนแรงภายในเซล ทำลายโครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุลของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนในเซล (Gilland และ Speck, 1977) นอกจากนี้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่น ๆ และรวมตัวเป็นสารประกอบยับยั้งจุลินทรีย์ได้ เช่น ในน้ำนมดิบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ได้จากแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก 10 นาโนโมลต่อลิตรจะทำปฏิกิริยากับ endogenous thiocyanate ( $SCN^-$ ) ความเข้มข้น 10 ppm. โดยมีเอนไซม์ lactoperoxidaseสร้างสารตัวกลาง (intermediate oxidation) มีชื่อว่า hypothiocyanate($OSCN^-$ ) จะได้ผลผลิตที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ และช่วยยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบได้ เรียกขั้นตอนนี้ว่า lactoperoxidase antibacterial system (Banks, Broad และ Sparks, 1986 ; และ Harnulv ,1984)

3. คาร์บอนไดออกไซด์

เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่สำคัญในการหมักน้ำตาล hexose โดย แลคติกแอซิดแบคทีเรียพวก heterofermentative ( รูปที่ 2 ) แลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวนมาก (รวมทั้งแลคติกแอซิดแบคทีเรียพวก homofermentative ) สามารถผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ได้จากมาเลตและ ซิเตท (Fleming และคณะ , 1986) มาเลต จะถูกเปลี่ยนไปเป็นแลคเตท และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเอนไซม์มาโลแลคเตส ขณะที่ ซิเตทจะถูกเปลี่ยนไปเป็น อะซิเตท และ ออกซาโลอะซิเตท โดยเอนไซม์ซิเตท ไลเอส

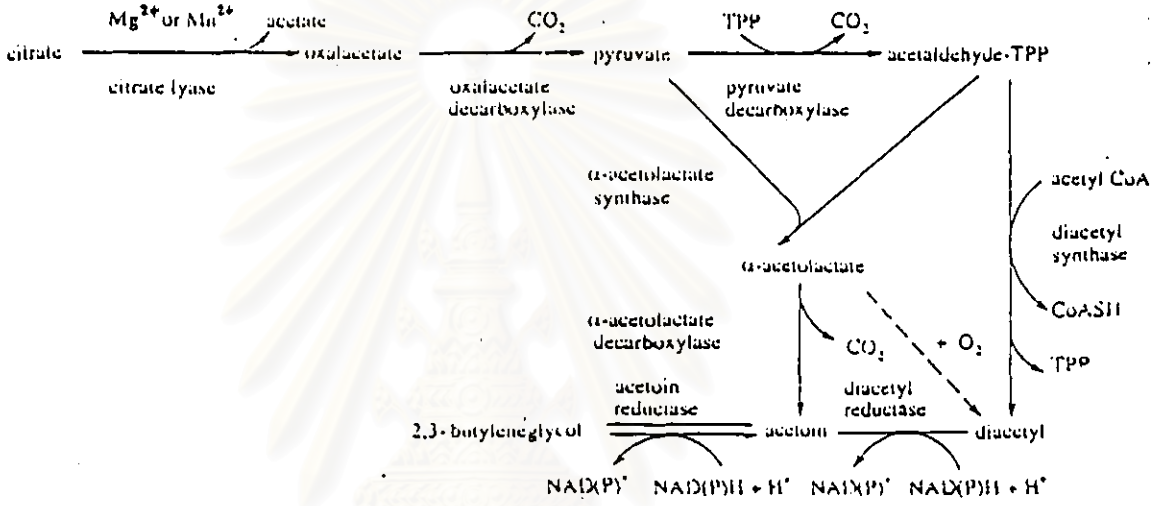
คาร์บอนไดออกไซด์ที่ผลิตโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียไม่เพียงแต่ทำให้เกิดลักษณะเป็นตาในเนยแข็งชนิดต่าง ๆ แล้ว ยังมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ๆ ได้ โดยพบว่ามีบทบาทในสภาพไม่มีอากาศ โดยการแทนที่โมเลกุลของออกซิเจนที่มีอยู่ มีผลต่อการลดลงของความเป็นกรดด่างภายใน และภายนอกเซล และยังสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลจุลินทรีย์ (cell membrane) ได้ ( Eklund, 1984) บทบาทของคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการยับยั้งและป้องกันจุลินทรีย์อื่น นี้จะมีมากในการหมักพวกผัก และหญ้าหมัก (silage) โดยพบว่ามีผลในการป้องกันการเจริญของรา (Lindgren และ Dobrogosz, 1990)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4. ไดอะซิติล ( Diacetyl)

