บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria: LAB)

แบคทีเรียแลกติก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) ไม่สร้างสปอร์ (non spore-forming) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยในการเจริญ (microaerophile) แต่บางชนิดก็สามารถเจริญได้ในที่ที่ไม่มีอากาศ (strictly anaerobe) แบคทีเรียสร้างกรดแลกติกเป็นแบคทีเรียรูปร่างทั้งแบบท่อนและแบบกลม (พงษ์เทพ, 2546; สุมณฑา, 2542) ประกอบด้วย 7 สกุล คือ *Betabacterium*, *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, *Streptococcus*, *Betacoccus*, *Microbactrium* และ *Tetracoccus* (Stile และ Holzapfel, 1997)

ปัจจุบันแบคทีเรียกรดแลกติกประกอบด้วย 14 สกุล (อ้างโดยอัจฉา, 2549) ซึ่งมีคุณสมบัติดังแสดงในตารางที่ 1 ได้แก่

1. *Pediococcus* เซลล์เป็นรูปกลม เรียงตัวเป็นคู่หรือสี่เซลล์ติดกัน (tetrad) ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ และไม่สร้างแคปซูล เป็นพวกที่สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobe) และสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe)

2. *Streptococcus* โดยปกติเป็นเซลล์รูปกลม หรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง น้อยกว่า 2 ไมครอน เป็นพวก aerobe และ facultative anaerobe

3. *Lactobacillus* เซลล์รูปท่อนยาว ท่อนสั้น คอคโคบาซิลไล (coccobacilli) มักเรียงตัวเป็นสาย ติดสีแกรมบวก และจะติดสีแกรมลบเมื่ออายุมากขึ้นและอยู่ในสภาพที่เป็นกรด เป็นพวกต้องการออกซิเจนน้อย (microaerophilic)

Lactobacillus จัดจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม (De vuyst and Vandamme, 1994) ตามลักษณะการใช้อาหารและการสร้างสาร คือ

1. Facultatively heterofermentative lactobacilli เชื้อกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซส (hexose) และน้ำตาลเพนโทส (pentose) ได้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. Obligately homofermentative lactobacilli เชื้อกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซส แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลเพนโทส ไม่เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

3. Obligately heterofermentative lactobacilli เชื้อกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสแต่ไม่หมักน้ำตาลเพนโทส เกิดก๊าซคาร์บอนไดออก ไซด์

Lactobacillus จัดจำแนกได้ 2 กลุ่ม (Axelsson, 1993) ตามการเจริญที่อุณหภูมิ ต่าง ๆ คือ

1. *Streptobacterium* เชื้อกลุ่มนี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส อาจเจริญหรือไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

2. *Thermobacterium* เชื้อกลุ่มนี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

4. *Leuconostoc* เซลล์อาจเป็นรูปกลม แต่โดยมากมักเป็นรูปรี การเรียงตัวมักเป็นคู่ หรือเป็นสาย เป็นพวก aerobe และ facultative anaerobe

5. *Carnobacterium* เป็นรูปท่อนแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เดิมจัดอยู่ในพวก *Lactobacilli* เชื้อ *Carnobacterium* จัดเป็นเชื้อที่มีการหมักน้ำตาลแบบ heterofermentative เชื้อส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

6. *Lactococcus* เป็นแบคทีเรียที่แยกมาจากแบคทีเรียสกุล *Streptococcus* โดยเป็นเชื้อรูปกลม หรือรูปไข่ อยู่เดี่ยวๆ เป็นคู่ หรือต่อกันยาวเป็นสาย ติดสีแกรมบวก ไม่มีแคปซูล และเคลื่อนที่ไม่ได้ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 10-30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

7. *Vagococcus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม หรือรูปไข่ ท่อนสั้น เซลล์อยู่เป็นแบบเดี่ยวๆ ไม่สร้างสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เป็นพวก facultative anaerobe เป็นเชื้อที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

8. *Weissella* เป็นแบคทีเรียแลกติก รูปกลมที่แยกกลุ่มออกมาจาก *Leuconostoc paramesenteroides* เป็นเชื้อที่มีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียสกุล *Leuconostoc*

9. *Enterococcus* เป็นแบคทีเรียมีรูปร่างกลม มีจำนวนมากกว่า 22 สีปีชีส์ เดิมได้รวมแบคทีเรียในสกุลนี้ไว้กับ fecal Streptococci 2 สปีชีส์ คือ *Streptococcus bovis*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และ *Streptococcus equinus* แต่ในปัจจุบันแบคทีเรียกลุ่ม fecal Streptococci ไม่รวมกับสกุล *Enterococcus*

10. *Bifidobacterium* มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่เคลื่อนที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 25-28 องศาเซลเซียส แต่บางชนิดเจริญได้ที่อุณหภูมิ 43-45 องศาเซลเซียส

11. *Tetragenococcus* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือนกับ *Pediococcus* เนื่องจากเดิมคือ *P. halophilus* ที่ถูกจำแนกใหม่ เนื่องจากความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึงร้อยละ18 และมีลำดับเบสบน 16S rRNA ใกล้เคียงกับเชื้อในจีนัส *Enterobacterium* และ *Carnobacterium* (Axelsson, 1998) (อ้างโดย ศรัณย์, 2549)

12. *Propionibacterium* เป็นเชื้อแกรมบวกรูปท่อน มีการเรียงตัวเป็นคู่ ไม่สร้างสปอร์ เป็นพวกไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobe) บางสปีชีส์พบในอาหารพวกเนยแข็ง และผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

13. *Aerococcus* เซลล์เป็นทรงกลม ขนาด 1.0-2.0 ไมโครเมตร เรียงตัวติดกันเป็น 4 เซลล์หรือเป็นคู่ ไม่เคลื่อนที่ เป็นพวก facultative anaerobes มีการหมักแบบ homofermentation เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสก็สามารถเจริญได้ และไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Holt, et al., 1994) ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Aerococcus viridans* และ *A.urinae* ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจาก *Pediococcus hamari* และ *P.urinaeequi* ตามลำดับ (Axelsson, 1998) (อ้างโดย ศรัณย์, 2549)

14. *Oenococcus* ประกอบด้วยสปีชีส์เดียวคือ *Oenococcus oeni* ซึ่งเปลี่ยนจาก *Leuconostoc* ด้วยคุณสมบัติการทนกรดและเอทธานอลปริมาณสูง รวมทั้งข้อมูลทางพันธุกรรมจากดีเอ็นเอ (DNA hybridization) และลำดับเบสของ 16S rRNA ซึ่งต่างจากสปีชีส์อื่นในจีนัส *Leuconostoc* อย่างชัดเจน (Axelsson, 1998) (อ้างโดย ศรัณย์, 2549)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะสำคัญของแลกติกแบคทีเรียสกุลต่าง ๆ (Axelsson, 1998)

ลักษณะ	รูปร่างท่อน		รูปร่างกลม							
	Carno-bacterium	***Lacto-bacillus***	***Aero-coccus***	***Entero-coccus***	***Lactococcus Vagococcus***	***Leuconostoc Oenococcus***	***Pedio-coccus***	***Strepto-coccus***	***Tetrageno-coccus***	***Weissella*** [b]
เซลล์ต่อกันเป็น 4 เซลล์	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
ผลิต CO_2 จากกลูโคส	- [c]	±	-	-	-	+	-	-	-	+
เจริญที่ 10 องศาเซลเซียส	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
เจริญที่ NaCl 6.5%	ND [f]	±	+	+	-	±	±	-	+	±
เจริญที่ NaCl 18%	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
เจริญที่ pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
เจริญที่ pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
ชนิดของกรดแลกติก [d]	L	D, L, DL [g]	L	L	L	D	D, DL [g]	L	L	D, DL [g]

หมายเหตุ [a] +, ใช่ ; -, ไม่ใช่; ±, ผลขึ้นกับสปีชีส์; ND, ไม่ระบุ ; [b] *Weissella* บางสายพันธุ์มีรูปร่างเป็นท่อน; [c] +, homofermentative; - heterofermentative; [d] ชนิดของกรดแลกติกจากการหมักกลูโคส; [e] อาจผลิต CO_2 ปริมาณเล็กน้อย ขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ; [f] ไม่มีการระบุถึงการเจริญในอาหารที่มี NaCl 8%; [g] ชนิดของกรดแลกติกแตกต่างกันตามสปีชีส์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 หลักในการจัดแบ่งเป็นชนิดของแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก (พงศักดิ์ และคณะ, 2546)

แลกติกแบคทีเรียสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1) Homofermentative lactic acid bacteria สามารถหมัก (ferment) น้ำตาลกลูโคส (glucose) หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน (carbon) หกตัวแล้วให้กรดแลกติก (lactic acid) ประมาณร้อยละ 85 ถึง 95 ส่วนอีกประมาณร้อยละ 5 ถึง 15 ที่เหลือเป็นกรดอะซิติก (acetic acid) แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Lactococcus Pediococcus* และ *Streptococcus* เป็นต้น

2) Heterofermentative lactic acid bacteria สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอนหกตัวแล้วให้กรดแลกติกประมาณร้อยละ 50 ส่วนอีกประมาณร้อยละ 50 ที่เหลือเป็นกรดอะซิติก คาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide) และเอทธานอล (ethanol) เป็นต้น แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Leuconostoc* เป็นต้น

2.3 สารยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่น (พงศักดิ์ และคณะ, 2546)

สารยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่น (antibacterial substance) ที่สร้างมาจากแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก ได้แก่

1) กรดอินทรีย์ (organic acid) กรดอินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียสร้างกรดแลกติก คือ กรดแลกติกและกรดอะซีติค โดยกรดอินทรีย์จะทำให้ค่า pH ของอาหารลดลง จึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้หลายชนิด ความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์โดยกรดอินทรีย์จะขึ้นอยู่กับค่า pH, pKa (dissociation constant) และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์นั้น โดยทั่วไปกรดอะซีติคสามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่ากรดแลกติก อย่างไรก็ตามมีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถทนทานต่อกรดอินทรีย์ได้ เช่น ยีสต์ รา และแบคทีเรียที่สร้างกรด (acid-producing bacteria)

2) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) แบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติกสามารถ สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน ไฮโดรเจน-เปอร์ออกไซด์สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้ เนื่องจากไปทำให้ความสามารถในการซึมผ่านเข้า และออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ของสารต่าง ๆ เสียไป และยังมีผลทำให้เกิดการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำลายชีวโมเลกุลอื่น ๆ ภายในเซลล์ด้วย เช่น โปรตีน และกรดนิวคลีอิก เป็นต้น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นอกจากจะมีผลต่อเซลล์โดยตรงแล้วยังอาจมีผลในทางอ้อมด้วย เช่น เมื่อรวมกับ thiocyanate ภายในเซลล์และมีเอนไซม์ lactoperoxidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้เกิดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ เรียกกระบวนการเกิดสารยับยั้งดังกล่าวว่า lactoperoxidase antibacterial system

1. ไดอะซิติล (diacetyl) ไดอะซิติล หรือ 2,3-butanedione เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการเมแทบอลิซึมของ pyruvate ทั้งแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน แบคทีเรีย สร้างกรดแลกติกที่สามารถสร้างไดอะซิติล จะต้องสามารถหมักซิเตรท (citrate) ได้ ไดอะซิติลเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และ เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และราได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก กลไกการยับยั้งของไดอะซิติลเชื่อว่าเกิดจากไปรบกวนการใช้อาร์จินีน (arginine) ภายในเซลล์โดยไปทำปฏิกิริยากับ arginine-bindingprotein ของแบคทีเรียแกรมลบ ไดอะซิติลเป็นสารที่ให้กลิ่นหอมซึ่งเป็นกลิ่นที่มีอยู่ในอาหารหมักหลายชนิด เช่น เนย ไวน์แดง ไวน์ขาว บรั่นดี และกาแฟ ความเข้มข้นของไดอะซิติลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารได้โดยทั่วไปจะมากกว่า 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของไดอะซิติลในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด จะแตกต่างกันไปถึงแม้ว่าไดอะซิติลจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้ แต่ก็ต้องใช้ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง อีกทั้งยังเป็นสารระเหยที่ให้กลิ่นหอมดังนั้นจึงไม่นิยมนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหาร แต่นิยมใช้เป็นสารกำจัดเชื้อในการทำความสะอาดภาชนะหรือเครื่องมือเครื่องใช้ต่าง ๆ ในอุตสาหกรรมอาหาร

2. อะเซทาลดีไฮด์ (acetaldehyde) เป็นสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตโดย heterofermentative lactic acid bacteria ซึ่งในที่สุดก็จะถูกเปลี่ยนไป เป็นเอทธานอลโดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ถ้าแบคทีเรียสร้างกรดแลกติก ขาดเอนไซม์ alcohol dehydrogenase หรือ การสร้างเอนไซม์นี้ถูกกดจะทำให้มีอะเซทาลดีไฮด์หลั่งออกมานอกเซลล์ อะเซทาลดีไฮด์เป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะของโยเกิร์ตความ สามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยอะเซทาลดีไฮด์ อะเซทาลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1-100 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดในอาหารได้ เช่น *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Staphylococcus aureus เป็นต้น เนื่องจากในอาหารที่เติมแบคทีเรียสร้างกรดแลกติก จะมีปริมาณอะเซทาลดีไฮด์ค่อนข้างน้อย เช่น ในโยเกิร์ตพบประมาณ 25 ppm เท่านั้น ดังนั้นบทบาทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารของอะเซทาลดีไฮด์ จึงนับว่าน้อยมาก

3. รูเทอรีน (reuterin) เป็นสารที่สร้างจากแบคทีเรียสร้างกรดแลกติก รูเทอรินที่มีการศึกษากันมากเป็นรูเทอรินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus reuteri* รูเทอรินมีคุณสมบัติสำคัญคือ มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายน้ำได้ แต่ไม่ใช่โปรตีนเพราะไม่ถูกทำลายฤทธิ์โดย proteolytic enzyme จึงทำให้รูเทอรินแตกต่างจากแบคเทอริโอซิน เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของรูเทอริน พบว่าเป็น (ß-hydroxypropionaldehyde ซึ่งอาจอยู่ในรูป monomer หรือ dimers โดยเกิดขึ้นในกระบวนการ เมแทบอลิซึมของกลีเซอรอล ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยรูเทอรินมีค่อนข้างกว้าง สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ยีสต์ รา และโปรโตซัว แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญได้โดยรูเทอรินได้แก่ *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus* และ *Listeria* เป็นต้น โดยเชื่อว่ารูเทอรินมีฤทธิ์ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิด เช่น ribonucleotide reductase จึงทำให้การสังเคราะห์ DNA เสียไป ดังนั้นรูเทอรินหรือแบคทีเรียสร้างกรดแลกติกที่สร้างรูเทอรินจึงน่าจะนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการถนอมอาหารได้

4. แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) แบคทีเรียสร้างกรดแลกติกที่สร้างแบคเทอริโอซินได้มีหลายชนิด คุณสมบัติสำคัญของแบคเทอริโอซิน คือ เป็นโปรตีนหรือสารประกอบของโปรตีน เช่น lipocarbohydrate proteins หรือ glycoprotein แบคเทอ-ริโอซินส่วนใหญ่มักจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล หรือสปีชีส์ใกล้เคียงกับเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างแบคเทอริโอซินนั้น แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียต่างชนิดกันมักจะมีคุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพแตกต่างกัน เช่น น้ำหนักโมเลกุลความความสามารถในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เสถียรภาพต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนและกลไกการทำลายเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย กลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นโดยแบคเทอริโอซินอาจมีหลายแบบขึ้นกับชนิดของแบคเทอริโอซิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลไกหนึ่งที่เป็นไปได้คือเซลล์ที่จะถูกทำลายโดยแบคเทอริโอซินจะต้องมีตัวรับสำหรับแบคเทอริโอซินนั้นอยู่บนผิวเซลล์ เมื่อแบคเทอริโอซินจับกับตัวรับแล้วจะทำให้เกิดรูที่ผิวเซลล์ ดังนั้นการผ่านเข้าออกของไอออนต่างๆ ระหว่างในและนอกเซลล์จึงเสียสมดุลไปและทำให้เซลล์ตายในที่สุด อย่างไรก็ตามแบคเทอริโอซินบางชนิดก็อาจทำให้เซลล์ตายโดยเซลล์ยังคงสภาพเดิมได้ ทั้งนี้เซลล์ที่สร้างแบคเทอริโอซินจะมีภูมิคุ้มกันต่อแบคเทอริโอซินชนิดที่ตนเองสร้าง ด้วยเหตุนี้จึงทำให้แบคเทอริโอซินที่สร้างออกมานั้น ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ที่สร้าง

นอกจากนี้แบคเทอริโอซินยังถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน แบคเทอริโอซินนอกจากถูกสร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติกแล้วยังถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียชนิดอื่นๆ อีก ได้แก่ *Acetobacter*, *Actinobacillus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Staphylococcus* เป็นต้น โดยแบคเทอรินโอซินจัดเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ (antibiotic)

2.4 จุลินทรีย์ที่คัดแยกจากน้ำนมดิบสำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์นมหมัก (Jan et al., 2002)

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกซึ่งใช้ในการหมักผลิตภัณฑ์นมแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ แบคทีเรียกลุ่มที่เจริญอุณหภูมิปานกลาง(mesophilic lactic acid bacteria) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 20 องศาเซลเซียส ถึง 30 องศาเซลเซียส และเชื้อกลุ่มที่เจริญได้ในที่มีอุณหภูมิสูง (thermophilic) เจริญที่อุณหภูมิช่วง 30 องศาเซลเซียส ถึง 45 องศาเซลเซียส ในอุตสาหกรรมนมส่วนมากนิยมใช้แบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนี้เพื่อผลิตกรดแลกติกในผลิตภัณฑ์

1) Lactococci

การปล่อยน้ำนมดิบอยู่ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลาหนึ่ง จะพบจุลินทรีย์ทั่วไปเจริญได้โดยเฉพาะกลุ่ม mesophilic lactococci กล้าเชื้อกลุ่ม mesophilic lactococci ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็งหลากหลายชนิดและเป็นที่แพร่หลาย นอกจากนั้นยังนำไปผลิตเนย และนมหมักชนิดต่าง ๆ โดยคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มนี้จะคัดเลือกตามคุณลักษณะเฉพาะของเชื้อและลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ การจัดการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และความคงตัวของการผลิต เชื้อกลุ่มนี้ที่นิยมใช้ในทางอุตสาหกรรมผลิตเนยแข็งคือ *Lactococcus lactis* (*L.lactis*)

คุณสมบัติที่สำคัญที่สุดของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือความสามารถในการผลิตกรดแลกติกในน้ำนมและช่วยสร้างกลิ่นรส แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสร้างสารต้านการเจริญของแบคทีเรีย (bacteriocins) ได้แตกต่างกัน ซึ่งเป็นสารกลุ่ม proteinaceous substances ดังนั้นจึงสามารถควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียและก่อโรค

2) Thermophilic lactic acid bacteria

แบคทีเรียที่สำคัญในกลุ่มนี้มี 2 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* เรียกสั้นๆ ว่า *Lb. bulgaricus* และ *S.thermophilus* ในการผลิตโยเกิร์ตจะใช้แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ในอัตราส่วน 1:1 และบ่มน้ำนมที่อุณหภูมิ 37-45 องศาเซลเซียส โดยเชื้อ *S.thermophilus* เจริญที่อุณหภูมินี้และย่อยน้ำตาลแลกโทสด้วยเอนไซม์ ß-galactosidase และเชื้อนี้ต้องการกรดอะมิโนหลายชนิดในการเจริญ แต่ไม่สามารถย่อยโปรตีนได้จึงต้องอาศัยเชื้อ *Lb. bulgaricus* ซึ่งมีคุณสมบัติย่อยโปรตีนได้ดี ในทางกลับกันเชื้อ *Lb. bulgaricus* ต้องการกรดฟอร์มิกและคาร์บอนไดออกไซด์ในการเจริญ ซึ่งจะได้จากการย่อยน้ำตาลแลคโทสของเชื้อ *S.thermophilus* จึงเห็นได้ว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดจะอยู่รวมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน (Jan et al., 2002)

2.5 แบคทีริโอฟาจ (Bacteriophage)

1) ลักษณะโดยทั่วไป (General characteristics)

แบคทีริโอฟาจ (Bacteriophage) หรือ ฟาจ (phage) คือไวรัสที่สามารถเข้าไปติดอยู่ในแบคทีเรียเกือบทุกชนิด ซึ่งฟาจค้นพบในศตวรรษที่ 20 โดย Twort และ d' Herelle (Ackermann et al., 1987) ฟาจสามารถแยกได้จากน้ำและดิน พบฟาจจำนวน 10^{10} pfu / ml ในน้ำบริเวณผิวหน้าน้ำทะเล (Bergh et al., 1989) และ 10^{7} - 10^{9} pfu / g ของตะกอนหรือหน้าดิน (Danovaro et al., 2001) นอกจากนี้ ยังสามารถตรวจพบฟาจได้จากแบคทีเรียทั้งชนิดก่อโรคและไม่ก่อโรค ฟาจถูกแบ่งกลุ่มตามวัฏจักรชีวิตออกเป็น 2 จำพวก ได้แก่ lytic (virulent) phages และ temperate (lysogenic) phages ฟาจกลุ่มแรก (lytic phage) เมื่อเข้าไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ จะเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมและจากนั้นรวมกันใหม่กลายเป็นไวรัสใหม่ (new virions) จำนวนมาก และทำลายโฮสต์เพื่อปล่อยฟาจออกมาจากผนังเซลล์ของโฮสต์ ส่วนฟาจชนิดที่สอง (temperate phages) จะไม่มีการรวมตัวกันของสารพันธุกรรมของตัวมันเอง แต่จะแทรกเข้าไปในสารพันธุกรรมของโฮสต์ (Chopin et al., 1967; Durmaz and Klaenhammer, 2000; Brainbridge, 2000)

2) การจำแนกแบคทีริโอฟาจ (Bacteriophage classification)

ฟาจสามารถจำแนกออกโดยลักษณะสัณฐานวิทยาและจีนัสของโฮสต์ (morphotype and host genus) ในปี พ.ศ. 2510 ฟาจสามารถจำแนกออกเป็น 6 ชนิด คือ A-F ตามสัณฐานวิทยาและชนิดของกรดนิวคลีอิค (Bradley, 1967) จากนั้นมีการแบ่งฟาจออกตามลักษณะของหางได้เป็น 3 แบบ (A, B, C) และแบ่งย่อยออกตามลักษณะของหัว (Ackermann and DuBow., 1987) ดังนั้นในปัจจุบันจึงแบ่งฟาจออกเป็น 21 morphotypes โดยลักษณะสัณฐานแบ่งเป็น 1 ออร์เดอร์ (Order), 13 แฟมิลี (Family), และ 30 จีนัส (Genus) (Ackermann, 2001; Ackermann, 2003)

ในปี พ.ศ. 2502 ได้ค้นพบเชื้อแบคทีริโอฟาจมากกว่า 5,100 ชนิด โดยใช้การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งมีลักษณะเป็นหางร้อยละ 96 และเป็นรูปลูกบาศก์เส้น (filamentous) หรือ pleomorphic อยู่ร้อยละ 13.6 โดยฟาจที่มีลักษณะเป็นหาง (tailed phages) ถูกจัดเป็นกลุ่ม Siphoviridae (60.8%), Myoviridae (25.1%) และ Podoviridae (14.1%) มีเพียงร้อยละ 15 ของกลุ่มมีหางที่มีหัวลักษณะยาว (elongated heads) (Ackermann, 2001; Ackermann, 2003) ฟาจส่วนใหญ่จะมี dsDNA และยังมีกลุ่มเล็ก ๆ ที่มีลักษณะเป็น ssDNA, ssRNA หรือ dsRNA

Champagne and Gardner (1995) รายงานวิธีการ spot test ทำให้แบคทีริโอฟาจเพิ่มจำนวนโดยเลี้ยงเชื้อ *Lb. bulgaricus* และ *S. thermophilus* ด้วยกัน มีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ M17 และ acidified MRS สำหรับคัดแยกเชื้อ *S. thermophilus* และ *Lb. bulgaricus* และมีการเปรียบเทียบวิธีการตรวจนับจำนวนฟาจโดยวิธี spot test กับวิธีมาตรฐาน double layer plaque (DLP) พบว่าวิธี spot test ประหยัดเวลาในการตรวจสอบและง่ายสำหรับการใช้เพื่อนับจำนวนฟาจของเชื้อทั้งสองชนิด ได้แก่ *S. thermophilus* และ *Lb. bulgaricus* พร้อมๆ กันได้ในโรงงาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Ki-Yong et al. (2001) รายงานการระบุเชื้อไบฟิโดแบคทีเรีย (bifidobacteria) แบบง่ายและรวดเร็ว สามารถทำได้โดยการใช้เทคนิค thin layer chromatographic (TLC) เพื่อวิเคราะห์กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acids) ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (culture broth) พบว่าเมื่อฉีดด้วยสารละลายอินดิเคเตอร์ (methyl red-bromophenol blue in 70% ethanol) กรดแลกติกมีจุดสีแดง สำหรับกรดอะซิติค กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก มีจุดสีฟ้า กรดซัคซินิกและกรดซิตริกให้จุดสีเหลืองและเหลืองเข้ม ตามลำดับ วิธีนี้เหมาะสำหรับการตรวจสอบชนิดของกรดอินทรีย์ในอาหารเหลวของจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้ ไบฟิโดแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ (*Bifidobacterium longum, B. breve, B. infantis, B. bifidum,* และ *B. adolescentis*) และแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกชนิดอื่นๆ อีก 5 สายพันธุ์ (*L. casei, Lb. bulgaricus, Lb. acidophilus, S. thermophilus,* และ *S. lactis*) การใช้เทคนิค TLC สามารถตรวจสอบได้ทั้งกรดแลกติก และกรดอะซิติคที่ผลิตจากเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ สำหรับเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกชนิดอื่นๆ ตรวจสอบพบเฉพาะกรดแลกติกเท่านั้น ดังนั้นเทคนิค TLC จึงเหมาะสำหรับการตรวจสอบและระบุเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียในระดับจีนัสได้อย่างรวดเร็ว

Viscardi et al. (2002) รายงานการคัดเลือกเชื้อ *S. thermophilus* ที่กลายพันธุ์และมีความต้านทานต่อแบคทีริโอฟาจ โดยใช้แอนติบอดีชนิด anti-phage antibodies หรือ Hoechst 33258-lacbelled phage พบว่าเชื้อที่กลายพันธุ์ 2 ชนิดจากทั้งหมด 8 ชนิดมีคุณสมบัติการสร้างกรดลดลง

Madera et al. (2003) รายงานการจำแนกลักษณะของ *L. lactis* ที่ทนต่อการเข้าทำลายของฟาจ พบว่า *L.lactis* ที่แยกจากเนยแข็งที่ผลิตจากฟาร์มจำนวน 33 ชนิด จาก 100 ชนิดมีสมบัติทนต่อการเข้าทำลายของฟาจกลุ่ม c2 และ 936 และ *L. lactis* ที่แยกได้ 6 ชนิด ไม่มีสมบัติการเป็นกล้าเชื้อเนื่องจากเป็น lysogenic และเชื้ออื่นอีก 5 ชนิดสร้าง tyramine ส่วนเชื้ออีก 16 ชนิด สามารถสร้างกรดแลกติกได้ดี ย่อยโปรตีนได้ปานกลาง และสร้างไดอะซิติลจากซิเตรตได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.6 การเก็บรักษาเชื้อแลกติกแอสิดแบคทีเรีย (อ้างโดย ไพรินทร์, 2544)

การเก็บเชื้อแลกติกแอสิดแบคทีเรียไว้เป็น stock culture มักประสบปัญหาเชื้อตายง่ายหรือลดประสิทธิภาพของเชื้อบางอย่าง (ลด activity) เนื่องจากกรดที่เชื้อผลิตขึ้น

สามารถทำลายหรือฆ่าตัวมันเองได้ อีกทั้งการเก็บโดยวิธีมาตรฐานหรือการเก็บแบบแห้งภายใต้สุญญากาศ (freeze drying) หรือเก็บแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ในถังไนโตรเจนเหลว ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ยอมรับกันแพร่หลาย แต่ก็มีข้อจำกัดคือ อุปกรณ์มีราคาแพงต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเนื่องจากมีขั้นตอนยุ่งยากจึงทำให้เกิดอุปสรรคในด้านการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

การเก็บแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกก็ประสบปัญหาและอุปสรรคนี้เช่นกัน ดังนั้นจึงมีผู้ศึกษาค้นคว้าการเก็บด้วยเทคนิคง่ายๆ และประหยัด ดังเช่น การเคลือบเซลล์ *Lactobacilli* บนผิวเม็ดแก้วแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -60 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศา-เซลเซียส (Jones et al., 1984) วันเชิญและคณะ (2537) ได้ศึกษาการเปรียบเทียบวิธีการเก็บรักษาแบคทีเรียแลกติกโดยวิธีเก็บบนกระดาษกรอง เก็บในเจลาติน เก็บในเม็ดแก้ว เปรียบเทียบกับการเก็บด้วยวิธีมาตรฐานแบบถาวร (lyophilization) พบว่าจากผลการตรวจนับเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากเก็บไว้ 12 เดือน ทั้ง 3 วิธีจะเหลือเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่ระหว่าง 10^3-10^6 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตรในขณะที่เก็บโดยวิธีมาตรฐานจะเหลือเซลล์รอดชีวิต 10^6 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งการเก็บรักษาแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 วิธี จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่ในจำนวนที่กำหนดไว้เป็นที่ยอมรับของสากลคือไม่ต่ำกว่า 10^3 หน่วยโคโลนี ต่อมิลลิลิตร ศิริพรรณ (2535) ได้เสนอการเก็บเชื้อแบคทีเรียทั่วไปใน 20% glycerol broth ไว้ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส หรือเก็บในช่องทำน้ำแข็งของตู้เย็นธรรมดา สามารถเก็บรักษาเชื้อไว้ใช้ได้ทั้งในระยะสั้นหรือระยะยาวหลายๆ ปีได้ สอดคล้องกับการเก็บเชื้อแบคทีเรียแลกติกของชลัท (2542) ที่เก็บเชื้อไว้อาหารเหลว M17 หรือ MRS ที่เติม glycerol 15% และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.6.1 วิธีการเก็บเชื้อแบคทีเรียแลกติก (วันเชิญ และคณะ, 2537) (อ้างโดย ไพรินทร์, 2544)

1. การเก็บบนกระดาษกรอง นำกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 มาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1 เซนติเมตร x 1 เซนติเมตร ห่อด้วยกระดาษฟอล์ยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที นำแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงไว้จนเจริญเต็มที่ ผสมกับ 10% skim milk ที่ฆ่าเชื้อแล้วเรียงแผ่นกระดาษกรอง ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปใส่ในโถดูดความชื้นดูดอากาศออกโดยให้โถอยู่ในสภาพสุญญากาศนาน 3-4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาทิตย์ จนกระดาษซับเชื้อแห้งสนิท เก็บเชื้อไว้ในหลอดฝาเกลียวที่ฆ่าเชื้อแล้วปิดฝาให้สนิทเพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป

2. การเก็บในเจลาติน นำแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงไว้จนเจริญเต็มที่มาผสมกับ nutrient gelatin 3 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่ฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบนจานพลาสติก (plastic petridish) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปใส่ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส ถึง -40 องศาเซลเซียส เพื่อให้เจลาตินแข็งตัว แล้วนำมาใส่ freeze dryer เพื่อดูดน้ำออกจากเจลาตินจนกระทั่งแห้งสนิท จะได้เม็ดเจลาตินที่มีเชื้ออยู่ และเก็บไว้ในหลอดแก้วฆ่าเชื้อปิดฝาให้สนิทเพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป

3. การเก็บในเม็ดแก้ว ใช้ MRS broth+15% (v/v) glycerol 1 มิลลิลิตร ผสมกับเชื้อที่ต้องการเก็บ นำเม็ดแก้วปลอดเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ไปในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ให้เซลล์แบคทีเรียเคลือบผิวเม็ดแก้ว ดูดสารละลายที่เหลือออกนำหลอดเม็ดแก้วเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส

4. การเก็บเชื้อใน 20% glycerol tryptose broth (ศิริพรรณ และวนิดา, 2535) เตรียม broth สำหรับเก็บเชื้อดังนี้ : Tryptose broth 2% 80 มิลลิลิตร, Glycerol A.R. 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วบรรจุในหลอด ๆ ละ 2 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ 15 นาที เขี่ยโคโลนีเชื้อประมาณ 1 ห่วงถ่ายเชื้อ คนให้เชื้อกระจายตัวไม่จับกันเป็นก้อนใน glycerol broth ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-10 นาที นำเข้าตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส หรือช่องทำน้ำแข็งของตู้เย็นธรรมดา เวลาต้องการนำเชื้อกลับมาใช้ให้เตรียมอาหารในลักษณะอาหารเหลวที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ นำหลอดเก็บเชื้อออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนละลายจึงถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาตามความเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ แล้วนำไปถ่ายเชื้อลงบนจานอาหารแข็ง ซึ่งวิธีการเก็บเชื้อแบบนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการเก็บแบคทีเรียทั่วไปได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved