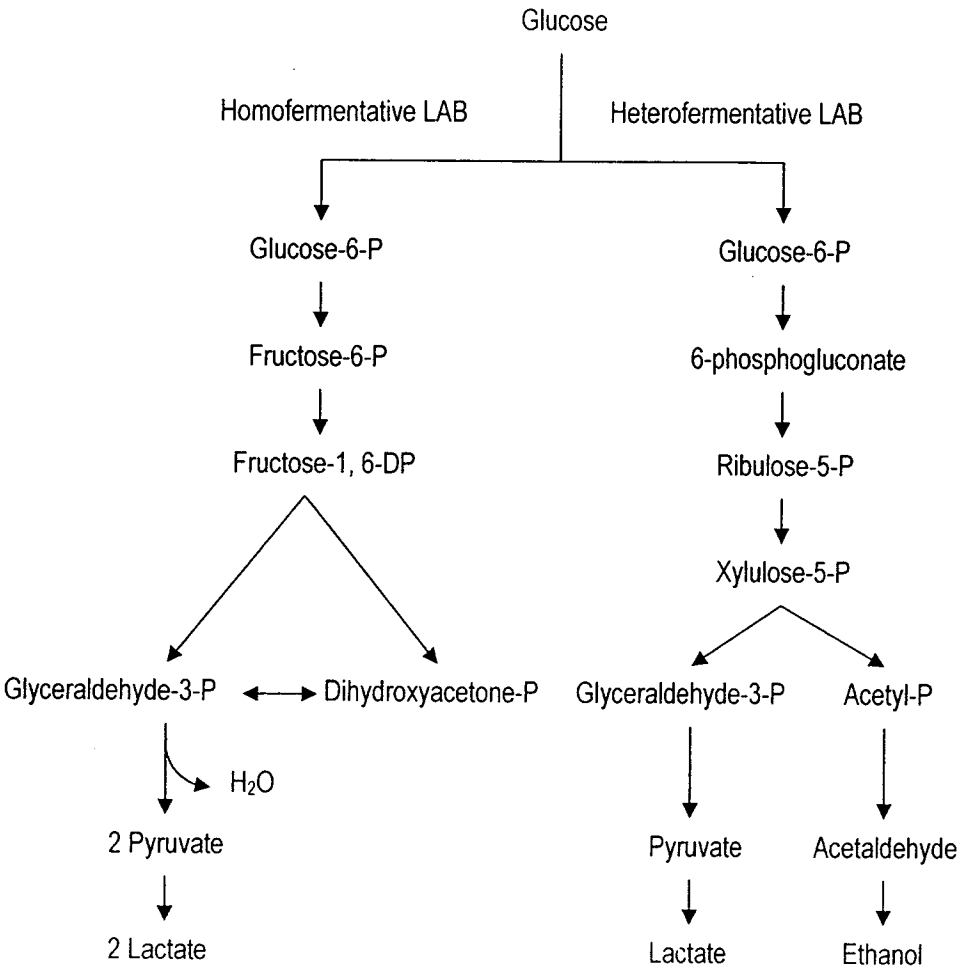
การตรวจเอกสาร
(Literature Review)

1. แลคติกแอสิดแบคทีเรียและอาหารหมัก

แลคติกแอสิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria; LAB) เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน family *Lactobacillaceae* ติดสีแกรมบวก (gram-positive) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) เจริญได้ดีในที่ที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (microaerophile) สามารถหมัก (ferment) น้ำตาลแล้วให้ผลผลิตหลักคือกรดแลคติก มีรูปร่างทั้งแบบกลม (*Aerococcus, Alloiococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus*) และแบบแท่ง (*Lactobacillus, Carnobacterium, Bifidobacterium*) (De Vuyst and Vandamme, 1993)

แลคติกแอสิดแบคทีเรียสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยผลผลิตสุดท้ายที่เกิดขึ้นหลังกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส (รูปที่ 1) คือ (1) homofermentative lactic acid bacteria หมายถึงแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกเป็นผลผลิตหลัก (ประมาณ 85-90%) และ (2) heterofermentative lactic acid bacteria หมายถึงแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่นอกจากผลิตกรดแลคติก (ประมาณ 50%) แล้วยังผลิตสารอื่น ๆ ด้วย เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide) และเอธานอล (ethanol) เป็นต้น (De Vuyst and Vandamme, 1993; Axelsson, 1998)

ในอดีตการผลิตอาหารหมัก (fermented food) มักเกิดจากการสังเกตและความบังเอิญ โดยอาศัยแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่มีอยู่ตามธรรมชาติในอาหารเป็นตัวการทำให้เกิดกระบวนการหมัก และมักเป็นเพียงอุตสาหกรรมในครัวเรือน กระบวนการหมักอาหารแบบนี้จึงเรียกว่า spontaneous fermentation หรือ natural fermentation ซึ่งเป็นกระบวนการหมักอาหารที่ผู้ผลิตไม่สามารถควบคุมคุณภาพของอาหารหมักได้ ต่อมาความรู้และเทคโนโลยีทางด้านการหมักได้มีการพัฒนา ทำให้อาหารหมักและอาหารแปรรูปกลายเป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่และมีหลากหลายชนิด จนบางครั้งผู้บริโภคแทบจะไม่รู้ตัวว่าอาหารที่บริโภคอยู่นั้นเป็นผลิตผลที่ได้จากกระบวนการหมัก อุตสาหกรรมการผลิตอาหารหมักในปัจจุบันมีการใช้แลคติกแอสิดแบคทีเรียเป็นเชื้อเริ่มต้นหรือหัวเชื้อ (starter culture) ในการหมักอาหารหลายชนิด (ตารางที่ 1) และเรียกการหมักแบบนี้ว่า starter fermentation สารต่าง ๆ ที่สร้างโดยแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) และไดอะซิติล (diacetyl) เป็นต้น ล้วนมีส่วนช่วยในการปรุงแต่งกลิ่น สี เนื้อสัมผัส และรสชาติของอาหารให้ดียิ่งขึ้น อีกทั้งยังช่วยยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (food-spoilage microorganisms) และจุลินทรีย์ก่อโรค (food pathogen) หลายชนิด (Caplice and Fitzgerald, 1999)



รูปที่ 1 การหมักน้ำตาลกลูโคสของแลคติกแอสิดแบคทีเรียชนิด homofermentative lactic acid bacteria และ heterofermentative lactic acid bacteria (Caplice and Fitzgerald, 1999)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างอาหารหมักและหัวเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

อาหารหมัก	หัวเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรีย
ผักดอง	
- Sauerkraut	*Leuc. mesenteroides, Lb. plantarum, P. acidilactici*
- Pickles	*Leuc. mesenteroides, P. cerevisiae, Lb. brevis, Lb. plantarum*
- Fermented olives	*Leuc. mesenteroides, Lb. pentosus, Lb. plantarum*
- Fermented vegetables	*P. acidilactici, P. pentosaceus, Lb. plantarum, Lb. fermentum*
เนื้อสัตว์หมัก	
- Fermented sausage (Europe)	*Lb. sake, Lb. curvatus*
- Fermented sausage (USA)	*P. acidilactici, P. pentosaceus*
ปลาหมัก	*Lb. alimentarius, C. piscicola*
เครื่องดื่มหมัก	
- Wine (malolactic fermentation)	*O. oeni*
- Rice wine	*Lb. sake*
นมและผลิตภัณฑ์จากนม	
- Hard cheeses without eyes	*L. lactis* subsp. *lactis, L. lactis* subsp. *cremoris*
- Cheeses with small eyes	*L. lactis* subsp. *lactis, L. lactis* subsp. *lactis var. diacetylactis, L. lactis* subsp. *cremoris, Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris*
- Swiss-and Italian-type cheeses	*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis, Lb. helveticus, Lb. casei, Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, S. thermophilus*
- Butter and buttermilk	*L. lactis* subsp. *lactis, L. lactis* subsp. *lactis var. diacetylactis, L. lactis* subsp. *cremoris, Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris*
- Yoghurt	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, S. thermophilus*
- Fermented, probiotic milk	*Lb. casei, Lb. acidophilus, Lb. rhamnosus, Lb. johnsonii, B. lactis, B. bifidum, B. brevis*
- Kefir	*Lb. kefir, Lb. kefiranofacies, Lb. brevis*

B.=Bifidobacterium, C.=Carnobacterium, L.=Lactococcus, Lb.=Lactobacillus, Leuc.=Leuconostoc, O.=Oenococcus, P.=Pediococcus, S.=Streptococcus, T.=Tetragenococcus, W.=Weissella

ตารางที่ 1 ตัวอย่างอาหารหมักและหัวเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรีย (ต่อ)

อาหารหมัก	หัวเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรีย
แป้งหมัก	
- Sourdough	*Lb. sanfransiscensis, Lb. farciminis, Lb. fermentum, Lb. brevis, Lb. plantarum, Lb. amylovorus, Lb. reuteri, Lb. pontis*
ปลาหมัก	*Lb. alimentarius, C. piscicola*
ซอสถั่วเหลือง	*T. halophilus*

B.=Bifidobacterium, C.=Carnobacterium, L.=Lactococcus, Lb.=Lactobacillus, Leuc.=Leuconostoc, O.=Oenococcus, P.=Pediococcus, S.=Streptococcus, T.=Tetragenococcus, W.=Weissella

(Leroy and De Vuyst, 2004)

2. แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เป็นโปรตีนที่ผลิตโดยแบคทีเรียบางชนิด และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น โดยปกติแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินมักจะมีภูมิคุ้มกันต่อแบคเทอริโอซินที่ตนเองสร้าง จึงทำให้ไม่ถูกยับยั้งการเจริญโดยแบคเทอริโอซินชนิดนั้น การสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียเชื่อว่าเป็นผลจากการปรับตัวของแบคทีเรียเพื่อความอยู่รอดในสิ่งแวดล้อมจำกัดและมีแบคทีเรียอยู่รวมกันหลายชนิด แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินจะสามารถแย่งอาหาร แย่งพื้นที่ในการเจริญ และมีชีวิตอยู่รอดในขณะที่ปล่อยแบคเทอริโอซินออกมาเพื่อทำลายแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ซึ่งอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน (Jack el al., 1995)

แบคเทอริโอซินถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อประมาณปี ค.ศ.1925 แบคเทอริโอซินชนิดแรกที่พบมีชื่อว่า โคลิซิน (colicin) ผลิตโดย *Escherichia coli* ต่อมาพบว่าสารที่มีคุณสมบัติคล้ายโคลิซิน (colicin-like substance) สามารถผลิตจากแบคทีเรียอื่นที่อยู่ในกลุ่ม Enterobacteriaceae ได้ด้วย หลังจากนั้นก็มีรายงานเกี่ยวกับการค้นพบแบคเทอริโอซินออกมามากขึ้น แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินที่เคยมีรายงานไว้มีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

โดยอาศัยคุณสมบัติของโคลิซินเป็นต้นแบบ (prototype) ของแบคเทอริโอซิน ต่อมาจึงได้มีการค้นพบแบคเทอริโอซินใหม่ ๆ อีกหลายชนิด โดยคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่ถูกค้นพบภายหลังนั้นจะถูกนำไปเปรียบเทียบกับโคลิซิน หากพบว่ามีความแตกต่างกัน ก็จะถือว่าเป็นแบคเทอริโอซินต่างชนิดกัน อย่างไรก็ตามในระยะแรก ๆ ของการค้นพบแบคเทอริโอซิน เกณฑ์ที่ใช้ในการกำหนดว่าสารใดจัดเป็นแบคเทอริโอซินยังไม่ค่อยชัดเจนนัก เนื่องจากแบคเทอริโอซินผลิตจากแบคทีเรียได้หลากหลายกลุ่ม จึงมีคุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพที่แตกต่างกันไป แต่จากการศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินในระยะต่อมา ทำให้สามารถสรุปคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินได้ 3 ประการ คือ (1) เป็นสารจำพวกโปรตีน (proteinaceous compounds) หรือมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบหลัก เช่น ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ไลโปโปรตีน (lipoprotein) เป็นต้น และโปรตีนนั้นจะต้องถูกควบคุมการแสดงออกโดยยีนที่อยู่ภายในเซลล์ ยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอ

ริโอซินอาจอยู่ในพลาสมิด (plasmid) หรืออยู่ในโครโมโซม (chromosome) ก็ได้ (2) ทนความร้อน (heat stable) ทั้งนี้เนื่องจากแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กจึงสามารถทนอุณภูมิสูงได้ แบคเทอริโอซินบางชนิดสามารถทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 100 องศาเซลเซียส และ (3) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่สร้างแบคเทอริโอซิน (closely related bacteria) เท่านั้น ดังนั้นแบคเทอริโอซินจึงมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นได้อย่างจำเพาะ (specific) หรือมีขอบเขตของการยับยั้งค่อนข้างแคบ (narrow spectrum of inhibitory) อย่างไรก็ตามคุณสมบัติข้อนี้อาจไม่เป็นจริงเสมอไปสำหรับแบคเทอริโอซินบางชนิด เนื่องจากมีแบคเทอริโอซินบางชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่าง genus ได้ (Montville and Kaiser, 1993)

การตั้งชื่อแบคเทอริโอซินแม้ว่าจะยังไม่ค่อยมีกฎเกณฑ์แน่นอนนัก แต่ที่นิยมกันโดยทั่วไป คือ เติมคำว่า "ซิน" (cin) ต่อท้ายชื่อ genus หรือ species ของแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซินนั้น เช่น โมโนซิน (monocin) เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Listeria monocytogenes* ซับทิลิน (subtilin) เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* สแตปฟิโลซิน (staphylocin) เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Staphylococcus aureus* เป็นต้น (Montville and Kaiser, 1993) นอกจากนี้แบคเทอริโอซินบางชนิดอาจผลิตมาจากแบคทีเรียใน genus และ species เดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ และมีคุณสมบัติต่างไปจากแบคเทอริโอซินเดิมที่เคยรายงานไว้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเติมตัวอักษรต่อท้ายชื่อของแบคเทอริโอซิน เพื่อบ่งบอกถึงความแตกต่าง เช่น แพลนทาริซิน A (Plantaricin A) สร้างจาก *Lactobacillus plantarum* strain C-11 (Daeshchel et al., 1990) และแพลนทาริซิน B (Plantaricin B) สร้างจาก *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193 (West and Warner, 1988) เป็นต้น

กลไกการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์อื่นโดยแบคเทอริโอซินอาจเป็นไปได้หลายแบบ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคเทอริโอซิน กลไกหนึ่งที่มักกล่าวถึงเกี่ยวกับการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยแบคเทอริโอซิน คือเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย (target cell) ที่จะถูกทำลายโดยแบคเทอริโอซินจะต้องมีที่รับ (receptor) สำหรับแบคเทอริโอซินนั้นอยู่บนผิวเซลล์ เมื่อแบคเทอริโอซินจับกับที่รับที่อยู่บนผิวเซลล์แล้ว จะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ และในที่สุดก็จะทำให้เกิดรู (pore) ปรากฏบนผิวเซลล์ ส่งผลทำให้เกิดการเสียสมดุลของของเหลวและอิออน (ions) ต่าง ๆ ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ และในที่สุดก็จะทำให้เซลล์เหี่ยวหรือแตกสลายและตายไป (Tahara and Kanatani, 1996) อย่างไรก็ตามแบคเทอริโอซินบางชนิดก็สามารถทำให้แบคทีเรียตายโดยที่เซลล์ยังคงรูปร่างเดิมไว้ได้ (intact cell) (Itoh et al., 1995)

แลคติกแอสิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซิน โดยเฉพาะแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่มีอยู่ในอาหาร พบว่าสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้หลากหลายชนิด (ตารางที่ 2) การที่นักวิจัยสนใจศึกษาเกี่ยวกับแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้นั้นน่าจะเป็นเพราะแลคติกแอสิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่พบอยู่ในอาหาร ดังนั้นหากนำกลับไปใช้เป็นหัวเชื้อของการหมักก็น่าจะ

ง่ายต่อการนำไปประยุกต์ใช้และปลอดภัยต่อผู้บริโภค ปัจจุบันงานวิจัยเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินมักมุ่งเน้นทางด้านการแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคเทอริโอซิน การทดสอบความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย กลไกการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยแบคเทอริโอซิน ตลอดจนวิธีการกระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างแบคเทอริโอซินในปริมาณมาก เป็นต้น

ตารางที่ 2 ตัวอย่างแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

แลคติกแอสิดแบคทีเรีย	**แบคเทอริโอซิน**
Lactococcus lactis subsp. *lactis*	
ATCC 11454	nisin A
NIZO 22186	nisin Z
CNR 48	lacticin 481
Lactococcus lactis subsp. *lactis* var. *diacetylactis*	
S50	bacteriocin S50
DPC 938	lactocin D
Lactococcus lactis subsp. *cremoris*	
364	diplococcin
202	lactostrepcin 5
LMG 2130	lactococcin A
Lactobacillus acidophilus	
2181	acidocin
N2	lactacin B
Lactobacillus bavaricus	
MI401	bavaricin A
Lactobacillus brevis	
B37	brevis 37
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*	
DDS 14	bulgarican
Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis*	
JCM 1106, JCM 1107	lacticin A
Lactobacillus helveticus	
LP27	lactocin 27
481	helveticin J
Lactobacillus plantarum	
NCDO 1193	plantaricin B
C-11	plantaricin A
LPCO-10	plantaricin S

ตารางที่ 2 ตัวอย่างแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแลคติกแอสิดแบคทีเรีย (ต่อ)

แลคติกแอสิดแบคทีเรีย	แบคเทอริโอซิน
Lactobacillus sake	
LB 706	sakacin A
Carnobacterium piscicola	
LV61	piscicolin 61
Pediococcus acidilactici	
H, E, F, M	pediocin AcH
PAC 1.0	pediocin PA-1
Pediococcus pentosaceus	
FBB-61, L-7230	pediocin A
Leuconostoc carnosum	
Lm1	leuconocin Lcm1
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides*	
UL5	mesenterocin 5
Streptococcus thermophilus	
STB40	bacteriocin STB40
SFi13	thermophilin 13
Enterococcus faecalis	
S-48	bacteriocin Bc-48
226	enterocin 226NWC

(De Vuyst and Vandamme, 1993)

แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม (class) ตามโครงสร้างและคุณสมบัติทางชีวเคมี (Klaenhammer, 1993) ดังนี้ (1) Class I (lantibiotics) หมายถึงแบคเทอริโอซินที่มีกรดอะมิโนในกลุ่มแลนไธโอนีน (lanthionine) เป็นส่วนประกอบ ได้แก่ กรดอะมิโนไดดีไฮโดร (didehydro amino acid) หรือกรดอะมิโนไธโออีเธอร์ (thioether amino acid) เป็นต้น (2) Class II หมายถึงแบคเทอริโอซินที่มีขนาดค่อนข้างเล็ก (มวลโมเลกุลน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน) และทนความร้อน แบคเทอริโอซิน Class II สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ Class IIa, Class IIb และ Class IIc โดยอาศัยความแตกต่างของกรดอะมิโนที่ปลาย N-terminal ลักษณะของรูที่เกิดบนผิวเซลล์เป้าหมาย และการมีหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (sulfhydryl group) ในโครงสร้าง (4) Class IV หมายถึงแบคเทอริโอซินที่มีสารชีวโมเลกุลอื่นเป็นองค์ประกอบร่วมด้วย นอกเหนือจากโปรตีน เช่น ไขมัน หรือคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น

แม้ว่าจะมีรายงานการค้นพบแบคเทอริโอซินเป็นจำนวนมาก แต่แบคเทอริโอซินที่ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเป็นที่ยอมรับของทั้ง Food and Drug Administration (FDA) และ World Health Organization (WHO) ในปัจจุบันคือไนซิน (nisin) ซึ่งผลิตจาก *Lactococcus*

lactis นับตั้งแต่ปี ค.ศ.1969 เป็นต้นมาจนถึงปัจจุบันมีมากกว่า 50 ประเทศทั่วโลกที่ใช้ไนซินเป็นสารถนอมอาหาร (food preservative) ไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา อาหารที่นิยมเติมไนซินเป็นสารถนอมอาหาร ได้แก่ cheeses (เช่น hard cheeses และ cottage cheeses เป็นต้น) นมโยเกิร์ต ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ และอาหารประเภทปลาและผักบรรจุกระป๋อง เป็นต้น (Daeschel, 1989)

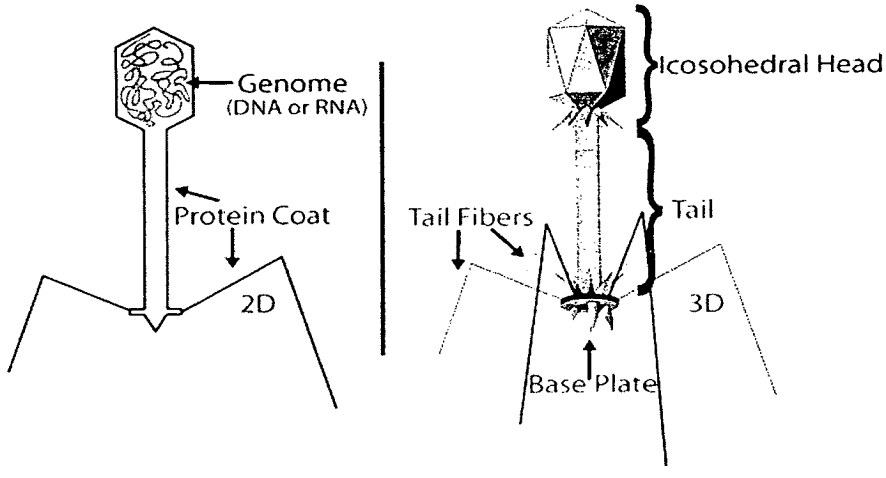
ไนซินเป็นแบคเทอริโอซินที่จัดอยู่ในกลุ่ม lantibiotics หรือแบคเทอริโอซิน class I ประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 ตัว มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 3,500 ดาลตัน สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด เช่น *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris, Micrococcus, Staphylococcus aureus, Mycobacterium, Corynebacterium, Listeria monocytogenes, Clostridium, Bacillus* และ *Lactobacillus* เป็นต้น และยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ด้วยหากใช้ร่วมกับสารที่ผลต่อ outer membrane ของแบคทีเรีย (Stevens et al., 1992) ไนซินสามารถทนความร้อน 100 องศาเซลเซียสได้นานอย่างน้อย 10 นาที ถูกทำลายฤทธิ์โดยไคโมทริปซิน (chymotrypsin) แต่ไม่ถูกทำลายฤทธิ์โดยโปรเนส (pronase) และทริปซิน (trypsin) อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างไนซินคือ milk and buffered complex media ไนซินจะถูกสร้างออกมาในช่วง exponential phase ของการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย กระบวนการสร้างไนซินเมื่อผ่านขั้นตอน translation แล้วไนซินจะอยู่ในรูปโปรไนซิน (pronisin) ก่อน และก่อนส่งออกไปนอกเซลล์โปรไนซินจะถูกเอนไซม์ตัดเอาบางส่วนออกไปทำให้กลายเป็นไนซิน ไนซินมีฤทธิ์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย ยีนที่ควบคุมการสร้างอาจอยู่ในพลาสมิดหรือโครโมโซมก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้าง (Buchman et al., 1988) ไนซินมี 3 ชนิด (nisin variants) คือ ไนซิน เอ (nisin A), ไนซิน แซด (nisin Z) และ ไนซิน คิว (nisin Q) ซึ่งแต่ละชนิดมีลำดับของกรดอะมิโนแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

การที่แลคติกแอสิดแบคทีเรียสามารถผลิตแบคเทอริโอซินไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียตามที่กล่าวมานั้น เป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ หรือแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซินได้รับความสนใจโดยเฉพาะแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซินนั้น สามารถนำมาพัฒนาเป็นหัวเชื้อในการหมักแบบ starter fermentation ได้เป็นอย่างดี เพราะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักและความปลอดภัยของอาหารไปในคราวเดียว การเติมแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ลงในอาหาร แม้ว่าจะให้ผลในการถนอมอาหารได้ดี แต่ก็ยังมีปัจจัยอีกหลายประการที่ต้องคำนึงถึง เนื่องจากองค์ประกอบในอาหารแต่ละชนิดแตกต่างกัน และอาหารบางชนิดมี ไขมัน เอนไซม์ อุณหภูมิ และ pH ที่อาจมีผลทำให้ประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินด้อยลงหรือไม่ดีเท่าที่ควร เช่น เคยมีรายงานเกี่ยวกับการนำไนซินบริสุทธิ์ไปใช้ในอาหารแต่ได้ผลไม่ดีนัก เนื่องจากไนซินสามารถจับกับไขมันได้ค่อนข้างดี และเมื่อไนซินจับกับไขมันแล้วจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียลดน้อยลง เป็นต้น ดังนั้นการเติมหัวเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซิน

จึงน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการหมัก เพราะแบคทีเรียสามารถผลิตแบคเทอริโอซิน ออกมาได้ตลอดเวลาที่เกิดกระบวนการหมัก จึงน่าจะยังคงรักษาระดับหรือปริมาณแบคเทอริโอซินไว้ในอาหารหมักได้

3. แบคเทอริโอเฟจ

แบคเทอริโอเฟจ (bacteriophage) เป็นไวรัสของแบคทีเรีย มีโครงสร้างหรือส่วนประกอบสำคัญคือ สารพันธุกรรมหรือกรดนิวคลิอิก (nucleic acid) และโปรตีนห่อหุ้มสารพันธุกรรมเรียกว่า แคปซิด (capsid) ซึ่งอาจมีรูปร่างเป็นรูปหลายเหลี่ยม เช่น icosahedral เป็นต้น สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจอาจเป็น DNA หรือ RNA อย่างใดอย่างหนึ่ง และอาจมีรูปร่างเป็นเส้น (linear) เป็นวง (circular) หรือแบ่งเป็นหลายอัน (segmented) ก็ได้ สารพันธุกรรมที่ถูกหุ้มด้วยแคปซิดนี้บางทีอาจเรียกว่า ส่วนหัว (head) แบคเทอริโอเฟจบางชนิดอาจมีส่วนประกอบเพิ่มเติมคือ มีส่วนซึ่งมีลักษณะเป็นท่อยาวต่อจากส่วนหัว เรียกว่า ส่วนหาง (tail) และบริเวณส่วนหางนี้อาจพบโครงสร้างอื่น ๆ ได้ด้วย เช่น base plate, tail fiber เป็นต้น (รูปที่ 2) การมีหรือไม่มีส่วนหาง และการยืด-หดได้ของส่วนหางสามารถใช้ในการจำแนกชนิดของแบคเทอริโอเฟจได้ด้วย (Ackermann, 2003)



รูปที่ 2 ตัวอย่างรูปร่างและส่วนประกอบสำคัญของแบคเทอริโอเฟจ
(ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Tevenphage.svg)

แบคเทอริโอเฟจถูกค้นพบครั้งแรกโดยนักวิทยาศาสตร์สองท่านในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกัน คือ ในปี ค.ศ.1915 Dr. Frederick William Twort นักพยาธิวิทยาชาวอังกฤษได้ทำการวิจัยพบไวรัสที่สามารถทำให้แบคทีเรีย *Micrococcus* กลายพันธุ์ และในปี ค.ศ.1917 Dr. Felix Hubert d'Herelle นักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศสค้นพบไวรัสที่สามารถทำให้เซลล์แบคทีเรีย *Shigella* เกิด

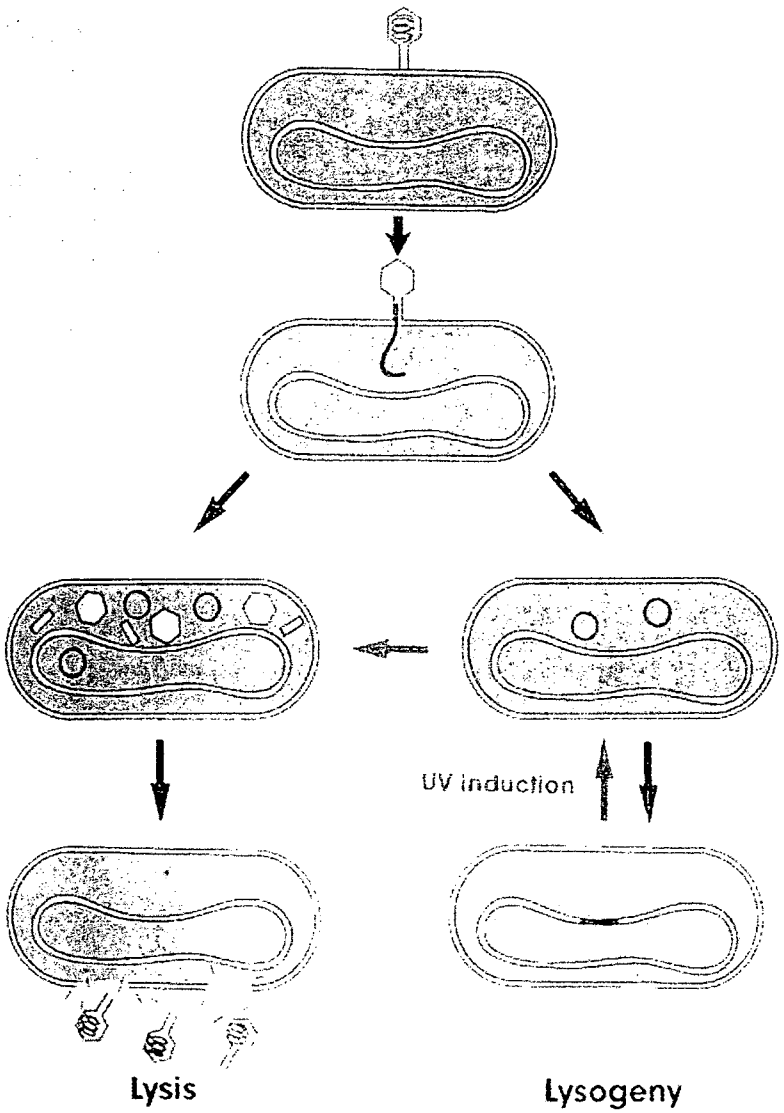
การแตกสลาย (lysis) อีกทั้ง Dr. d'Herelle ยังเป็นบุคคลแรกที่ใช้คำว่า "bacteriophage" ในการเรียกไวรัสที่สามารถบุกรุก (infect) หรือทำลายเซลล์แบคทีเรีย

3.1 การดำรงชีวิตของแบคเทอริโอเฟจ

โดยทั่วไปการบุกรุก (infection) ของแบคเทอริโอเฟจเข้าสู่โฮสต์เซลล์ (host cell) มักจะมีความจำเพาะสูงมาก (highly specific) กล่าวอีกนัยหนึ่งคือแบคเทอริโอเฟจชนิดใดชนิดหนึ่งก็มักจะทำลายแบคทีเรียเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ความจำเพาะระหว่างแบคเทอริโอเฟจกับแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์เซลล์นั้น เกิดขึ้นโดยอาศัยการจับกันระหว่างตำแหน่งที่อยู่บนอนุภาคของแบคเทอริโอเฟจเรียกว่า attachment site กับตำแหน่งที่อยู่บนผิวเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งเรียกว่า receptor site จากนั้นสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจก็จะถูกนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย และเริ่มต้นเข้าสู่กระบวนการเพิ่มจำนวน (replication) ของแบคเทอริโอเฟจต่อไป

การเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจภายในเซลล์แบคทีเรียสามารถแบ่งเป็น 2 ลักษณะคือ แบบ lysis (lytic cycle) และแบบ lysogeny (lysogenic cycle) (รูปที่ 3) การเพิ่มจำนวนแบบ lysis เมื่อสารพันธุกรรมถูกนำเข้ามาภายในเซลล์แล้ว กลไกต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิตของแบคทีเรียโดยปกติจะหยุดชะงักลง เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจจะเข้าไปควบคุมและใช้กลไกต่าง ๆ เหล่านั้นเพื่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจเท่านั้น โดยเริ่มจากสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการจำลองสารพันธุกรรม แล้วจึงสร้างโปรตีนหรือส่วนประกอบของแคปซิดและโครงสร้างอื่น ๆ จากนั้นส่วนประกอบต่าง ๆ ที่ถูกสร้างขึ้นมาเป็นจำนวนมากนี้จึงมารวมกัน (assembly) กลายเป็นแบคเทอริโอเฟจสมบูรณ์จำนวนมากเกิดขึ้นภายในเซลล์ แบคเทอริโอเฟจที่เกิดขึ้นใหม่นี้เรียกว่า progeny bacteriophage โดยระยะเวลาที่ใช้ตั้งแต่แบคเทอริโอเฟจบุกรุกเข้าสู่เซลล์และเกิด progeny bacteriophage อาจใช้เวลาเพียงเล็กน้อย เช่น 1-2 ชั่วโมงเท่านั้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคเทอริโอเฟจ และในที่สุดแบคเทอริโอเฟจก็จะสร้างสารบางอย่างออกมาทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย จนผนังเซลล์เกิดการแตกสลาย (lysis) และปล่อย progeny bacteriophage จำนวนมากเหล่านั้นออกมานอกเซลล์ จากนั้น progeny bacteriophage ซึ่งมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับแบคเทอริโอเฟจเริ่มแรกที่เข้าสู่เซลล์ ก็พร้อมที่จะเข้าสู่แบคทีเรียเซลล์ใหม่ที่อยู่ข้างเคียงต่อไป (Medigan et al., 1997) การบุกรุกหรือทำลายเซลล์แบคทีเรียของแบคเทอริโอเฟจแบบ lysis นี้ ในที่สุดจะทำให้แบคทีเรียหมดไปจากบริเวณที่มีแบคเทอริโอเฟจชนิดนั้นอยู่ ส่วนการเพิ่มจำนวนแบบ lysogeny แบคเทอริโอเฟจที่สามารถเพิ่มจำนวนแบบนี้ได้เรียกว่า temperate phage เมื่อสารพันธุกรรมถูกนำเข้ามาภายในเซลล์แล้ว แบคเทอริโอเฟจจะนำสารพันธุกรรมนั้นเข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของแบคทีเรีย สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจที่แทรกอยู่ในโครโมโซมนี้เรียกว่า prophage และเมื่อแบคทีเรียแบ่งตัวเพิ่มจำนวน สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจก็จะมีการจำลองตัวเองไปพร้อมกัน และยังคงแทรกอยู่ในโครโมโซมเช่นเดิม โดยไม่ทำให้เกิด progeny bacteriophage ดังนั้นการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจแบบ lysogeny จึงไม่ทำให้เกิดการแตกสลายหรือการตายของแบคทีเรีย (Vegge et al., 2005) แต่อาจ

ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมหรือการกลายพันธุ์ (mutation) ของแบคทีเรียได้ ในบางสภาวะ prophage อาจหลุดออกจากโครโมโซมของแบคทีเรียและสามารถกลับเข้าสู่การเพิ่มจำนวนแบบ lysis ได้ เรียกปรากฏการณ์เช่นนี้ว่า induction สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิด induction ได้แก่ การกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลต หรือสารเคมีบางชนิด เป็นต้น



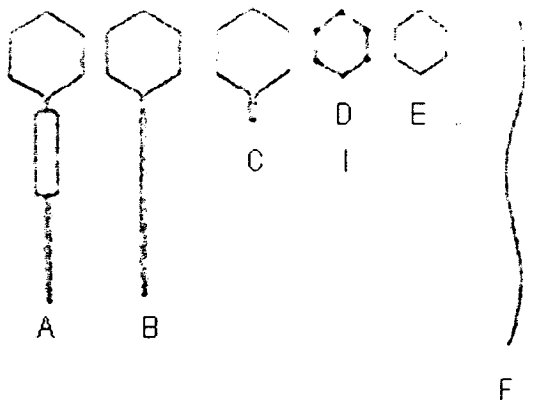
รูปที่ 3 การเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ

(ที่มา : http://www.mun.ac/biochem/course/4103/figures/ptashne/Chapter1/F)

3.2 การจัดจำแนกชนิดของแบคเทอริโอเฟจ

ในอดีตเคยมีการจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีก็มีเกณฑ์ในการจำแนกที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับบุคคลที่เป็นผู้คิดเกณฑ์ในการจำแนกนั้น เช่น ในปี ค.ศ. 1967 Bradley จำแนกแบคเทอริโอเฟจออกเป็น 6 กลุ่ม (group) ตามลักษณะรูปร่างและสารพันธุกรรม

คือ A, B, C, D, E และ F (รูปที่ 4) โดยแบคเทอริโอเฟจกลุ่ม A, B และ C มีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded DNA แบคเทอริโอเฟจกลุ่ม D และ F มีสารพันธุกรรมเป็น single-stranded DNA และแบคเทอริโอเฟจกลุ่ม E มีสารพันธุกรรมเป็น single-stranded RNA เป็นต้น



รูปที่ 4 การจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจตามวิธีของ Bradley
(ที่มา : http://www.dairyscience.info/bacteriophages-for-lactococci.html)

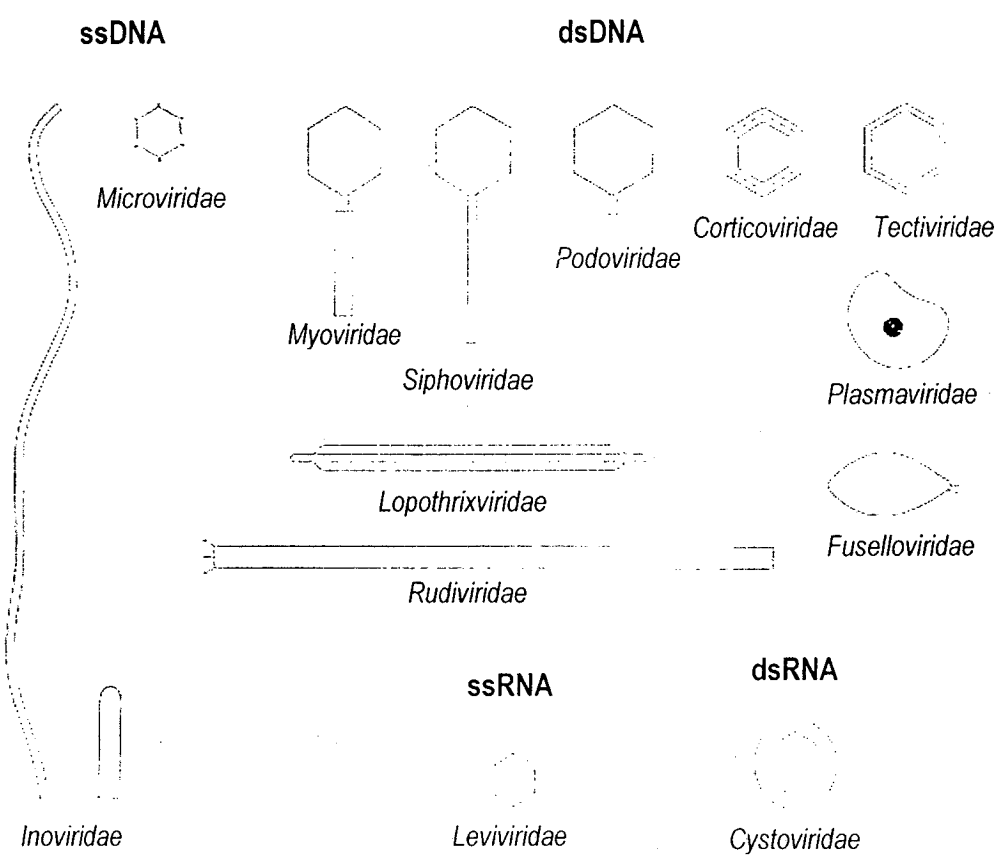
ปัจจุบันการจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจเริ่มเป็นระบบและมีเกณฑ์มาตรฐานมากขึ้นกว่าในอดีต เนื่องจากมีหน่วยงานที่ทำหน้าที่กำหนดเกณฑ์การจัดจำแนกไวรัสซึ่งเป็นที่เป็นยอมรับกันโดยทั่วไปคือ International Committee for Taxonomy of Viruses หรือ ICTV โดยได้จัดจำแนกไวรัสออกเป็น 3 order, 61 family และ 241 genus การตั้งชื่อไวรัสโดยทั่วไปจะใช้ภาษาละตินหรือกรีก ชื่อ order จะลงท้ายด้วย *–virales* ชื่อ family จะลงท้ายด้วย *–viridae* และชื่อ genus จะลงท้ายด้วย *–virus* (Ackermann, 2003) แบคเทอริโอเฟจทุกชนิดถูกจัดอยู่ใน order เดียวกัน คือ *Caudovirales* โดยแบ่งออกเป็น 13 family และ 30 genus (ตารางที่ 3) เมื่อพิจารณารูปร่างของแบคเทอริโอเฟจ พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ดังนี้ (1) Tailed phage คือแบคเทอริโอเฟจที่มีหาง (2) Polyhedral phage คือแบคเทอริโอเฟจที่หัวมีรูปร่างหลายเหลี่ยม (3) Filamentous phage คือแบคเทอริโอเฟจที่มีลักษณะคล้ายเส้นใย จึงไม่มีการแบ่งเป็นส่วนหัวหรือหาง และ (4) Pleomorphic phage คือแบคเทอริโอเฟจที่มีรูปร่างไม่แน่นอน (ตารางที่ 3 และรูปที่ 5) ซึ่งรายละเอียดเกี่ยวกับแบคเทอริโอเฟจแต่ละกลุ่มจะกล่าวถึงต่อไป แบคเทอริโอเฟจส่วนใหญ่มีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded DNA มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่มีสารพันธุกรรมเป็น single-stranded DNA, single-stranded RNA หรือ double-stranded RNA แบคเทอริโอเฟจที่ค้นพบแล้วส่วนใหญ่เป็นพวก tailed phage ซึ่งเท่าที่มีรายงานอยู่ในขณะนี้มีอยู่ประมาณ 4950 ชนิด (Ackermann, 2003) นอกจากนี้ยังมีแบคเทอริโอเฟจบางชนิดที่มีเอ็นเวลลอป (envelope) ซึ่งเป็นสารจำพวกไขมันห่อหุ้มแคปซิดไว้อีกชั้นหนึ่ง แต่แบคเทอริโอเฟจแบบนี้พบน้อยมาก

ตารางที่ 3 การจัดจำแนกชนิดและคุณสมบัติทั่วไปของแบคเทอริโอเฟจ

Shape	Nucleic acid	Families	Genera	Examples	Members	Characteristics
Tailed	DNA, ds, L	*Myoviridae*	6	T4	1243	Tail contractile
	DNA, ds, L	*Siphoviridae*	6	λ	3011	Tail long, noncontractile
	DNA, ds, L	*Podoviridae*	3	T7	696	Tail short
Polyhedral	DNA, ss, C	*Microviridae*	4	ϕX174	40	-
	DNA, ds, C, T	*Corticoviridae*	1	PM2	3	Complex capsid, lipids
	DNA, ds, L	*Tectiviridae*	1	PRD1	18	Internal lipoprotein vesicle
	RNA, ss, L	*Leviviridae*	2	MS2	39	-
	RNA, ds, L, S	*Cystoviridae*	1	ϕ6	1	Envelope, lipids
Filamentous	DNA, ss, C	*Inoviridae*	2	Fd	57	Filaments or rods
	DNA, ds, L	*Lipothrixviridae*	1	TTV1	6	Envelope, lipids
	DNA, ds, L	*Rudiviridae*	1	SIRV1	2	Resembles TMV
Pleomorphic	DNA, ds, C, T	*Plasmaviridae*	1	L2	6	Envelope, lipids, no capsid
	DNA, ds, C, T	*Fuselloviridae*	1	SSV1	8	Spindle-shaped, no capsid

C = circular; L = linear; S = segmented; T = superhelical; ss = single-stranded; ds = double-stranded

(Ackermann, 2003)



รูปที่ 5 การจัดจำแนกแบคเทอริโอเฟจ

(ที่มา : http://www.smj.ejnal.com/e-journal/word/picture/article/smj/302/pic1.JPG)

3.2.1 Tailed phage

tailed phage เป็นแบคเทอริโอเฟจกลุ่มที่พบมากที่สุด โดยมีอยู่ประมาณ 96% ของแบคเทอริโอเฟจทั้งหมด ลักษณะโดยทั่วไปของแบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้คือ ส่วนหัวมีลักษณะสมมาตรแบบลูกบาศก์ (cubic symmetry) เรียกว่า icosahedral head โปรตีนโครงสร้างของส่วนหางมีการเรียงตัวแบบเกลียวเรียกว่า helical tail สารพันธุกรรมมีลักษณะเป็นเส้น ชนิด double-stranded DNA ซึ่งมีเพียงอันเดียว สารพันธุกรรมถูกล้อมรอบด้วยแคปซิด แต่ไม่มีเอ็นเวลลอป ขนาดของสารพันธุกรรมและความยาวของส่วนหางแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคเทอริโอเฟจ สารพันธุกรรมอาจมีขนาดตั้งแต่ 17 จนถึงมากกว่า 700 กิโลเบส (kb) และส่วนหางอาจมีความยาวตั้งแต่ 10 ถึง 800 นาโนเมตร (nm) tailed phage แบ่งออกเป็น 3 family คือ (1) *Myoviridae* ซึ่งเป็นแบคเทอริโอเฟจชนิดที่หางสามารถยืด-หดได้ มี sheath หุ้มรอบหาง และมีแกนกลางอยู่ในส่วนหางเรียกว่า central tube แบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้พบอยู่ประมาณ 25% ของ tailed phage ทั้งหมด และแบ่งย่อยออกเป็น 6 genus คือ T4, P1, P2, Mu, SPO1 และ ϕH (2) *Siphoviridae* เป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีหางยาว แต่ไม่สามารถยืด-หดได้ แบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดของ tailed phage เนื่องจากพบได้ประมาณ 61% ของ tailed phages ทั้งหมด สามารถแบ่งออกเป็น 6 genus คือ λ, T1, T5, L5, c2 และ ψM และ (3) *Podoviridae* เป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีหางสั้น พบได้ประมาณ 14% ของ tailed phage ทั้งหมด แบ่งออกเป็น 3 genus คือ T7, P22 และ ϕ29

3.2.2 Polyhedral phage

polyhedral phage เป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีรูปร่างหลายเหลี่ยม สารพันธุกรรมอาจเป็น single-stranded DNA, double-stranded DNA, single-stranded RNA หรือ double-stranded RNA ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคเทอริโอเฟจ polyhedral phage แบ่งออกเป็น 5 family ดังนี้ (1) *Microviridae* เป็นแบคเทอริโอเฟจขนาดเล็ก ไม่มีเอ็นเวลลอป สารพันธุกรรมมีเพียงอันเดียว มีลักษณะเป็นวง และเป็น single-stranded DNA แบ่งออกเป็น 4 genus สมาชิกสำคัญของแบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้ คือ ϕX174 (2) *Corticoviridae* มีสารพันธุกรรมหนึ่งอันเป็น double-stranded DNA ลักษณะเป็นวง ถูกหุ้มด้วยแคปซิด ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนสองชั้นโดยมี lipid bilayer แทรกอยู่ตรงกลางระหว่างชั้นของโปรตีน แบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้มีเพียง genus เดียว มีสมาชิกที่สำคัญคือ PM2 (3) *Tectiviridae* เป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีโครงสร้างของแคปซิดที่แข็งแรง ซึ่งภายในมี lipoprotein vesicle เมื่อแบคเทอริโอเฟจชนิดนี้เกาะที่ผิวของแบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ lipoprotein vesicle ดังกล่าวจะกลายเป็นท่อที่คล้ายหางของแบคเทอริโอเฟจ (tail-like tube) มีความยาวประมาณ 60 นาโนเมตร ซึ่งเป็นทางให้สารพันธุกรรมเคลื่อนที่ผ่านจากแบคเทอริโอเฟจไปยังโฮสต์เซลล์ แบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้มีเพียง genus เดียว มีสมาชิกที่สำคัญคือ PRD1 (4) *Leviviridae* มีสารพันธุกรรมอันเดียว เป็น single-stranded ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้น สารพันธุกรรมถูกหุ้มด้วยแคปซิดซึ่งมีโครงสร้างต่างจาก RNA viruses ทั่วไป มีรูปร่างคล้ายกับ

poliovirus แบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้แบ่งเป็น 2 genus สมาชิกสำคัญคือ MS2 (5) *Cystoviridae* มีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded RNA และมีอยู่ถึง 3 อันหรือโมเลกุล (เรียกสารพันธุกรรมลักษณะเช่นนี้ว่าเป็นแบบ segmented) จึงเป็นลักษณะเด่นของแบคเทอริโอเฟจในกลุ่มนี้ แคปซิดถูกหุ้มไว้ด้วยเอ็นเวลลอปซึ่งมีส่วนประกอบหลักเป็นไขมัน (lipid-containing envelope) แบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้มีเพียง genus เดียว สมาชิกสำคัญคือ ϕ6

3.2.3 Filamentous phage

filamentous phage เป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีรูปร่างเป็นสายหรือคล้ายเส้นใย สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้มีทั้งแบบ single-stranded DNA และ double-stranded DNA แบ่งออกเป็น 3 family คือ (1) *Inoviridae* มีสารพันธุกรรมเป็น single-stranded DNA แบบวง แบ่งเป็น 2 genus ตามชนิดของโฮสต์เซลล์ที่แบคเทอริโอเฟจสามารถบุกรุก คือ *Inovirus* และ *Plectrovirus* สำหรับ *Inovirus* มีอยู่ 42 ชนิด ลักษณะเด่นคือ มีรูปร่างเป็นสายยาว (long filament) อาจแข็ง (rigid) หรือยืดหยุ่นได้ (flexible) ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคเทอริโอเฟจ เป็นแบคเทอริโอเฟจที่ไว (sensitive) ต่อคลอโรฟอร์ม (chloroform) แต่ทน (resistant) ความร้อนได้ดี โฮสต์เซลล์สำหรับแบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้คือ *Clostridium* และ *Propionibacterium* ส่วน *Plectrovirus* มีอยู่ 15 ชนิด ลักษณะเด่นคือ มีรูปร่างเป็นสายสั้น ๆ (short, straight rod) โฮสต์เซลล์สำหรับแบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้คือ *Mycoplasma* โดยทั่วไปแบคเทอริโอเฟจในกลุ่ม *Inoviridae* เมื่อเพิ่มจำนวนภายในโฮสต์เซลล์แล้ว progeny bacteriophage จะออกจากเซลล์โดยไม่ทำให้เซลล์แตก สมาชิกสำคัญของแบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้คือ fd (2) *Lipothrixviridae* มีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded DNA แบบเส้น รูปร่างของแบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้มักเป็นแบบแท่ง (rod-like shaped) และมีเอ็นเวลลอป มีเพียง genus เดียว สมาชิกสำคัญคือ TTV1 (3) *Rudiviridae* มีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded DNA แบบเส้น มีรูปร่างเป็นแท่งตรงแข็ง (straight, rigid rod) ไม่มีเอ็นเวลลอป มองดูคล้ายกับ tobacco mosaic virus แบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้มีเพียง genus เดียว สมาชิกสำคัญคือ SIRV1

3.2.4 Pleomorphic phage

pleomorphic phage เป็นแบคเทอริโอเฟจที่มีรูปร่างไม่แน่นอน แบคเทอริโอเฟจทุกชนิดในกลุ่มนี้มีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded DNA แบบวง แบ่งออกเป็น 2 family คือ (1) *Plasmaviridae* เป็นแบคเทอริโอเฟจที่ไม่มีแคปซิด แต่มีเอ็นเวลลอปหุ้มสารพันธุกรรมไว้แทน แบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ของแบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้คือ *Mycoplasma* เมื่อแบคเทอริโอเฟจจะบุกรุกเข้าสู่โฮสต์เซลล์ เอ็นเวลลอปของแบคเทอริโอเฟจจะเชื่อม (fuse) กับเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของโฮสต์เซลล์ และหลังจากเพิ่มจำนวนภายในเซลล์แล้วจะออกจากเซลล์โดยวิธี budding ซึ่งไม่ทำให้โฮสต์เซลล์แตก แบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้มีเพียง genus เดียว สมาชิกสำคัญคือ L2 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอเฟจกลุ่มที่มีการศึกษาหรือมีข้อมูลน้อยมาก (2) *Fuselloviridae* มีรูปร่าง

คล้ายผลมะนาว (lemon-shaped) และมีหนามสั้น ๆ (short spike) อยู่ที่ปลายด้านหนึ่งของอนุภาค แบคเทอริโอเฟจ แคปซิดประกอบด้วยโปรตีน (hydrophobic protein) สองชนิดและไขมันซึ่งได้มาจากส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของโฮสต์ แคปซิดถูกทำลายได้ด้วยคลอโรฟอร์ม หลังจากเพิ่มจำนวนภายในเซลล์แล้วจะออกจากเซลล์โดยวิธี extrusion แบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้มีเพียง genus เดียว สมาชิกสำคัญคือ SSV1

4. การทำลายหัวเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียโดยแบคเทอริโอเฟจ

ปัญหาหนึ่งที่พบบ่อยเมื่อมีการนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียมาใช้เป็นหัวเชื้อของการหมักคือ การที่แลคติกแอสิดแบคทีเรียถูกทำลายโดยแบคเทอริโอเฟจ (Coffey et al., 1998; Deutsch et al., 2002; Lu et al., 2003) ปัญหาดังกล่าวนำไปสู่การล้มเหลวของกระบวนการหมัก หรือทำให้อาหารหมักที่ได้มีคุณภาพไม่ตรงตามที่ผู้ผลิตต้องการ การทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่เป็นหัวเชื้อของการหมักโดยแบคเทอริโอเฟจถูกค้นพบครั้งแรกโดย Whitehead และ Cox (1935) ซึ่งทำการศึกษากับ *Lactococcus lactis* หลังจากนั้นได้มีการค้นพบแบคเทอริโอเฟจที่ทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียอีกหลายชนิด (ตารางที่ 4) การทำลายหัวเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียโดยแบคเทอริโอเฟจนับเป็นปัญหาสำคัญที่นำมาซึ่งความสูญเสียทางเศรษฐกิจ อุตสาหกรรมการหมักที่พบบ่อยว่าประสบปัญหาเกี่ยวกับการทำลายหัวเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียโดยแบคเทอริโอเฟจคือ อุตสาหกรรมการหมักผลิตภัณฑ์จากนม (dairy industry) เช่น cheddar cheeses เป็นต้น ในระยะแรกของการศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอเฟจในแลคติกแอสิดแบคทีเรียส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นการค้นหาแบคเทอริโอเฟจที่เป็นปัญหา การศึกษาเกี่ยวกับรูปร่างของแบคเทอริโอเฟจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน การศึกษาคุณสมบัติทาง serology และสรีรวิทยาของแบคเทอริโอเฟจ เป็นต้น ต่อมาเมื่อมีการค้นพบแบคเทอริโอเฟจมากขึ้น การศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอเฟจก็เริ่มลงลึกถึงระดับชีวโมเลกุลของแบคเทอริโอเฟจ เช่น รูปแบบของสารพันธุกรรม (genome organization) โปรตีนโครงสร้างหลักของแบคเทอริโอเฟจ (structural protein profiles) และเปรียบเทียบสารพันธุกรรมระหว่างแบคเทอริโอเฟจ (comparative DNA studies) เป็นต้น

จุดเริ่มต้นของการติดเชื้อแบคเทอริโอเฟจของแลคติกแอสิดแบคทีเรียไม่แตกต่างจากการบุกรุกแบคทีเรียชนิดอื่น โดยมีขั้นตอนสำคัญคือ phage adsorption ขั้นตอนนี้มีการศึกษากันมากในแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรียกลุ่ม lactococci (หรือเรียกว่า lactococcal phage) โดยมีรายงานว่า receptor site สำหรับ lactococcal phage อาจอยู่ที่ผนังเซลล์ (cell wall) หรือเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของแบคทีเรียก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียและแบคเทอริโอเฟจ นอกจากนี้ lactococcal phage บางชนิดสามารถบุกรุกแบคทีเรียได้เพียงบางสายพันธุ์เท่านั้น แต่บางชนิดก็สามารถบุกรุกแบคทีเรียได้หลายสายพันธุ์ เช่น แบคเทอริโอเฟจบางชนิดสามารถบุกรุก *L. lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* และ *L. lactis* bivariant *diacetylactis* เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ขั้นตอน phage adsorption แม้ว่าจะเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญของการติดเชื้อแบคเทอริโอเฟจ แต่ก็มิได้หมายความว่าเมื่อเกิดขั้นตอนนี้แล้ว แบคทีเรียจะต้องถูกทำลายด้วยแบคเทอริโอเฟจเสมอไป

เนื่องจากแบคทีเรียที่มี receptor site สำหรับแบคเทอริโอเฟจ ก็สามารถดื้อต่อการติดเชื้อ (phage resistant) ได้โดยอาศัยกลไกอื่นในการต้านทานการติดเชื้อ ได้แก่ อาศัยกลไก lysogenic immunity คือ การที่แบคเทอริโอเฟจที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์สามารถเข้าไปมีชีวิตอยู่ในโฮสต์เซลล์แบบ lysogeny โดยอยู่ในระยะ prophage ซึ่งมีผลทำให้แบคทีเรียดังกล่าวจะไม่ถูกบุกรุกด้วยแบคเทอริโอเฟจชนิดเดียวกันนั้นอีก ซึ่งคล้ายกับการมีภูมิคุ้มกันต่อแบคเทอริโอเฟจ หรืออาศัยกลไก modification/restriction (M/R) system คือการสร้าง restriction endonuclease มาทำลายแบคเทอริโอเฟจที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์ เป็นต้น

ตารางที่ 4 ตัวอย่างแบคเทอริโอเฟจที่ทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

แบคเทอริโอเฟจ	แลคติกแอสิดแบคทีเรีย
bIL67 (lytic)	*L. lactis*
c2 (lytic)	*L. lactis*
sk1 (lytic)	*L. lactis*
ϕbIL70 (lytic)	*L. lactis*
r1t (temperate)	*L. lactis*
Tuc2009 (temperate)	*L. lactis*
Tp-901-1 (temperate)	*L. lactis*
ϕLL-H (lytic)	*Lb. delbrueckii* spp. *lactis*
ϕgle (temperate)	*Lactobacillus*
ϕ01205 (temperate)	*S. thermophilus*
ϕ7201 (temperate)	*S. thermophilus*
ϕDT1 (temperate)	*S. thermophilus*
BK5-T (temperate)	*L. lactis*
ϕvML3 (lytic)	*L. lactis*
F4-1 (lytic)	*L. lactis*
ϕ7-9 (lytic)	*L. lactis*
ϕ50 (lytic)	*L. lactis*
ϕLC3 (temperate)	*L. lactis*
ϕUS3 (lytic)	*L. lactis*
ϕ197 (lytic)	*L. lactis*
bIL66 (lytic)	*L. lactis*
bIL41 (lytic)	*L. lactis*
ϕ31 (lytic)	*L. lactis*
ϕadh (temperate)	*Lb. gasseri*
mv4 (temperate)	*Lb. delbrueckii* spp. *lactis*
ϕSfi21 (temperate)	*S. thermophilus*

(Forde and Fitzgerald, 1999)

ในขั้นตอน phage adsorption ปัจจัยอีกอย่างหนึ่งที่มีความสำคัญคือ ประจุที่ผิวภายนอกของแลคติกแอสิดแบคทีเรียและแบคเทอริโอเฟจ ซึ่งจะเป็นตัวควบคุมการเกิด phage adsorption การเติมสารเคมีบางชนิด (ได้แก่ $CaCl_2$ และ $MgCl_2$ เป็นต้น) ที่เมื่อละลายน้ำแล้วแตกตัวให้อิออนที่มีประจุลงไปในสิ่งแวดล้อมที่แบคทีเรียและแบคเทอริโอเฟจอาศัยอยู่ร่วมกัน มีส่วนช่วยสนับสนุนการเกิด phage adsorption โดยเชื่อว่าอิออนที่มีประจุบวกที่เติมลงไปนั้นจะมีส่วนช่วยลบล้าง (neutralize) ประจุลบที่ปรากฏอยู่ทั้งบนผิวเซลล์ของแบคทีเรียและโครงสร้างภายนอกของแบคเทอริโอเฟจ ดังนั้นสารเคมีเหล่านี้จึงส่งเสริมให้เกิดขั้นตอน phage adsorption ได้ง่ายหรือดียิ่งขึ้น (Huang and Starr, 1973) ด้วยเหตุนี้ในการเพาะเลี้ยงหรือเพิ่มจำนวนแบคเทอริโอเฟจในโฮสต์เซลล์จึงนิยมเติมสารเหล่านี้ลงไปด้วย สำหรับแคลเซียมอิออนนั้นเคยมีรายงานว่ามีความจำเป็นต่อการเพิ่มจำนวนของ lactococcal phage หลายชนิด แต่อย่างไรก็ตามยังมีแบคเทอริโอเฟจบางชนิดที่ไม่จำเป็นต้องอาศัยอิออนเหล่านี้ในการเพิ่มจำนวน การทราบว่าแบคเทอริโอเฟจต้องอาศัยแคลเซียมอิออนเพื่อการเพิ่มจำนวน สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียให้ปราศจากแคลเซียม ซึ่งสามารถช่วยป้องกันหัวเชื้อไม่ให้ถูกบุกรุกด้วยแบคเทอริโอเฟจได้ในระดับหนึ่ง

วิธีการในการนำสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจหรือ DNA เข้าสู่เซลล์แลคติกแอสิดแบคทีเรียยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดนัก แต่จากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนสามารถมองเห็นแบคเทอริโอเฟจที่ปราศจาก DNA ในส่วนหัวขณะที่กำลังยึดติดหรือเกาะ (attach) อยู่กับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย จึงทำให้เชื่อว่าสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจน่าจะถูกส่งผ่านมาตามท่อกลวงภายในของส่วนหาง (channel in the phage tail) และเรียกกระบวนการนำ DNA เข้าสู่เซลล์ในลักษณะเช่นนี้ว่า DNA injection อย่างไรก็ตามการเรียกเช่นนี้อาจไม่ถูกต้องนักสำหรับแบคเทอริโอเฟจทุกชนิด เนื่องจากแบคเทอริโอเฟจหลายชนิดของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย เป็นชนิดที่ไม่มีหางที่ยืดหดได้ (non-contractile tail) ด้วยเหตุนี้กระบวนการนำ DNA เข้าสู่เซลล์ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียจึงน่าจะเลี่ยงไปใช้คำว่า DNA introduction แทนซึ่งน่าจะเหมาะสมมากกว่า

เนื่องจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวก จึงมีผนังเซลล์ที่ค่อนข้างหนาเมื่อเทียบกับแบคทีเรียแกรมลบ โดยทั่วไปผนังเซลล์ของแบคทีเรีย lactococci มีความหนาประมาณ 20 นาโนเมตร ดังนั้นผนังเซลล์จึงเปรียบเสมือนเป็นโครงสร้างที่ช่วยป้องกันมิให้แบคทีเรียถูกบุกรุกด้วยแบคเทอริโอเฟจในระดับหนึ่ง และน่าจะมีส่วนทำให้แบคเทอริโอเฟจสามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแกรมบวกได้ยากกว่าแบคทีเรียแกรมลบด้วย การบุกรุกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียของแบคเทอริโอเฟจหรือการนำ DNA เข้าสู่โฮสต์เซลล์มีการศึกษากันมากในแบคทีเรียแกรมลบ โดยพบว่าแบคเทอริโอเฟจหลายชนิด (เช่น T4, T7 และ PRD1) มีเอนไซม์ที่อยู่ตรงบริเวณหางทำหน้าที่ในการเจาะผนังเซลล์แบคทีเรียให้เป็นรูเพื่อให้ DNA จากแบคเทอริโอเฟจสามารถเคลื่อนที่เข้าไปยังเซลล์แบคทีเรียได้ จึงนับเป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจภายในเซลล์ เรียกเอนไซม์เหล่านั้นว่า tail-based lytic enzymes ต่อมาในราวปี

ค.ศ. 2004 Kenny และคณะ พบว่าไลซิน (lysin) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สร้างจากแบคเทอริโอเฟจ Tuc2009 ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ *L. lactis* UC509.9 จากการค้นพบดังกล่าว ทำให้นักวิจัยมีการวิจารณ์กันอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับวิธีการบุกรุกเข้าสู่โฮสต์เซลล์แลคติกแอสิด แบคทีเรียของแบคเทอริโอเฟจ บางคนเชื่อว่าแบคเทอริโอเฟจทุกชนิดของแลคติกแอสิดแบคทีเรียน่าจะใช้ไลซินในการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ แต่บางคนก็เชื่อว่าน่าจะยังมีกลไกอื่นที่แบคเทอริโอเฟจกลุ่มนี้ใช้ในการบุกรุกเข้าสู่โฮสต์เซลล์

การเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจภายในเซลล์แลคติกแอสิดแบคทีเรียยังไม่ค่อยเป็นที่เข้าใจมากนัก แต่สิ่งหนึ่งที่น่าจะเหมือนกันกับแบคเทอริโอเฟจของแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ คือ หลังจากที่แบคเทอริโอเฟจบุกรุกเข้าสู่โฮสต์เซลล์แล้ว น่าจะมีผลทำให้สารพันธุกรรมของโฮสต์เซลล์แบคทีเรียถูกทำลาย และกลไกการทำงานภายในเซลล์แบคทีเรียตามปกติถูกรบกวนหรือหยุดชะงักลง สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอเฟจจะเข้าไปทำหน้าที่ควบคุมกลไกการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลชนิดต่าง ๆ ภายในเซลล์แทน โดยเริ่มจากการสร้าง mRNA สร้างโปรตีนหรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมแบคเทอริโอเฟจ และสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของแบคเทอริโอเฟจ ตลอดจนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำให้โฮสต์เซลล์แตก เพื่อแบคเทอริโอเฟจที่ถูกสร้างขึ้นใหม่เป็นจำนวนมากภายในโฮสต์เซลล์นั้นจะได้ออกจากเซลล์และบุกรุกเซลล์ใหม่ต่อไป การศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจที่นิยมทำกันอย่างแพร่หลายคือ one-step growth experiment ซึ่งคิดค้นโดย Ellis และ Delbruck ในปี ค.ศ. 1939 การทดลองนี้ให้ข้อมูลของแบคเทอริโอเฟจเกี่ยวกับระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ ได้แก่ latent period ซึ่งหมายถึงช่วงเวลาตั้งแต่แบคเทอริโอเฟจเข้าสู่เซลล์จนกระทั่งเริ่มปล่อย progeny bacteriophage ออกสู่นอกเซลล์ และ burst size ซึ่งหมายถึงค่าเฉลี่ยของ progeny bacteriophage ที่ถูกสร้างต่อหนึ่งเซลล์แบคทีเรียที่ติดเชื้อ (plaque-forming unit/infected cell) ในปี ค.ศ. 1973 Keogh รายงานว่าอุณหภูมิมีผลต่อ latent period และ burst size ของ lactococcal phage คือเมื่อเลี้ยง lactococcal phage ในอาหาร skim milk ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมี latent period อยู่ในช่วง 32-56 นาที และมี burst size 2-105 อนุภาคต่อหนึ่งเซลล์ที่ติดเชื้อ แต่เมื่อเลี้ยงแบคเทอริโอเฟจดังกล่าวในอาหารชนิดเดียวกันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะมี latent period อยู่ในช่วง 32-44 นาที มี burst size ตั้งแต่ 0-77 อนุภาคต่อหนึ่งเซลล์ที่ติดเชื้อ

อุณหภูมินับว่ามีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของแบคเทอริโอเฟจ เช่น แบคเทอริโอเฟจบางชนิดไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส แต่กลับสามารถเพิ่มจำนวนได้ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส แบคเทอริโอเฟจบางชนิดไม่เพิ่มจำนวนเมื่ออุณหภูมิสูงเกิน 34 องศาเซลเซียส แต่บางชนิดเพิ่มจำนวนได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสแต่ไม่เพิ่มจำนวนเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่านี้ เป็นต้น อย่างไรก็ตามแบคเทอริโอเฟจบางชนิดก็สามารถเพิ่มจำนวนได้ในทุกอุณหภูมิที่โฮสต์สามารถเจริญได้ โดยทั่วไปอุณหภูมิที่นิยมใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการนับจำนวนแบคเทอริโอเฟจคือ 30 องศาเซลเซียส แต่สำหรับการแยกแบคเทอริโอเฟจจากกระบวนการหมัก

นั้น อุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับสภาวะที่เกิดขึ้นจริงในกระบวนการหมักน่าจะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ใช้ในการแยกและตรวจหาแบคเทอริโอเฟจ

แบคเทอริโอเฟจของแลคติกแอสิดแบคทีเรียบางชนิดอาจเป็น temperate phage และดำรงชีวิตแบบ lysogeny ซึ่งการดำรงชีวิตของ temperate phage จะแตกต่างไปจาก lytic phage คือไม่ทำให้โฮสต์เซลล์แตก แต่ DNA ของแบคเทอริโอเฟจจะเข้าไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของแบคทีเรีย และเมื่อแบคทีเรียแบ่งเซลล์ DNA ของแบคเทอริโอเฟจก็ยังคงแทรกอยู่ในแบคทีเรียเซลล์ใหม่ทุกเซลล์ที่เกิดขึ้นตามที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น ความสัมพันธ์ระหว่างแบคเทอริโอเฟจและแบคทีเรียในลักษณะเช่นนี้นับว่ามีความคงตัว (stable) ค่อนข้างสูง ดังนั้นการไม่ทราบที่มาของแบคเทอริโอเฟจที่จำเพาะต่อหัวเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียหลาย ๆ ชนิด ทำให้เกิดข้อสันนิษฐานอันหนึ่งที่น่าจะเป็นไปได้คือ หัวเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียอาจติดเชื้อแบคเทอริโอเฟจอยู่ก่อนแล้วแต่แบคเทอริโอเฟจอยู่ในระยะ lysogeny (Petersen et al., 1999) ปัจจุบันมีข้อมูลที่น่าเชื่อถือมากขึ้นเรื่อย ๆ ว่าหัวเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ติดเชื้อ temperate phage นั่นเองคือแหล่งที่มาของแบคเทอริโอเฟจโดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรงงานผลิต cheeses และหัวเชื้อดังกล่าวก็เป็นต้นเหตุของการแพร่กระจายแบคเทอริโอเฟจเข้าสู่กระบวนการหมักในครั้งต่อ ๆ ไป โดยแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ติดเชื้อแบคเทอริโอเฟจเหล่านี้น่าจะมาจากน้ำนมดิบที่ใช้เป็นวัตถุดิบของการหมัก

การศึกษาความทนทานของแบคเทอริโอเฟจต่อสภาวะแวดล้อมนิยมศึกษาเกี่ยวกับ การทนความร้อน การทนต่อความเป็นกรด-ด่าง (pH) และการทนต่อน้ำยาฆ่าเชื้อ (disinfectant) (Sakaki and Oshima, 1975; Quiberoni et al., 2003a; Capra et al., 2006a) แบคเทอริโอเฟจของแลคติกแอสิดแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถมีชีวิตรอดได้แม้ว่าจะผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อแบบ HTST (high temperature for a short time) pasteurization โดยทั่วไปการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที สามารถกำจัด lactococcal phage ได้ แต่ก็ยังมีแบคเทอริโอเฟจบางชนิดเมื่ออยู่ในสภาพแห้ง (dried phage particle) สามารถทนอุณหภูมิสูงถึง 90-95 องศาเซลเซียสได้นาน 2 ชั่วโมง ดังนั้นในการใช้ความร้อนเพื่อควบคุมการปนเปื้อนของแบคเทอริโอเฟจในภาชนะที่ใช้ในการหมักหรือถังหมักจึงควรคำนึงถึงเรื่องนี้ด้วย โดยทั่วไปแบคเทอริโอเฟจของแลคติกแอสิดแบคทีเรียสามารถทนต่อ pH ช่วงกว้าง Hunter และ Whitehead (1940) รายงานว่าที่อุณหภูมิห้องเมื่อ pH ต่ำกว่า 2.5 และสูงกว่า 11.8 แบคเทอริโอเฟจจะไม่สามารถมีชีวิตรอดหรือไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ และการเติมกรดแลคติก 2.5% (v/v) ลงไปในน้ำนมที่ใช้เป็นวัตถุดิบของการหมักและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีสามารถช่วยลดการปนเปื้อนของแบคเทอริโอเฟจได้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์คนอื่น ๆ เกี่ยวกับความทนทานต่อ pH ของแบคเทอริโอเฟจพบว่า ที่อุณหภูมิห้องแบคเทอริโอเฟจส่วนใหญ่จะเสียสภาพอย่างรวดเร็วเมื่อ pH ต่ำกว่า 5 การทนทานของแบคเทอริเฟจต่อน้ำยาฆ่าเชื้อบางชนิดแสดงไว้ในตารางที่ 5 และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าไฮโปคลอไรต์ (hypochlorite) มีประสิทธิภาพในการควบคุมไวรัสรวมถึงแบคเทอริโอเฟจได้ค่อนข้างดี แม้ว่าฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดแบคเทอริโอเฟจได้แต่ก็ต้องใช้ในความเข้มข้นสูง

ส่วน 70% แอลกอฮอล์ (alcohol) มีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ การฟุ้งกระจายของแบคเทอริโอเฟจในอากาศ (aerosol) นับว่าเป็นปัญหาที่สำคัญอีกประการหนึ่งโดยเฉพาะในโรงงานผลิต cheeses แม้ว่าไฮโปคลอไรต์จะสามารถนำไปใช้ได้ผลดีในการควบคุม lactococcal phage ที่ฟุ้งกระจายอยู่ในอากาศด้วยก็ตาม แต่ก็ส่งผลทำให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับการสึกกร่อนของภาชนะที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม ดังนั้นปัจจุบันการควบคุมการฟุ้งกระจายของแบคเทอริโอเฟจในอากาศจึงนิยมเลี่ยงไปใช้ไดคลอโรไอโซไซยานูลิกแอสิด (dichloroisocyanuric acid) แทน เพราะให้ประสิทธิภาพในการควบคุมแบคเทอริโอเฟจได้ดีใกล้เคียงกับไฮโปคลอไรต์ แต่ลดปัญหาการสึกกร่อนได้มาก

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อบางชนิดต่อการทำลายแบคเทอริโอเฟจ

Sterilant	**Final concentration in phage-sterilant mixture (%)**	**Time required for complete destruction (room temperature)**
Hypochlorite	0.05	Less than 1 min
$KMnO_4$	0.25	Less than 1 min
	0.05	Between 1 and 5 min
	0.025	Not in 2 days
H_2O_2	3.0	Between 15 and 60 min
	2.5	Between 1 and 24 hr
	0.5	Between 1 and 24 hr
Formaldehyde	5.0	Between 5 and 30 min
	2.5	Between 30 and 60 min
	1.0	Between 1 and 24 hr
	0.5	Between 1 and 24 hr
$HgCl_2$	2.5	Between 1 and 24 hr
	1.0	Between 2 and 3 days
	0.5	Not in 14 days
Alcohol	90.0	Between 3 and 4 days
	85.0	Between 2 and 3 days
	80.0	Between 2 and 3 days
	75.0	Between 3 and 5 days
	70.0	Not in 6 days
Phenol	2.5	Not in 14 dys

(Hunter and Whitehead, 1940)

แบคเทอริโอเฟจของแลคติกแอสิดแบคทีเรียสามารถพบได้ทั่วไปทั้งในสิ่งแวดล้อมและในอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากนม ผักดองชนิดต่าง ๆ เป็นต้น จากอดีตจนถึงปัจจุบันสามารถคัดแยกแบคเทอริโอเฟจของแลคติกแอสิดได้จากอาหารหลากหลายชนิด ในที่นี้จะขอยกตัวอย่างพอสังเขปของงานวิจัยที่ตรวจพบแบคเทอริโอเฟจซึ่งสามารถทำลายแลคติกแอสิดแบคทีเรียในอาหาร ดังนี้ Watanabe และคณะ (1970) ตรวจพบแบคเทอริโอเฟจ 2 สายพันธุ์ในยาคูลท์ (yakult) คือ PL-1 และ J1 ซึ่งสามารถทำลาย *Lactobacillus casei*, Yoon และคณะ (1997) ตรวจพบแบคเทอริโอเฟจ SC921 ในกิมจิ (kimchi) ซึ่งสามารถทำลาย *Lactobacillus plantarum*, Barrangou และคณะ (2002) ตรวจพบแบคเทอริโอเฟจหลายสายพันธุ์ คือ R01, R03, R05, R09, R12 และ R19 ในกระบวนการหมักกระหล่ำปลีดองในระดับอุตสาหกรรม (industrial sauerkraut fermentation) ซึ่งแบคเทอริโอเฟจเหล่านี้สามารถทำลาย *Leuconostoc fallax*, Lu และคณะ (2003) ตรวจพบแบคเทอริโอเฟจ ϕJL-1 ในแตงกวาดอง (cucumber fermentation) ซึ่งสามารถทำลาย *Lactobacillus plantarum*, Quiberoni และคณะ (2004) ตรวจพบแบคเทอริโอเฟจหลายสายพันธุ์ คือ BYM, YAB และ Ib_3 ในโยเกิร์ต (yogurt) ซึ่งแบคเทอริโอเฟจเหล่านี้สามารถทำลาย *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, และ Greer และคณะ (2007) ตรวจพบแบคเทอริโอเฟจ ggg ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมูบรรจุแบบสุญญากาศ (vacumm-packaged pork loins) ซึ่งสามารถทำลาย *Leuconostoc gelidum* เป็นต้น สำหรับ lactococcal phage ก็มีรายงานว่าสามารถตรวจพบได้ในอาหารหลายชนิด เช่น cheeses, buttermilk และ sour cream (Moineau et al., 1996) อย่างไรก็ตามการตรวจพบแบคเทอริโอเฟจในอาหารหมักของไทยยังไม่มีรายงาน lactococal phage ที่พบส่วนใหญ่มีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded DNA มีหางแบบ non-contractile tail และที่พบบ่อยคือ *Siphoviridae* family มีบ้างที่พบว่าอยู่ใน *Podoviridae* family ส่วน *Myoviridae* family พบได้น้อยมาก (Deveau et al., 2006)

ปัญหาเกี่ยวกับแบคเทอริโอเฟจทำลายหัวเชื้อนำมาซึ่งการค้นหากลยุทธ์ในการป้องกันแบคเทอริโอเฟจในเบื้องต้น ได้แก่ การหมักภายใต้แรงดัน (pressurised fermentation) หรือการเลี้ยงหัวเชื้อในอาหารที่มีฟอสเฟตสูง เป็นต้น แต่ก็ยังไม่สามารถแก้ปัญหาให้หมดไปได้ ต่อมาได้มีผู้พยายามหาวิธีการในการควบคุมแบคเทอริโอเฟจโดยวิธีอื่น ๆ เช่น การคัดเลือกหัวเชื้อที่เหมาะสม หรือมีศักยภาพในการต้านทานต่อการถูกบุกรุกด้วยแบคเทอริโอเฟจจากแบคทีเรียที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ (naturally occurring bacteria) หรือโดยการใช้แบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ (genetic engineering bacteria) เพื่อให้มีความทนทานต่อการบุกรุกของแบคเทอริโอเฟจ ซึ่งการค้นหาแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการต้านทานต่อแบคเทอริโอเฟจ สิ่งที่ต้องคำนึงถึงเป็นอันดับแรกคือ แบคทีเรียดังกล่าวยังต้องรักษาคุณภาพการหมักเพื่อให้ได้ผลผลิตหรืออาหารหมักที่มีคุณสมบัติแบบเดิมไว้ได้

จากกลไกการเข้าทำลายหัวเชื้อของแบคเทอริโอเฟจ หากต้องการค้นหาหรือพัฒนาสายพันธุ์แบคทีเรียให้ต้านทานต่อแบคเทอริโอเฟจ แนวทางที่ควรนำมาพิจารณาแบ่งออกได้เป็น 4 ประเด็น คือ (1) ยับยั้งขั้นตอน phage adsorption หรือการยึดเกาะระหว่างแบคเทอริโอเฟจกับโครงสร้างหรือส่วนประกอบภายนอกของแบคทีเรีย (2) ขัดขวางการปล่อย DNA ของแบคเทอริโอเฟจเข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรีย (3) เปลี่ยนแปลง restriction/modification (R/M) symtem ของแบคทีเรียเพื่อให้มีความสามารถในการผลิต restriction endonuclease ที่สามารถทำลายแบคเทอริโอเฟจที่เป็นปัญหาได้ และ (4) ทำให้เกิด abortive infection คือ แม้ว่าแบคเทอริโอเฟจจะบุกรุกเข้าสู่เซลล์ แต่ก็ไม่สามารถเพิ่มจำนวนหรือทำให้เกิด progeny bacteriophgae เกิดขึ้นภายในเซลล์แบคทีเรีย (Forde and Fitzgerald, 1999) อย่างไรก็ตามถ้ามองในมุมของแบคเทอริโอเฟจ แบคเทอริโอเฟจเองก็สามารถพัฒนาตัวเองหรือมีการปรับตัวอยู่ตลอดเวลาเพื่อให้ยังคงสภาพการมีชีวิต โดยการดื้อต่อกระบวนการหรือกลไกต่าง ๆ ที่เกิดจากการปรับตัวของแบคทีเรียเองหรือเกิดจากน้ำมือมนุษย์ตามแนวทางที่กล่าวมา และยังสามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียที่เป็นโฮสต์ได้ ดังนั้นงานเกี่ยวกับการค้นหาแบคทีเรียที่ดื้อต่อแบคเทอริโอเฟจ หรือปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียให้ต้านทานต่อแบคเทอริโอเฟจ จึงยังคงต้องดำเนินไปอย่างต่อเนื่อง