ไดอะซิติลมีชื่อทางเคมีว่า 2,3 - butanedione จัดเป็นผลิตภัณฑ์เมตาบอไรท์ตัวสุดท้ายที่แลคติกแอซิดแบคทีเรียสร้างมาจากสารตัวกลางไพรูเวต (Pyruvate) ในสภาพที่มีออกซิเจน ดังแสดงในรูปที่ 3




รูปที่ 3 Citrate metabolism ของ *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* และ *Leuconostoc* sp.

ที่มา McKay, 1983 : 1985

ไดอะซิติลมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการทำนมหมัก เนย คอตเตจชีส เพราะเป็นสารที่มีกลิ่นหอม และยังจัดอยู่ในบัญชี GRAS ( Generally Recognized As Safe) ไดอะซิติลสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคเช่น *Mycobacterium tuberculosis* ผลในการยับยั้งจะเป็นแบบ synergistic effect ระหว่างผลของความเป็นกรดด่างที่ลดลง และไดอะซิติลที่เพิ่มขึ้น โดยยีสต์และ แบคทีเรียแกรมลบจะมีความไวต่อไดอะซิติลมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก แต่แลคติกแอซิดแบคทีเรีย และ *Clostridium* sp. มีความต้านทานต่อผลของ synergistic effect (Jay,1982) ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ รา ยีสต์ และแบคทีเรียแกรมลบ ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก

ส่วนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นสูงกว่า 350 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร กลไกการยับยั้งของไดอะซิติลคาดว่าเกิดจากการรบกวนตำแหน่งกรดอะมิโนอาร์จินีน โดยทำปฏิกิริยาที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีน หรือเอนไซม์ของแบคทีเรีย

Mather และ Babel (1959) พบว่าการเสียของครีมคอตเตจชีส เกิดจากเชื้อ *Pseudomonas fragi* จะเกิดช้าลงถ้าในการตีส่วนผสมของครีมมีการเติมเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* และพบว่าส่วนผสมที่มีการเติมเชื้อลงไปนี้จะมีความเป็นกรดด่างลดต่ำลงเล็กน้อย สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. putrefaciens* และ *E. coli* อย่างเห็นได้ชัด แต่ไม่มีผลต่อยีสต์ *Geotrichum candidums*

ไดอะซิติลได้รับการยอมรับจาก GRAS ว่าปลอดภัย สามารถใช้เป็นสารกันบูดในอาหาร แต่ก็มีข้อจำกัด เนื่องจากต้องใช้ปริมาณมาก จึงจะมีผลในการถนอมอาหาร และเนื่องจากมีกลิ่นรุนแรง จึงทำให้สามารถใช้ในอาหารได้เพียงบางชนิด อย่างไรก็ตามไดอะซิติลอาจใช้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะ เครื่องมือ เครื่องใช้ที่สัมผัสกับอาหารได้ เพราะระเหยได้ง่าย ( Jay, 1982)

5. แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินจัดเป็นสารต่อต้านจุลชีพ (antimicrobial substances) ที่มีโมเลกุลใหญ่ ซึ่งสารประเภทโปรตีน และอาจมีคาร์โบไฮเดรตร่วมอยู่ด้วย มีขนาดใหญ่กว่าสารปฏิชีวนะ และมีฤทธิ์ในการฆ่าหรือทำลายแบคทีเรียที่มีภูมิรับไว ( susceptible bacteria) และจำเพาะต่อบริเวณรับแบคเทอริโอซิน (bacteriocin receptor) บนเซลแบคทีเรียด้วย (Tagg, Dajanii และ Wannamaker, 1976) อย่างไรก็ตามแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียต่างสายพันธุ์กัน จะมีผลต่อการยับยั้งในกลุ่มแบคทีเรียที่ใกล้เคียงกัน มีลักษณะทางชีวเคมี พันธุศาสตร์คล้ายคลึงกัน แต่แตกต่างกันในการยับยั้งจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน

การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินเริ่มศึกษาใน *Escherichia coli* ที่สร้างสารโคลิซิน (colicins) ซึ่งได้มีการศึกษาอย่างละเอียดถึงกลไกการทำงาน (mode of action) ผู้ถูกอาศัย (host range) ลักษณะทางพันธุกรรม (genetic determination) การทำให้บริสุทธิ์ ( purification) เป็นต้น ได้มีการการศึกษาการสร้างต่อต้านจุลินทรีย์ที่สร้างโดยพวกแลคติกแอซิดแบคทีเรียเช่น *L. fermentum* (Deklerk,1967; Deklerk และ Smit, 1967), *L. helveticus* ( Upreti และ Hindsdill, 1973) , *L. acidophillus* ( Barefoot และ

Klaenhammer, 1983; 1984) และ *L. plantarum* ( Daeschel, Mckenny และ McDonald, 1986)

ในปี 1988 Klaenhammer ได้แบ่งสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่สร้างโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรีย เป็น 2 ประเภท ตามลักษณะผลการยับยั้งจุลินทรีย์ ( antimicrobial spectrum ) คือ

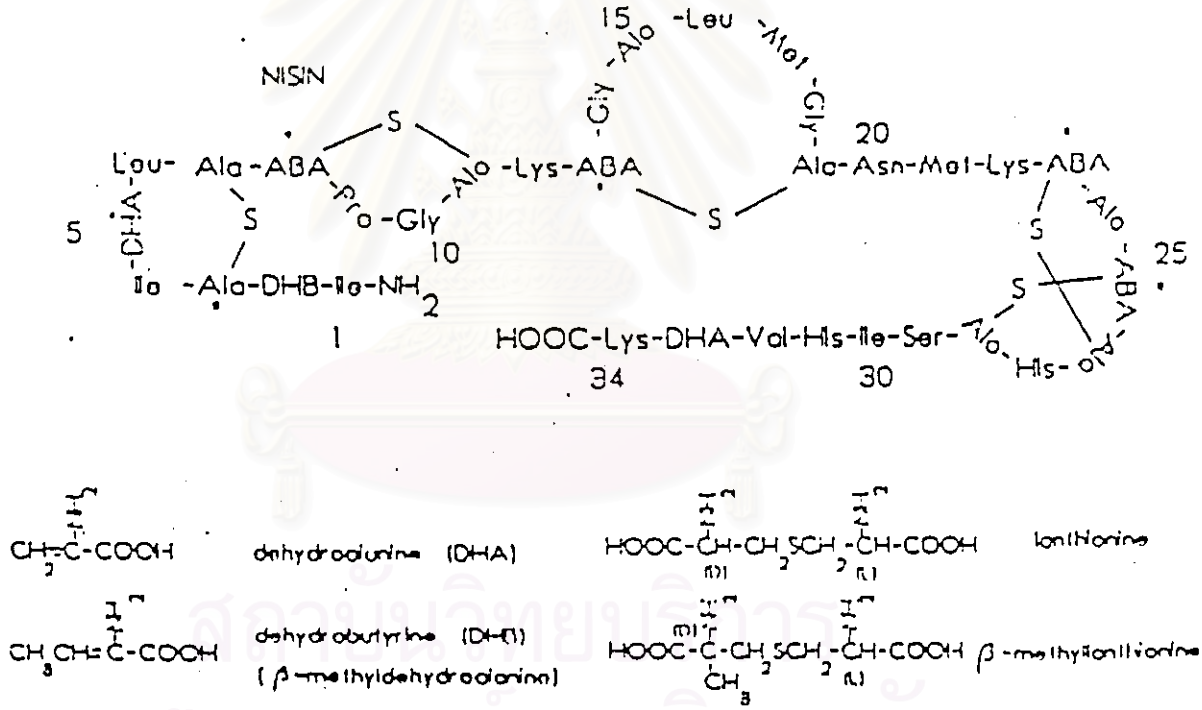
1. สารต่อต้านจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ในกลุ่มที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน เช่น แลคติกแอซิดแบคทีเรีย และแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด

2. สารต่อต้านจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิด โดยมีผลยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเช่น *Clostridium botulinum* , *Listeria monocytogenes*

ในบรรดาแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียพวก *Lactobacillus* หรือ group N *Streptococci* ที่เรียกว่า ไนซิน ( มาจาก group N-inhibiting substances) มีการนำไปใช้ในการถนอมอาหารมากที่สุด โดยมีการทดลองใช้ไนซินในอาหารสด และอาหารแปรรูปหลายชนิด เช่น เนยแข็งสวิส น้ำมะเขือเทศ ซุปข้าวโพด meat slurries และ เบียร์ พบว่าไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แกรมบวก และสามารถป้องกันการงอกของสปอร์ของเชื้อ *Clostridium botulinum* ซึ่งทนความร้อนสูง การใช้ไนซินจึงช่วยลดความร้อนที่ต้องใช้ในการฆ่าเชื้อ และฆ่าสปอร์ของ *Cl. botulinum* ในอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูป เช่นอาหารกระป๋องทำให้รักษาคุณค่าทางอาหาร และลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหารนั้นไว้ ทั้งยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนสูง

ในปีค.ศ. 1928 Roger ได้รายงานผลการยับยั้งการเจริญของ *Streptococcus lactis* ที่มีต่อเชื้อ *L. bulgaricus* โดยพบว่า *S. lactis* สร้างสารที่เป็นพวกโพลีเปปไทด์ ต่อมาภายหลังเรียกชื่อว่า ไนซิน (Nisin) มีลักษณะเป็นโมเลกุลของโพลีเปปไทด์สายตรง มีการต่อกันด้วยพันธะซัลเฟอร์ระหว่าง alanine กับ alanine เรียกว่า lanthionine และ aminobutyric acid ( ABA) กับ alanine เรียกว่า β-methyl lanthionine ดังแสดงในรูปที่ 4 ไนซินมีจำนวนกรดอะมิโน 29 ถึง 34 มีน้ำหนักโมเลกุล 7,000 ถึง10,000 ดาลตัน ถูกย่อยด้วยเอนไซม์กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีน เช่นเอนไซม์ทริปซิน เอนไซม์ pancreatin เอนไซม์จากน้ำลายหรือกระเพาะ ยกเว้นเอนไซม์เรนเนท มีคุณสมบัติในการละลายได้ดีที่ความเป็นกรดด่างต่ำ และคงตัวที่ความเป็น

กรด-ด่าง 2.0 กล่าวคือสามารถฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยไม่สูญเสียกิจกรรม แต่อย่างไรก็ตามการทำงานของไนซินยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด คาดว่าไนซินจะมีผลต่อไซโตพลาสมิกเมมเบรนโดยการจับอิออนบวก ผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไนซินจะอยู่ในช่วงแคบ คือ จะมีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Streptococcus* sp. , *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp. และ *Clostridium* sp. ปัจจุบันไนซินใช้เป็นยาปฏิชีวนะที่ยอมรับในการเติมลงในผลิตภัณฑ์อาหาร (Liu และ Hanson, 1990)




รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของไนซิน

ที่มา Liu และ Hanson, 1990

Shahani และคณะ (1977) พบว่า *L. acidophillus* ซึ่งเลี้ยงในอาหารนมเป็นเวลา 48 ชม. ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งเชื้อได้ 8 ชนิดได้แก่ *S. typhosa, S. schottmuelleri, Shigella dysenteriae, S. paradysenteriae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae* และ *Vibrio comma* สารที่ *L. acidophillus* ผลิตได้เป็นส่วนใหญ่ คือ กรดแลคติก ส่วนที่เหลือ ได้แก่ กลีเซอรอล เอธานอล กรดอะซิติก อะเซโตอิน (acetoin) ไดอะซิติล (diacetyl) และ คาร์บอนไดออกไซด์ แต่จากรายงานปรากฏว่า สารที่สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวข้างต้นไม่ใช่สารเหล่านั้น

จากรายงานของ Gilliland และ Speck (1977) พบว่า *L. acidophillus* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium, Enteropathogenic E. coli, Clostridium perfringens* โดยที่ *S. aureus* และ *Cl. perfringens* จะถูกยับยั้งได้ดีกว่า *E. coliS. typhimurium* จากการศึกษาพบว่าการยับยั้งเชื้อเหล่านี้มามีผลจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เชื้อ *L. acidophilus* สร้างขึ้น

Inove และคณะ (1980) ได้แยกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากแหนม พบว่าบางสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus, Cl. sporogenes* และ *E. coli* ได้เชื้อใดเชื้อหนึ่ง ในขณะที่บางสายพันธุ์จะมีผลต่อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งพบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ดีเมื่อไม่มี $CaCO_3$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือการยับยั้งได้ผลดีเมื่อความเป็นกรดด่างของเชื้อน้อยกว่า 6.0 นอกจากนี้ยังคงพบว่าเมื่อ ปรับความเป็นกรดด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อของแลคติกแอซิดแบคทีเรียให้เป็นกลางจะไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ จากการศึกษาพบว่า *Lactobacillus* sp. 105 และ *Pediococcus* sp. PC-1 เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด คือ สามารถยับยั้งได้ทั้ง *S. aureus, Cl. sporogenes* และ *E. coli* แม้ว่าจะมี $CaCO_3$ อยู่ด้วย หรือแม้แต่ในที่ที่มีการควบคุมระดับความเป็นกรด-ด่าง ให้อยู่ระหว่าง 6-7 ก็ยังพบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าวได้ ส่วนสายพันธุ์ N 51 และ 105 สามารผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารยับยั้งเชื้ออื่น

Davey, 1981 พบว่าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain 346 ผลิต diplococcin ในอาหารเลี้ยงเชื้อ M17 โดยสร้างในช่วงต้นของ stationary phase ผ่านการทำให้ปริสุทธิ์โดยกระบวนการทางโครมาโตกราฟี พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,300 ดาลตัน จะสลายตัวได้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อถูกความร้อนหรือถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น ไคโมทริปซิน ทริปซิน และ โปรเนส diplococcin จะมีผลในการยับยั้งการสร้างดีเอ็นเอ

และอาร์เอนเอ (DNA and RNA systhesis) ในเซลที่ไวต่อ diplococcin เช่น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* และ *L. lactis* subsp. *cremoris* ซึ่งจะทำให้เซลตายโดยไม่เกิดการไลซิส (lysis)

5. สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ยังไม่ระบุว่าเป็นสารประเภทใด ( Un-Identified antagonistic substances)

มีรายงานจำนวนมากเกี่ยวกับสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ยังไม่ทราบว่าเป็นสารชนิดใด ( Un-identified antagonistic substances) สารยับยั้งจุลินทรีย์เหล่านี้ส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ไม่เป็นสารประกอบประเภทโปรตีน แต่ยังพบว่ามีความแตกต่างไปจากสารยับยั้งจุลินทรีย์จำพวกกรดแลคติก กรดอะซิติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิติล เป็นต้น สารยับยั้งจุลินทรีย์ประเภทนี้จะไม่เหมือนแบคเทอริโอซินตรงที่ สามารถผลิตได้จากแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ (Visser และคณะ, 1986) ดังแสดงในตารางที่ 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และไม่เป็นสารประกอบประเภท โปรตีน ที่ได้จากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

| producing microorganisms | molecular mass(daltons) | inhibitory spectrum |
|---|---|---|
| *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* DRC1 | 100-300 | *Pseudomonas* sp. |
| *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylatis* S1-67/C | not known | *Pseudomonas* sp.<br>*Geotrichum candidum* |
| *Lactobacillus acidophilus* | 200 | enteropathogenic<br>spore-formers |
| *Lactobacillus* sp. | 700-1500 | |
| *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* 7994 | <700 | *Pseudomonas fragi*<br>*Staphylococcus aureus* |
| *Lactobacillus* sp. strain GG | < 1000 | anaerobic bacteria<br>*Enterobacteriaceae*<br>*Pseudomonas* sp.<br>*Staphylococcus* sp.<br>*Streptococcus* sp. |
| *Streptococcus salivarius* supsp. *thermophilus* | < 700 | *Pseudomonas* sp.<br>*Flavobacterium*<br>*Salmonella* sp., *Shigella* sp.<br>*Escherichia coli*<br>Bacilli, *Lactococcus* |

ที่มา Branen, 1975 ; Reddy และ Ranganathan, 1993a; 1993b
Handan และ Mikolajik, 1974 ; Silva และคณะ, 1987

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สมบัติของสารยับยั้งจุลินทรีย์

### Antimicrobial Spectrum and Mode of Action

การเลือกใช้สารต่อต้านจุลินทรีย์มักจะขึ้นอยู่กับความสามารถของการยับยั้งหรือหน่วงเหนี่ยวการเจริญของจุลินทรีย์ มีสารต่อต้านจุลินทรีย์เพียง 2-3 ชนิดเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด การพิจารณา Spectrum ของสารต่อต้านจุลินทรีย์จะดูจากการติดตามการเจริญของเชื้อทดสอบที่ความเข้มข้นของสารต่อต้านจุลินทรีย์ต่าง ๆ วิธีที่นิยมใช้ในการติดตามการเจริญคือ disk or agar well assay ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วแต่จะต้องคำนึงถึงชนิด และขนาดของแผ่นกรอง ความสามารถของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในการซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ สมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ เราอาจใช้อีกวิธีการ คือ การทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยติดตามความขุ่นที่เกิดขึ้นภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะบอกถึงความสามารถของสารยับยั้งจุลินทรีย์ต่อการเจริญของเชื้อทดสอบได้เช่นกัน

การเลือกใช้สารยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารชนิดใดๆ นั้น จำเป็นต้องมีการทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ของสารยับยั้งจุลินทรีย์นั้นๆ ในอาหารด้วย เพราะองค์ประกอบของอาหารและสมบัติของอาหารอาจทำให้การออกฤทธิ์ของสารยับยั้งจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงไป อาจจะมีผลจำกัดการออกฤทธิ์ของสารยับยั้งจุลินทรีย์

สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่เราใช้ในการถนอมอาหารอาจจะทำหน้าที่ ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ( bacteriostatic ) หรือทำลายจุลินทรีย์ ( bacteriocidal ) ลักษณะในการออกฤทธิ์ของสารยับยั้งจุลินทรีย์อาจแบ่งได้เป็น

1. การทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซล (cell membrane ) ทำลายความสามารถในการผ่านเข้าออก (permeability) และทำให้ลักษณะของเซลล์เสียความสมดุลไป
2. ทำให้เอนไซม์บางชนิดทำงานไม่ได้
3. ทำให้สารพันธุกรรมเสียรูปร่าง หรือหน้าที่ไปจากเดิม

โดยปกติสารยับยั้งจุลินทรีย์จะทำปฏิกิริยาที่บริเวณไม่เฉพาะเจาะจง บนผิวเยื่อหุ้มเซล ทำให้สูญเสียความสามารถในการทำงาน เช่น ความสามารถของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีลักษณะเป็น hydrophobic compounds จะจำกัดการเจริญของแบคทีเรียพวกแกรมลบ เนื่องจากสารยับยั้งจุลินทรีย์นี้สามารถซึมเข้าสู่ผนังเซลล์ในชั้น lipopolysaccharide ได้ง่าย

<u>การใช้สารยับยั้งจุลินทรีย์ หรือแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมอาหาร</u>

การใช้แลคติกแอซิดแบคทีเรียในการผลิตอาหารหมักดอง ได้ทำกันมานานแล้ว และอาหารนั้นก็สามารถบริโภคได้อย่างปลอดภัย สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ในปริมาณที่พบในอาหารหมักดองจึงเป็นปริมาณที่ปลอดภัย การใช้สารเหล่านี้ในการถนอมอาหารจึงควรใช้ในปริมาณดังกล่าว ในกรณีที่ใช้สารบริสุทธิ์เพื่อวัตถุประสงค์เป็นสารกันเสีย ก็ควรจะต้องลดปริมาณลง สารยับยั้งจุลินทรีย์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่กล่าวมานี้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้รับอนุญาตให้ใช้ในอาหารเพื่อฟอกสี และ modification อาหารแป้ง แต่ไม่อนุญาตใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร ไดอะซิติลสามารถใช้ในอาหารได้อย่างปลอดภัย แต่การใช้มีข้อจำกัดเนื่องจากมีกลิ่นรุนแรง จึงใช้ได้เฉพาะในอาหารบางประเภท เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมักเท่านั้น ในปัจจุบันได้มีการใช้แบคเทอริโอซิน หรือแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อการถนอมอาหาร และป้องกันการสูญเสียเนื่องจากแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ได้มีนักวิจัยรายงานว่า แบคเทอริโอซินที่สร้างมาจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวกได้หลายชนิด รวมทั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค เช่น *S. aureus*, *L. monocytogenes* และ *Cl. botulinum* และ อาจมีผลยับยั้งต่อแบคทีเรียแกรมลบได้ถ้ามีการใช้แบคเทอริโอซินกับ chelating agents อื่นๆ ( Steven และคณะ, 1991 )

แบคเทอริโอซินที่ได้กล่าวมาทั้งหมดนี้จะมี ไนซิน ที่ได้รับการยอมรับว่าเป็น GRAS ( Generally Recognized as Safe ) และสามารถใช้ได้ในประเทศสหรัฐอเมริกา ( Food & Drug Administration, 1988 ) โดย *L. lactis* จะใช้ในอุตสาหกรรมการทำเนย (Ripened Cheese ) ส่วนไนซินจะใช้เป็น food additive ในขั้นตอนการทำ cheese spreads โดยที่ยังคงมีแอคติวิตี้ และความเสถียรเหมือนเดิม

การใช้แบคเทอริโอซินในอาหารจำเป็นต้องคำนึงถึงองค์ประกอบหลายอย่าง เช่น โครงสร้าง และองค์ประกอบของอาหาร ปริมาณไขมันในอาหาร จะมีผลต่อแอคติวิตี้ของแบคเทอรโอซิน ได้มีการศึกษาพบว่า แบคเทอริโอซินรวมทั้งไนซิน จะสามารถจับกับไขมันจึงทำให้ประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยากับแบคทีเรียลดลง ( Schillinger และคณะ, 1991 ) นอกจากนี้อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง การมี exogenous enzyme เช่น ไคโมทริน หรือทริปซิน ก็จะมีผลต่อความคงตัวของแบคเทอริโอซินในอาหารหรือเครื่องดื่ม

จากคุณสมบัติของสารต่าง ๆ ที่แลคติกแอซิดแบคทีเรียสร้างขึ้นนี้ล้วนมีบทบาทในการถนอมอาหารเพื่อทำให้สามารถเก็บอาหารได้เป็นเวลานาน ๆ โดยสารที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ได้รับการสนใจในการศึกษาวิจัยมากที่สุดคือสารแบคเทอริโอซิน เพราะมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ ดังที่กล่าวมาแล้ว รวมทั้งยังเป็นผลผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการศึกษา และวิจัยแล้วว่าไม่มีอันตรายต่อร่างกาย จึงมีการริเริ่มใช้สารเหล่านี้เพื่อประโยชน์ในด้านการถนอมอาหารในอุตสาหกรรมการหมักต่าง ๆ ซึ่งมีจำนวนมาก และก้าวหน้าสูงในปัจจุบัน แต่มักมีปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ ที่เป็นสาเหตุให้อาหารเน่าเสีย และทำให้เกิดโรคเสมอ การศึกษาสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย จึงน่าเป็นหนทางที่ดีในการหาสารที่ใช้ทดแทนสารกันบูด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารเคมี มีราคาแพง และอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ จากประโยชน์ของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้กล่าวมาข้างต้น จึงได้มุ่งเน้นวิจัยเพื่อทำการคัดแยกและจำแนกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมักดองต่าง ๆ และ นำเชื้อที่ได้มาคัดแยกเพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย