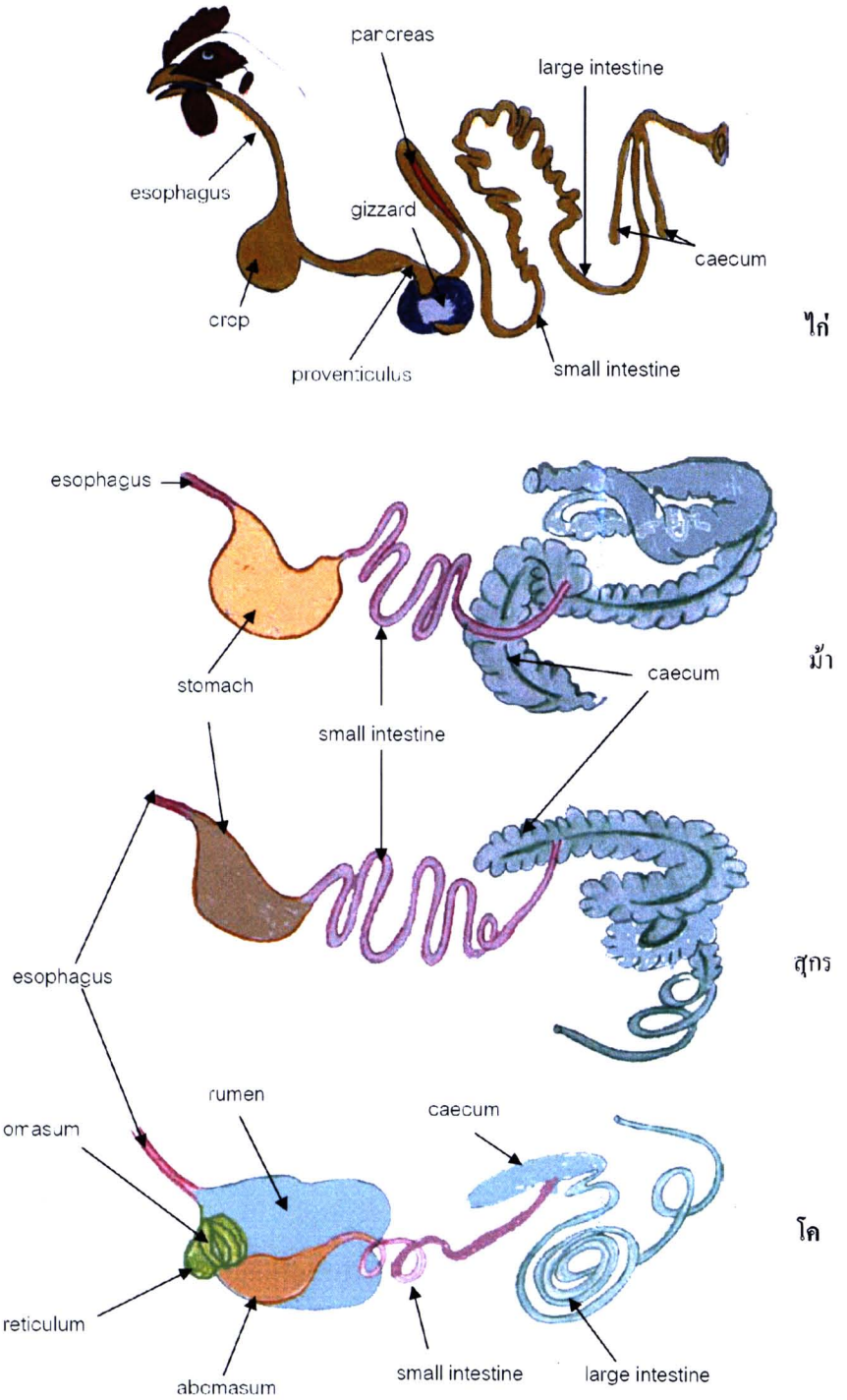
บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ระบบทางเดินอาหาร (Gastrointestinal tract)

ระบบทางเดินอาหารมีลักษณะพิเศษที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหาร (กระเพาะอาหารและส่วนต้นของลำไส้เล็ก) ดูดซึมสารอาหาร (ลำไส้เล็ก) และการเก็บรักษาน้ำและกักเก็บของเสีย (ลำ ไส้ใหญ่) เมื่อมนุษย์หรือสัตว์กินอาหารเข้าไปในร่างกาย อาหารจะเคลื่อนที่ผ่านระบบทางเดินอาหาร ในขณะที่อาหารเคลื่อนที่ผ่านระบบทางเดินอาหารส่วนต่าง ๆ จะเกิดการย่อยอาหาร ทำให้โมเลกุลของอาหารมีขนาดเล็กลง จนกระทั่งสามารถดูดซึมผ่านเข้าระบบเลือด หรือระบบน้ำเหลืองเพื่อเข้าสู่ตับ จากนั้นจึงถูกส่งไปในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป (Tannock, 1995)

ระบบย่อยอาหารของมนุษย์ หรือในสัตว์เศรษฐกิจทุกชนิด ประกอบด้วย อวัยวะย่อยอาหารที่มีท่อทางเดินอาหารที่มีลักษณะเป็นท่อยาว เริ่มต้นตั้งแต่ช่องปาก (mouth) และสิ้นสุดที่ช่องทวาร (anus) นอกจากนี้ ยังมีส่วนของอวัยวะที่ช่วยในการย่อยอาหารอื่น ๆ อีก เช่น ต่อมน้ำลาย ตับ และ ตับอ่อน เป็นต้น โครงสร้างพื้นฐานของท่อทางเดินอาหารในสัตว์ทุกชนิด ประกอบด้วยผนัง 4 ชั้น คือ ชั้นเยื่อเมือก (mucous membrane หรือ mucosa) ชั้นใต้เยื่อเมือก (submucosa) ชั้นกล้ามเนื้อ (muscularis externa) ส่วนใหญ่เป็นส่วนของกล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle) และชั้นเซโรซาหรือชั้นเยื่อบุผิวท่อทางเดินอาหารด้านนอก (serosa mambrane) แต่ละส่วนของท่อทางเดินอาหารมีโครงสร้างพื้นฐานเหมือนกัน แต่มีความแตกต่างกันที่ขนาดรูปร่างและความหนาของผนังแต่ละชั้น มนุษย์ โค สุกร และสัตว์ปีก มีการพัฒนาท่อทางเดินอาหารที่แตกต่างกันไปตามลักษณะของอาหารที่สัตว์กิน ภาพ 1 แสดงส่วนประกอบของท่อทางเดินอาหารของสัตว์ โดยสัตว์กระเพาะเดี่ยวท่อทางเดินอาหารมีลักษณะเป็นถุง มีการขนส่งกรดเกลือและเอนไซม์เปปซินใช้ในการย่อยโปรตีนจะหลั่งเอนไซม์จากตับอ่อนและถุงน้ำดี เพื่อย่อยอาหารในลำไส้เล็ก (James, 2000) สัตว์ปีกทางเดินอาหารจะมีกระเพาะพักสำหรับเก็บอาหาร มีกระเพาะแท้หลั่งน้ำย่อย และกึ๋นสำหรับบดอาหาร (สุโขทัยธรรมาธิราช, 2543) สัตว์เคี้ยวเอื้องมี 4 กระเพาะ และมีกระบวนการย่อยอาหารพวกเยื่อใย โดยอาศัยน้ำย่อยจากจุลินทรีย์ในกระเพาะส่วนหน้า ส่วนในกระเพาะอโบมาซัมและลำไส้สามารถหลั่งน้ำย่อย ซึ่งย่อยอาหารคล้ายกับสัตว์กระเพาะเดี่ยว โดยความจุของท่อทางเดินอาหารสัตว์ประเภทนี้จะแตกต่างตามชนิดสัตว์ (James and Baker, 2003)



ภาพ 1 แสดงส่วนประกอบของท่อทางเดินอาหารของสัตว์

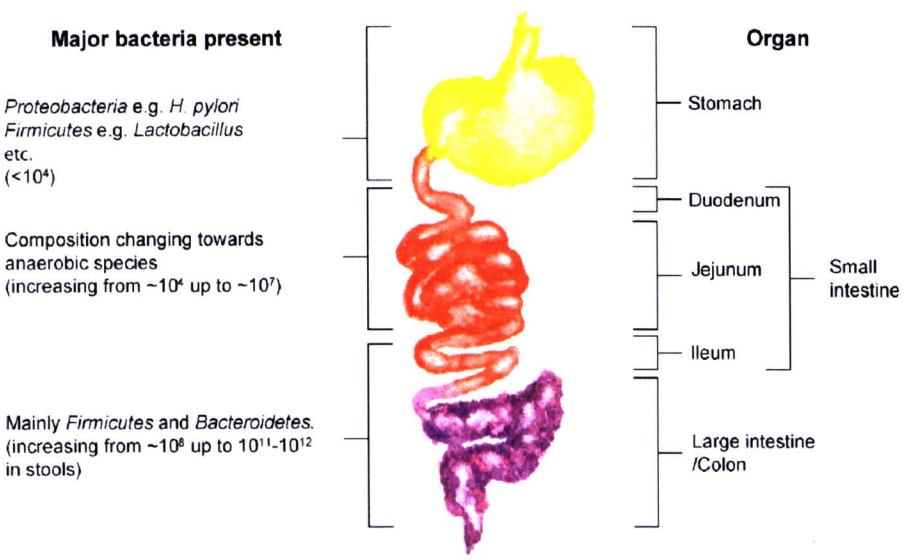
ที่มา: James and Baker (2003)

จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร (Microbial in the gastrointestinal tract)

มนุษย์หรือสัตว์แรกเกิดจะไม่มีหรือมีจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารน้อยมาก แต่การที่มนุษย์หรือสัตว์ได้สัมผัสกับจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม อาหาร สิ่งปูรองนอน มูลสัตว์ ก็จะทำให้สัตว์ได้รับจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เข้าไปในทางเดินอาหาร ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะเจริญเติบโตต่อไปในระบบทางเดินอาหาร โดยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารจะดำเนินกิจกรรมเพื่อการเติบโตและเพิ่มปริมาณโดยใช้สารอาหารที่สัตว์กินเข้าไป เพียงระยะเวลาประมาณ 2-3 เดือนหลังจากที่สัตว์คลอด ประชากรของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารเริ่มมีความเสถียร (Fanaro *et al.*, 2003) และจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีแนวโน้มที่จะอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะมีความแตกต่างกันในแต่ละสิ่งมีชีวิตขึ้นอยู่กับ สิ่งแวดล้อม อาหาร และปัจจัยอื่น ๆ เป็นสิ่งบ่งชี้ลักษณะจำเพาะของจุลินทรีย์ชนิดนั้น ๆ ดังนั้นในระบบทางเดินอาหารมนุษย์หรือสัตว์แต่ละชนิดมีลักษณะพิเศษคือ มีทั้งจุลินทรีย์ชนิดที่เป็น predominant และ subdominant อาศัยอยู่ในเยื่อเมือกของระบบทางเดินอาหารจำนวนมาก (Guarner, 2006) สำหรับกลไกการใช้ประโยชน์ของอาหารในลำไส้เล็ก มีวิลไลทำหน้าที่เป็นตัวกรองและอนุญาตให้สารอาหารที่ย่อยสมบูรณ์ ผ่านเข้ากระแสเลือดไปเลี้ยงเซลล์ต่าง ๆ ของร่างกาย ถ้าสมดุลย์ของจุลินทรีย์ไม่เหมาะสม หรือมีจุลินทรีย์ก่อโรคมาก ซึ่งจะขับสารพิษออกมายึดเกาะวิลไล เกิดภาวะทำให้วิลไลไม่สามารถกรองเชื้อโรคได้ ทำให้เข้าไปในกระแสเลือดเกิดโรคต่าง ๆ ขึ้น ต่อมน้ำเหลืองในลำไส้เป็นส่วนสำคัญต่อการทำงานในการป้องกันการดูดซึมสารพิษ และแบคทีเรียเข้าไปในระบบของร่างกาย จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์จะสามารถทำลายเชื้อโรคโดยตรง ซึ่งจุลินทรีย์ในลำไส้คนหรือสัตว์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (beneficial microorganisms) ซึ่งจะยึดเกาะพื้นที่เยื่อเมือกในลำไส้ของสัตว์ สามารถป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ที่ก่อโรคเจริญเติบโต ได้แก่ กลุ่มแบคทีเรีย lactobacilli, bifidobacterium, bacilli, streptococci และ กลุ่ม yeast เป็นต้น และกลุ่มสองเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อโรค (pathogenic microorganisms) จะขับสารพิษออกมายึดเกาะวิลไล ทำให้เกิดโรคในสัตว์ ซึ่งสัตว์จะมีอัตราการตายสูง น้ำหนักลดลง การใช้ประโยชน์จากอาหารที่กินลดลง การให้ผลผลิตต่ำ เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ ได้แก่ กลุ่มแบคทีเรีย Coliforms, *Salmonella*, *Clostridia*, *Shigella* และ *Staphylococcus* เป็นต้น (Hardy, 1975)

ปัจจุบันความรู้เกี่ยวกับจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารค่อนข้างสมบูรณ์ เริ่มจากพื้นฐานการศึกษาโดยทำการเพาะเลี้ยงและการศึกษาลำดับเบสดีเอ็นเอส่วนยีน 16S rRNA ซึ่งสามารถแสดงถึงความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารได้อย่างชัดเจน (Dethlefsen *et al.*, 2006) จำนวนจุลินทรีย์ในกระเพาะอาหารมีปริมาณน้อย เนื่องจากกระเพาะอาหารมีสภาวะความเป็นกรดสูง ซึ่งมีจำนวนจุลินทรีย์มากที่สุดประมาณ 10^4 CFU/ml ของน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร แบคทีเรียชนิด *Helicobactor pylori* เพียงชนิดเดียวที่อาศัยอยู่ตามเยื่อเมือกของกระเพาะอาหารมนุษย์ (Dethlefsen

et al., 2006) แต่ในปัจจุบัน จากการศึกษาลำดับเบสดีเอ็นเอส่วนยีน 16S rRNA พบว่า มีจำนวนจุลินทรีย์ที่หลงเหลือในกระเพาะอาหารประมาณ 128 ชนิด (Bik *et al.*, 2006) กลุ่มของ จุลินทรีย์ที่น่าสนใจคือ กลุ่มแบคทีเรีย lactobacilli และกลุ่มแบคทีเรียชนิดใหม่ ๆ ที่ได้ทำการจำแนกจากเนื้อเยื่อในกระเพาะอาหาร (Roos *et al.*, 2005) การลำเลียงอาหารจากปากถึงลำไส้เล็กในส่วนไอเลียมในการย่อยอาหาร ใช้เวลาน้อยมากประมาณ 4-6 ชั่วโมง (Bourlioux *et al.*, 2003) ซึ่งเป็นปัจจัยจำกัดสำหรับการสร้างอาณานิคมของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม จำนวนจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม (jejunum) และในลำไส้เล็กในส่วนไอเลียม (ileum) มีจำนวนจุลินทรีย์ประมาณ 10^8 CFU/ml (Metchikoff, 1907) สำหรับลำไส้ใหญ่เป็นแหล่งของจุลินทรีย์ประจำถิ่นอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารมากที่สุด เนื่องจากการลำเลียงอาหารในการย่อยและดูดซึมอาหารในลำไส้ใหญ่ใช้เวลานานมากประมาณ 55 ชั่วโมง (Bourlioux *et al.*, 2003) จึงทำให้มีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดอาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่เป็นจำนวนมากประมาณ 10^{11} - 10^{12} CFU/ml (Dethlefsen *et al.*, 2006) ในภาพ 2 แสดงชนิดจุลินทรีย์ประจำถิ่นของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ระหว่างลูเมน (lumen) และเยื่อเมือก (mucosal membrane) จะมีความแตกต่างกัน (Zoetendal *et al.*, 2002)



ภาพ 2 แสดงชนิดจุลินทรีย์ประจำถิ่นของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์
ที่มา : Dethlefsen *et al.* (2006)

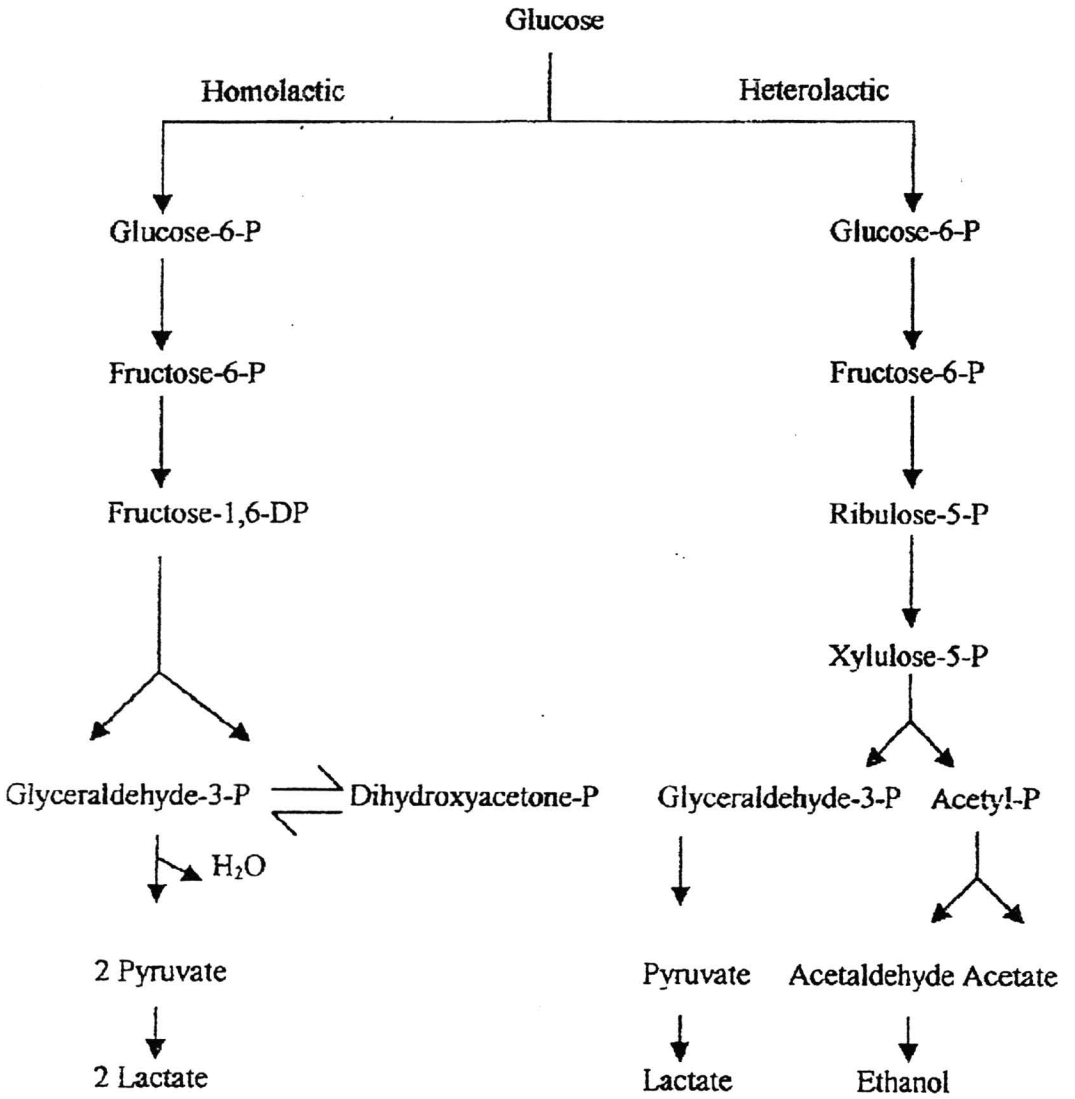
แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB)

แบคทีเรียกรดแลคติก เป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคส และสับสเตรทอื่น ๆ ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักอาหารเป็นแหล่งพลังงาน และให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติก (Snealth *et al.*, 1986) แบคทีเรียกลุ่มนี้มีลักษณะทั่วไปดังนี้คือ ติดสีแกรมบวก รูปร่างมีทั้งแบบท่อน ทรงกลม และกึ่งท่อนกึ่งทรงกลม ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีระบบ ไซโตโครม ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส มีความต้องการธาตุอาหารซับซ้อน และค่อนข้างอุดมสมบูรณ์ ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน ใช้คาร์โบไฮเดรทเป็นแหล่งคาร์บอน เจริญได้ในอาหารที่มีปัจจัยการเจริญ และวิตามินหลายชนิด เช่น biotin, riboflavin และต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม และ ฟอสฟอรัส เป็นต้น สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน และสามารถทนกรดได้ (Wood and Halzapfel, 1995) แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเล็กน้อย จนถึงสภาวะไร้ออกซิเจน ส่วนใหญ่เป็นพวกไม่ก่อโรค โดยธรรมชาติมักพบอยู่ทั่วไปโดยเฉพาะในอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์นม เนื้อหมัก ไส้กรอกเปรี้ยว ผักดอง หญ้าหมัก เครื่องดื่มต่าง ๆ นอกจากนี้ ยังพบในพืช ช่องคลอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ลำไส้เล็ก และทางเดินหายใจของคนและสัตว์ (เอกชัย, 2536)

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ตามลักษณะการใช้อาหารและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก (นภา, 2534) คือ

1.โฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (homofermentative) เป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่หมักกลูโคสแล้วให้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ โดยทั่วไปประมาณร้อยละ 85 หรือมากกว่า ไม่ต้องการไธอามีน (thiamine) ในการเจริญเติบโต เจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส หรือ 15 องศาเซลเซียส สร้างเอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) และเอนไซม์เฮกโซม์ไอโซเมอเรส (hexose isomerase) และใช้ Emden-Meyerhof-Parnas (EMP) ทำให้ได้กรดแลคติก 2 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล ได้แก่ *Lactobacillus sake, Lb. acdophilus, Pediococcus pentosaceus* และ *P. dextrincus* เป็นต้น

2. เฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ (Heterofermentative) เป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่หมักกลูโคสให้กรดแลคติกประมาณร้อยละ 50 นอกจากนี้ให้ กรดอะซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยกระบวนการฟอสโฟคีโตเลส ได้แก่ *Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum* และ *Lb. buchneri* เป็นต้น ภาพ 3 แสดงลักษณะผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสแบคทีเรียกรดแลคติก



แบคทีเรียกรดแลคติกในระบบทางเดินอาหาร

แบคทีเรียกรดแลคติกในระบบทางเดินอาหารมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสุขภาพของคน และสัตว์ เพราะสามารถช่วยป้องกันการแข่งขันและการแพร่กระจายของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ ยังมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก (Oh *et al.*, 2000) มีคำจำกัดความมากมายเกี่ยวกับโปรไบโอติก ซึ่งเกิดขึ้นครั้งแรกโดย Lilly and Stillwell (1965) อธิบายว่าโปรไบโอติกเป็นสารที่ผลิตจากโปรโตซัวชนิดหนึ่ง และสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ต่อมา Parker (1974) อธิบายว่าโปรไบโอติก คือ กลุ่มของจุลินทรีย์หรือสารที่เสริมในอาหารสัตว์ และมีประโยชน์ในอาหารสัตว์และมี

ประโยชน์ต่อสัตว์ โดยจะไปมีผลกับจุลินทรีย์ในลำไส้ของสัตว์ คำจำกัดความของ Parker บอกชัดเจนเกี่ยวกับจุลินทรีย์และสารบางอย่าง ซึ่งทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ คำจำกัดความใหม่นี้เน้นถึงความสำคัญของเซลล์สิ่งมีชีวิตซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มีความสำคัญของการเป็นโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพ ต่อมาได้มีผู้ให้คำจำกัด ความเกี่ยวกับโปรไบโอติกมากมาย ซึ่งในปัจจุบันโปรไบโอติกได้มีคำจำกัดความว่า จุลินทรีย์ที่มีชีวิตมีจำนวนพอเพียงที่จะสามารถเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ดั้งเดิม (โดยการฝังหรือยึดเกาะ) ในช่องท้องของโฮสต์และมีประโยชน์ต่อสุขภาพของโฮสต์ (Schrezenmeir and De Vrese, 2001) นอกจากนี้ โปรไบโอติกยังได้รับการยอมรับจาก FAO/WHO โดยให้คำจำกัดความของ โปรไบโอ-ติกว่า จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อได้รับในปริมาณที่เพียงพอจะทำให้มีประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายที่มันเข้าไปอาศัยอยู่ (FAO/WHO, 2001) ในปัจจุบันมีโปรไบโอติกจำนวนมากและหาง่ายในอาหารหมัก โดยเฉพาะโยเกิร์ต แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลาย โดยได้รับการพิจารณาว่ามีประโยชน์ต่อมนุษย์ เช่น แบคทีเรียกรดแลคติกที่อาศัยอยู่บริเวณของลำไส้และที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร กลุ่มของจุลินทรีย์โปรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus*, *Bifodobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus* และ *Saccharomyces* เป็นต้น (Fuller, 1992) ส่วนใหญ่ที่แบคทีเรียกรดแลคติกมักนำมาใช้เสริมในการเลี้ยงสัตว์ เนื่องจากมีคุณสมบัติครบตามเกณฑ์ของโปรไบโอติกที่ดี ได้แก่ เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ก่อโรค พบเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารคนและสัตว์ สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ดี และมีเมตาบอลิซึมในร่างกายผู้อาศัยสามารถทนกรดและเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นสูง สามารถเจริญอยู่ในระบบทางเดินอาหารและลำไส้สัตว์ได้ สร้างกรดอินทรีย์และสารต้านจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในลำไส้ได้ เพิ่มจำนวนและเพาะเลี้ยงได้ง่ายที่อุณหภูมิห้อง รวมทั้งทนต่อสารปฏิชีวนะที่เสริมในอาหารสัตว์ได้ โดยสามารถแยกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทนสารปฏิชีวนะได้จาก สุกร ไก่ และโค ที่ได้รับสารปฏิชีวนะ (Nousianean and Setala, 1992)

สารต้านทานจุลชีพจากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก มีบทบาทในกระบวนการหมักอาหาร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยสูงขึ้น โดยปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งคือ การสร้างกรด ทำให้พีเอชลดต่ำลง ทำให้สภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย คือ กรดแลคติก และกรดอะซิติก นอกจากนี้ ยังมีสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่เกิดขึ้น และมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น สารที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้นมีหลายชนิด ได้แก่

1. กรดอินทรีย์ (Organic acid)

กรดอินทรีย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกในกระบวนการหมัก ได้แก่ กรดแลคติก และกรดอะซิติก ซึ่งทำให้พีเอชลดลงจนสามารถที่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดได้ กรดอ่อนที่มีพีเอชต่ำสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าพีเอชเป็นกลาง ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดจะผลิตกรดอะซิติกและโพรพิโอนิกในปริมาณน้อย และกรดทั้งสองชนิดมีค่า pK_a สูงกว่ากรดแลคติก ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกรดแลคติก (Davison,1990) กรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิกถูกนำมาใช้เติมลงไปในอาหาร แต่ไม่ได้ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ได้มาจากการสังเคราะห์ทางเคมี อาหารหมักบางชนิด ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างกรดอะซิติกกับกรดแลคติก เพื่อทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ดีกว่าใช้ชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว (Rubin, 1978) เมื่อกรดอินทรีย์เข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรียจะแตกตัวปล่อยโปรตอนเข้าไปในไซโตพลาสซึม ทำให้เกิดภาวะที่เป็นกรด มีผลยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ ซึ่งมีผลทำให้จุลินทรีย์ตาย (Fuller, 1989) มีรายงานว่า แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มที่ก่อโรคได้ โดยส่วนใหญ่จะเป็น *Lactobacillus sake* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อสามารถสร้างกรดอินทรีย์มายับยั้งการเจริญของ *Salmonella typhimurium* และ *Staphylococcus aureus* ได้ (Schillinger and Lucke, 1989)

2. ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide; H_2O_2)

เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมในระหว่างการเจริญของ *Lactobacillus* ซึ่งอาจเกิดได้หลายทางดังนี้ปฏิกิริยา

$$\text{Pyruvate} + O_2 + PO_4^{-3} \xrightarrow{\text{pyruvate oxidase}} \text{Acetylphosphate} + CO_2 + H_2O$$

$$\text{Lactate} + O_2 \xrightarrow{\text{L-lactate oxidase}} \text{Pyruvate} + H_2O_2$$

$$\text{Lactate} + O_2 \xrightarrow{\text{D-lactate dehydrogenase}} \text{Pyruvate} + H_2O_2$$

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

ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญของแบคทีเรีย จะสะสมเพิ่มขึ้นในอาหาร เนื่องจากไม่มีเอนไซม์คะตะเลสที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และเป็นสารที่มี

สมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นกลายเป็นสารที่มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ มีรายงานว่า ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.12 มิลลิโมลต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ lactococci ได้ร้อยละ 51 และที่ความเข้มข้นมากกว่า 1.5 มิลลิโมลต่อลิตร จะมีผลทำให้เซลล์ตาย (Ander, 1970) ในสภาวะที่มีออกซิเจน แบคทีเรียกรดแลคติกจะสามารถสร้างไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นตัวออกซิไดซ์ที่รุนแรง และมีผลต่อเซลล์แบคทีเรีย โดยหมู่ sulfhydryl ภายในโมเลกุลโปรตีนของเซลล์และในชั้นไขมันที่เมมเบรนสามารถออกซิไดซ์ได้ (Lindgren and Dobrogosz, 1990) ทำให้โครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนในเซลล์เปลี่ยนไปจนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ปกติ นอกจากนี้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ยังสามารถรวมตัวกับสารประกอบอื่นเกิดเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นได้ เช่น ในน้ำนมดิบ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะรวมตัวกับไธโอไซนาไนต์ (thiocyanite; SCN^-) โดยเอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) เกิดเป็นไฮโปไธโอไซยาไนต์ (hypothiocyanite; $OSCN^-$) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นได้ (Banks *et al.*, 1986)

$$SCN^- + H_2O_2 \xrightarrow{\text{lactoperoxidase}} OSCN^- + H_2O$$

โครงสร้างเมมเบรนของแบคทีเรียจะถูกทำลายหรือมีการเปลี่ยนแปลงได้ เมื่อทำปฏิกิริยาเป็นไฮโปไธโอไซยาไนต์ (Kamau *et al.*, 1990) โดย Ocana *et al.* (1999) ได้พบว่า *Lactobacillus crispatus* F117 ที่แยกได้จากระบบสืบพันธุ์เพศหญิงสามารถสร้างไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในระดับ สูง ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้

3. คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide; CO_2)

ส่วนใหญ่คาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดจากกระบวนการหมักของน้ำตาลเฮกโซสให้เป็นกรดแลคติกแบบ heterofermentative fermentation นอกจากนี้ วิถีเมตาบอลิซึมอื่น ๆ สามารถสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ได้ระหว่างกระบวนการหมัก คาร์บอนไดออกไซด์จะไปยับยั้งระบบเอนไซม์ของกระบวนการดีคาร์บอกซิลเลชั่น (decarboxylation) (King and Nagel, 1975) และมีการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นไขมัน เป็นสาเหตุให้คุณสมบัติในการซึมผ่านของสารเสียไป (Lindgren and Dobrogosz, 1990) คาร์บอนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้นสูง ๆ สามารถป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดได้

4. ไดอะเซทิล (Diacetyl)

ไดอะเซทิลสังเคราะห์ขึ้นจากไพรูเวตที่เป็นสารตัวกลาง (intermediate) แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างไดอะซิทิล ได้แก่ *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus และ Streptococcus* (Jay, 1982) ไดอะเซทิลเป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก และมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วย สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ยีสต์ และรา ได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ กลไกการยับยั้งของไดอะเซติลคาดว่า เกิดจากการทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่ยึดจับตรงตำแหน่งกรดอะมิโนอาร์จีนีน ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีน หรือเอนไซม์ (Ouwehand, 1998) Kang and Fung (1999) ได้ศึกษาพบว่าไดอะซิติลที่ความเข้มข้น 300 ppm มีผลในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ ที่ก่อโรค คือ *E. coli* 0157 : H7 และ *Salmonella typhimurium* ในระหว่างการหมักเนื้อได้ ไดอะเซทิล ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย (GRAS) สามารถใช้เป็นสารกันบูดในอาหาร แต่ก็มีข้อจำกัดคือ ต้องใช้ปริมาณมากจึงจะมีผลในการถนอมอาหาร และเนื่องจากมีกลิ่นที่รุนแรงจึงทำให้สามารถใช้ในอาหารได้เพียงบางชนิด

5. รูทีริน (Reuterin)

รูทีรินเป็นสารที่ไม่ใช่โปรตีน น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายน้ำได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง สร้างจากแบคทีเรียพวก *Lactobacillus reuteri* รูทีรินสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ยีสต์ รา โปรโตซัว และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* และ *Trypanosoma* ดังนั้น จึงอาจใช้รูทีรินในการถนอมอาหารคนและอาหารสัตว์ โดยช่วยลดจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและที่ทำให้อาหารเสีย (Ouwehand, 1998)

6. แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

คำจำกัดความของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบประเภทโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ที่ผลิตจากแบคทีเรียหลายชนิดทั้งแกรมลบและแกรมบวก โดยแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันหรือกลุ่มใกล้เคียงได้ (Klaenhammer, 1988) แบคเทอริโอซินบางชนิดสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียบางชนิดได้ นอกจากนี้ ยังมีคำอธิบายคำจำกัดความของแบคเทอริโอซินเพิ่มเติมว่า แบคเทอริโอซินผลิตโดยแบคทีเรียหลาก หลายชนิด จากกลุ่มยีน heterogenous ของสารต้านทานจุลชีพ ที่มีกลไกการผลิต กิจกรรมการยับยั้ง มวลโมเลกุลโปรตีน คุณสมบัติทางชีวเคมี และพันธุกรรมที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียชนิดนั้น ๆ (Klaenhammer,

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

1993) แบคเทอริโอซินที่มีความสำคัญในการนำมาใช้เพื่อถนอมอาหารและใช้ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหาร ได้แก่ nisin, acidophilin, bulgarican และ lacticins เป็นต้น (Nettles and Barefoot, 1993) ซึ่งปัจจุบันมีแบคเทอริโอซินเพียงชนิดเดียวเท่านั้นคือ nisin ที่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย (Generally Recognized as Safe ; GRAS) และสามารถนำเอาไปประยุกต์ใช้เป็นสารถนอมอาหารในระดับอุตสาหกรรมได้ (Delvels-Broughton *et al.*, 1992)

ระบบการตั้งชื่อของแบคเทอริโอซิน

การตั้งชื่อของแบคเทอริโอซินที่ผ่านมายังไม่มีแบบแผนที่แน่นอน โดยเริ่มแรกมีพื้นฐานการตั้งชื่อตามชื่อจีนัส และเวลาต่อมาได้ตั้งชื่อตามชื่อสปีชีส์ของสายพันธุ์ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ชนิดนั้น ๆ หรืออาจมีทั้งชื่อตามจีนัสและสปีชีส์ก็ได้ ตัวอย่างการตั้งชื่อตามชื่อจีนัส ได้แก่ แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Enterococcus faecium* ตั้งชื่อเป็น enterocin A (Aymerich *et al.*, 1996) แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus sake* ตั้งชื่อเป็น lactocin S (Mortved *et al.*, 1991) และ แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Leuconostoc gelidum* ตั้งชื่อเป็น leucocin A-UAL 187 (Hastings *et al.*, 1991) เป็นต้น ตัวอย่างการตั้งชื่อตามชื่อสปีชีส์ ได้แก่ แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus helveticus* ตั้งชื่อเป็น helveticin J (Joerger and Klaenhammer, 1986) แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus acidophilus* ตั้งชื่อเป็น acidocin B (Leer *et al.*, 1995) และแบคเทอริโอซินที่ผลิต *Staphylococcus epidermidis* โดยตั้งชื่อเป็น epidermin (Allgaier *et al.*, 1986) เป็นต้น ในบางครั้งการเขียนชื่อแบคเทอริโอซินอาจมีโดยการเติม " e " ท้ายชื่อแบคเทอริโอซิน เช่น staphylococcine (Fredericq, 1946), listeriocine (Tubylewicz, 1963) และ corycine (Krylova, 1969)

การจำแนกชนิดของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบโปรตีนที่สังเคราะห์ในไรโบโซมของแบคทีเรีย มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกัน คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินจะพิจารณาจาก ขนาด ความคงตัว การดัดแปลงหลังผ่านการแปลรหัสทางพันธุกรรม และกลไกการทำงาน ซึ่งสามารถแบ่งแบคเทอริโอซินตามคุณสมบัติและโครงสร้างพื้นฐานออกเป็น 4 กลุ่มด้วยกันดังนี้ (Klaenhammer, 1993 ; Nes *et al.*, 1996)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 22 มิ.ย. 2555
เลขทะเบียน 246117
เลขเรียกหนังสือ

1. Class I : Lantibiotic

เป็นเปปไทด์ขนาดเล็กกว่า 5 kDa ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีการดัดแปลงหลังจากการแปลรหัสพันธุกรรม (post translational) ก่อนที่จะมีการส่งออกมานอกเซลล์ ซึ่งมีลักษณะแตกต่างออกไป เช่น lantionine, α-methyllanthionine, dehydroalanine, และ dehydrobutyrine เป็นต้น ซึ่งชื่อ lantionine นี้ได้นำไปใช้ในการตั้งชื่อ lantibiotics ซึ่งเป็นชื่อย่อ lantionine ที่ประกอบด้วยสายเปปไทด์ของยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ถึงแม้ว่า lantibiotics จะมีความสัมพันธ์กับกลุ่มของยาปฏิชีวนะ เช่น กรามิซิดิน (gramicidin) หรือ วาลิโนมัยซิน (valinomycin) แต่มีกระบวนการการสังเคราะห์ไรโบโซมที่ชัดเจน ดังนั้น จึงจัด lantibiotics อยู่ในกลุ่มแบคเทอริโอซิน ซึ่งกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีและกิจกรรมการต่อต้านจุลินทรีย์คือ type A และ type B โดย lantibiotics ชนิด type A เป็นเปปไทด์สายยาวมีประจุบวก ซึ่งจะทำให้เกิดรูรั่วเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมายได้ ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินชนิดนี้ เช่น nisin, lacticin 481 และอื่น ๆ เป็นต้น ส่วน type B เป็นเปปไทด์ที่มีลักษณะเป็นทรงกลมมีประจุเป็นลบหรือไม่มีประจุเลย แบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่จำเพาะเจาะจงของจุลินทรีย์เป้าหมายได้ เช่น mersacidin, ancovenin, cinnamycin และอื่น ๆ เป็นต้น (Chen and Hoover, 2003)

2. Class II : small non – lantibiotic

เป็นเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 10 kDa สายของเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิด non-lanthionine มีความเสถียรต่อความร้อน โดยแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้มีจำนวนและมีความหลากหลายมากที่สุด ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย (Klaenhammer, 1993) คือ Class IIa ประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีลักษณะเหมือนกับ pediocin ในสายในสายเปปไทด์ที่ปลาย N มีลำดับกรดอะมิโนเป็น Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับสนใจมากเนื่องจากสามารถยับยั้งกิจกรรมของ *Listeria* ได้ เช่น pediocin PA1/AcH, enterocin A และอื่น ๆ เป็นต้น (Larsen *et al.*,1993) Class IIb ประกอบด้วยแบคเทอริโอซินที่ต้องการเปปไทด์ 2 ชนิดที่แตกต่างกัน สำหรับใช้ในกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน เช่น lactococcin G และ lactacin F และ Class IIc ประกอบด้วยเปปไทด์หลากหลายชนิดที่แตกต่างจาก Class IIa และ Class IIb รวมถึง sec-dependent ที่ขับออกมา เช่น acidocin B และ divergicin A เป็นต้น

3. Class III : large heat-labile proteins

เป็นเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่มากกว่า 30 kDa ซึ่งไม่เสถียรต่อความร้อน แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจในการศึกษาน้อยมาก เนื่องจากไม่ทราบกลไกการทำงานที่แน่ชัด ตัวอย่างแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ ได้แก่ acidophilucin A, caseicin 80, helvitcin J และ lacticin A เป็นต้น (Chen and Hoover, 2003) นอกจากนี้ อาจจะรวมถึงเอนไซม์ที่มีลักษณะทางกายภาพคล้ายกับแบคเทอริโอซินอีกด้วย

4. Class IV : complex bacteriocin

เป็นกลุ่มของแบคเทอริโอซินที่มีโครงสร้างซับซ้อน ต้องการคาร์โบไฮเดรตหรือไขมันครึ่งหนึ่งสำหรับกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน แบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ไม่ได้ถูกจำแนกในระดับทางชีวเคมีอย่างเพียงพอ ซึ่งยังต้องการข้อมูลเพิ่มเติมในการอธิบายความจำกัดความของกลุ่มนี้ ตัวอย่างแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ ได้แก่ lactocin 27, leuconocin และ pediocin AcH เป็นต้น (Klaenhammer, 1993)

แหล่งของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบประเภทโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ที่ผลิตจากแบคทีเรียหลายชนิดทั้งแกรมลบและแกรมบวก โดยแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันหรือกลุ่มใกล้เคียงได้ (Klaenhammer, 1988) ปัจจุบันแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยและมีศักยภาพเป็นสารถนอมอาหารตามธรรมชาตินอกจากนี้แล้วยังช่วยส่งเสริมสุขภาพโดยมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกได้อีกด้วย (Montville and Winkowskin, 1997) แบคเทอริโอซินส่วนใหญ่แยกมาจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นเชื้อต้นหรือปนเปื้อนในอาหารหลากหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อ ผัก และนม เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารถนอมอาหาร ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติก ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน ได้แก่ pediococci (pediocins), lactobacilli (lactocin, plantocin, sakacin , lactocin, reutericin, brevicin, caseicinc และ gasseridin), enterococci (enterococcin), carnobacterium (carnocin), leuconostocs (mesenterocins) และ lactococci (nisin, displococcin, lactostrepcin, lactococcin) (Kim, 1993; Klaenhammer, 1988; Brock *et al.*, 1963) เป็นต้น

การสังเคราะห์แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินเป็นสารประเภทโปรตีนที่สังเคราะห์ในไรโบโซมของแบคทีเรีย การผลิตแบคเทอริโอซินถูกควบคุมโดยกลุ่มยีนที่อยู่ร่วมกัน และควบคุมร่วมกันเป็นลักษณะของโอเปอรอน (operon) โอเปอรอนสำหรับผลิตแบคเทอริโอซินชนิด Lantibiotic จะประกอบด้วยยีนคู่เหมือน (homologous) ที่ถูกสร้างเป็นกลุ่มยีนหลาย ๆ ยีน (Cleveland *et al.*, 2001) ลักษณะดังกล่าวส่วนใหญ่เป็นแบคเทอริโอซินที่อยู่ใน Class Ia และจากการศึกษาเมื่อเร็ว ๆ นี้ พบว่า กลุ่มยีนที่อยู่ร่วมกันที่มีความสมบูรณ์อยู่ใน Class Ib คือ mersadicin (Altena *et al.*, 2000) กลุ่มยีนที่สังเคราะห์แบคเทอริโอซินอาจตั้งอยู่บนโครโมโซม เช่น subtilin และ mersacidin หรืออาจตั้งอยู่บนพลาสมิด เช่น divergicin A และ sakacin A หรือบางชนิดอาจตั้งอยู่บนทรานโพซอน เช่น nisin และ lacticin 481 ซึ่งกลุ่มยีนจะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน และจะมีการดัดแปลงโครงสร้างอยู่ในรูปแบบที่แอคตีฟ (active form) ก่อนที่จะมีการส่งออกมานอกเซลล์ (Klein *et al.*, 1992) สำหรับแบคเทอริโอซินในกลุ่ม non-lantibiotic เช่น pediocin และ sakacin มียีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แบคเทอริโอซินที่มีลักษณะเช่นเดียวกับแบคเทอริโอซินชนิด lantibiotic แต่ไม่มีการดัดแปลงโครงสร้างโปรตีนก่อนส่งออกมานอกเซลล์ จากการศึกษายีนของ plantaricin พบว่า รหัสยีนเป็นมัลติแบคเทอริโอซินร่วมกับการขนส่งและระบบการบังคับ อย่างไรก็ตามแบคเทอริโอซินมีระบบคุ้มกันตัวเอง (Diep *et al.*, 1996)

กิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซิน จัดเป็นสารประกอบเปปไทด์ ที่สามารถซึมผ่านเยื่อของเซลล์จุลินทรีย์เป้าหมายได้ ทำให้เกิดรูรั่วของเยื่อเซลล์ และเกิดการรั่วไหลขององค์ประกอบเซลล์ติดตามมา จึงทำให้สามารถยับยั้งการเจริญหรือเกิดการตายของจุลินทรีย์เป้าหมายได้ ซึ่งการเกิดอันตรกิริยาระหว่างแบคเทอริโอซินกับเยื่อเซลล์มีหลายขั้นตอน ก่อให้เกิดสารคอมแพล็กที่เป็นสาเหตุของสภาพการณ์ดังกล่าวได้ (สาโรจน์, 2547) กลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินได้สร้างภาวะที่ไม่สมดุลของไอออนให้เกิดขึ้นในเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย ซึ่งทำให้เซลล์ต้องสูญเสียสมดุลศักย์ ไฟฟ้าและเกรเดียนต์ความเป็นกรดด่างไป โดยแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดจะให้ผลกระทบโดยตรงต่อความต่างศักย์และ/หรือเกรเดียนต์พีเอช ต่างกัน ทำให้กิจกรรมการยับยั้งเซลล์จุลินทรีย์เป้าหมายแตกต่าง เช่น nisin มีกิจกรรมยับยั้งแบบกว้าง คือสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด และยับยั้งการงอกของสปอร์ *Bacillus* spp. และ *Clostridium* spp. ในขณะที่ lactococcin A มีกิจกรรมยับยั้งแบบแคบ คือสามารถยับยั้งกลุ่มแบคทีเรีย lactococcal เท่านั้น (Grooss and Morell, 1971) ดังนั้น แบคเทอริโอซินจึงเป็นสารที่มีความสามารถในยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง

การผลิตแบคเทอริโอซิน (Production of bacterocins)

การผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแต่ละชนิด เพื่อให้ได้ผลผลิตเพิ่มมากขึ้น มักมีปัจจัยที่สำคัญหลายชนิดที่เกี่ยวข้องในการผลิตแบคเทอริโอซิน ได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย (Kim *et al.*, 2006) แบคทีเรียหลายชนิดที่ไม่ปรากฏปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซินอย่างชัดเจน จึงมีความจำเป็นต้องทำการศึกษาทดลองหาปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสม ในการช่วยเพิ่มผลผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย ได้แก่

1. ส่วนประกอบของอาหารในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

แบคทีเรียต้องการสารอาหารเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์และผลิตสารบางชนิด ดังนั้น อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียจึงมีความสำคัญมาก แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความต้องการสารอาหารแตกต่างกัน ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ และวิตามิน (Li *et al.*, 2002) ดังนั้น ในการผลิตสารแบคเทอริโอซินเพื่อให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ในการหาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแต่ละชนิด ตัวอย่างรายงานผลของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน เช่น การผลิตแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *S. mutans* โดยทำการเติม yeast extract เข้มข้นเท่ากับ 2.0 % (w/v) เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนลงไปในอาหารเหลวสูตร trypticase พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตแบคเทอริโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มมากขึ้น (Rogers, 1972) เช่นเดียวกับการผลิต microcin GO5 จากแบคทีเรีย *Micococcus* sp. GO5 โดยใช้อาหารเหลวสูตร MRS ที่มีส่วนประกอบคือ sucrose เข้มข้น 2.0 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน, tryptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) ร่วมกับ yeast extract เข้มข้นเท่ากับ 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน, K_2HPO_4 เข้มข้น 20-50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งฟอสเฟตอนินทรีย์ และ $MgSO_47H_2O$ เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งแมกนีเซียมอนินทรีย์ พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตแบคเทอริโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้น 16 เท่า มื่อเทียบกับการใช้อาหารเหลวสูตร MRS ปกติ นอกจากนี้ ยังมีรายงานเกี่ยวกับการผลิต butyricin 7423 ในอาหารสูตรกึ่งดัดแปลง ผลผลิตเพิ่มขึ้นจะอยู่กับจำนวนเคซีนที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Clarke *et al.*, 1975)

2. สภาวะในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

การเปลี่ยนแปลงสภาวะในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย เช่น อุณหภูมิ เวลา การเติมอากาศ และพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีผลต่อการผลผลิตและกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียมักจะเป็นอุณหภูมิเดียวกับอุณหภูมิ ที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิสูงมาก ๆ อาจจะทำให้ความร้อนไปทำลายแบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้น และบางครั้งอาจจะทำให้เสียสภาพไม่สามารถคืนสู่สภาพเดิมได้ (Dajani and

Taube, 1974) แต่จากการรายงานที่ผ่านมาการสูญเสียกิจกรรมการยับยั้ง อันเนื่องจากพันธุกรรมของการผลิตแบคเทอริโอซินสายพันธ์นั้น ๆ ส่วนปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตแบคเทอริโอซินที่เห็นได้ชัดเจน คือ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีความสำคัญมากต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย เนื่องจากมีผลต่อการรวมตัวหรือการดูดซึมของแบคเทอริโอซินกลับเข้าไปในเซลล์ และการย่อยสลายของแบคเทอริโอซินโดยเอนไซม์กลุ่มโปรตีเอส (Parente *et al.*,1994) นอกจากนี้ ระยะเวลาในแต่ละช่วงการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย จะมีการผลิตแบคเทอริโอซินออกมาแตกต่างกัน ดังนั้น ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย เพื่อผลิตแบคเทอริโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด นับว่าเป็นปัจจัยสำคัญ Schlegel and Slade (1973) ได้มีการศึกษาผลผลิตของ streptococcin STH พบว่า ผลผลิตสูงสุดอยู่ในช่วง exponential ของการเจริญของแบคทีเรีย หลังจากนั้นผลผลิตค่อย ๆ ลดลงก่อนเข้าสู่ช่วง staionary ซึ่งแตกต่างกับ streptococcin AFF22 ที่มีการเริ่มผลิตในช่วงปลายของ logarithmic และจะค่อย ๆ ลดลงอย่างช้า ๆ ในช่วง prolonged ของการเพาะเลี้ยง ในทำนองเดียวกันของผลผลิต staphylococcin C55 เริ่มในช่วง logarithmic จนถึงช่วงที่สูงสุดใช้เวลาบ่มประมาณ 24-48 ชั่วโมง ต่อมาผลผลิตจะค่อย ๆ ลดลง (Dajani and Wannamak, 1969)

การทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์

การผลิตแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ดังนั้น แบคทีเรียจะผลิตแบคเทอริโอซินปล่อยออกมาจากเซลล์ ซึ่งจะละลายปนอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อหรือเซลล์แบคทีเรีย สำหรับการนำเอาแบคเทอริโอซินไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำให้แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์เพื่อความเหมาะสมในการใช้ประโยชน์ในด้านนั้นๆ ซึ่งการทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์มีหลายวิธีด้วยกัน วิธีที่นิยมส่วนใหญ่ขั้นตอนแรกมักจะทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อทำให้แบคเทอริโอซินมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น จากนั้นนำแบคเทอริโอซินที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ cation exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography และ Reverse-phase high performance liguid chromatography (Nes *et al.*, 1996) ซึ่งการเลือกวิธีการทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ด้วย

การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินในอาหาร

ผู้บริโภคมีความวิตกกังวลเกี่ยวกับอันตราย ที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพร่างกาย เนื่องมาจากในปัจจุบัน มีการเติมสารเคมีลงไปในอาหารเพิ่มมากขึ้น เพื่อใช้ในการถนอมอาหาร เช่น ไนเตรท โพแทสเซียมโซเบท และกรดอินทรีย์อื่น ๆ ซึ่งสารเหล่านี้เมื่อสะสมอยู่ในร่างกายในปริมาณมาก ๆ จะส่งผลเสียต่อร่างกาย ดังนั้น ผู้บริโภคเริ่มมีความสนใจการถนอมอาหารที่มาจากสารธรรมชาติเพื่อ

ทดแทนสารเคมี ดังนั้น จึงมีการกระตุ้นให้มีการศึกษาวิจัยสารธรรมชาติที่ผลิตโดยเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ โดยเฉพาะแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติก หรือสารเมตาโบไลต์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย กรดแลคติกมีความปลอดภัย และได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคโดยจะมีความได้เปรียบในด้านของความเป็นธรรมชาติ และนอกจากนั้นยังช่วยส่งเสริมคุณภาพโดยมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกได้อีกด้วย (Montville and Winkowskin, 1997)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้จากระบบทางเดินอาหาร

Booth และ คณะ (1977) คัดแยกแบคทีเรีย จีนัส *Bacteroides* ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกจากอุจจาระมนุษย์ พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท T1-1 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินสูงสุด เมื่อนำไปจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธี RNA homology พบว่า เป็นแบคทีเรีย *B. thetaiotaomicron* แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อสายพันธุ์นี้ มีความเสถียรในช่วงพีเอชที่กว้างคือ 1.0-12.0 และสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ถูกทำให้เสียสภาพโดยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนบางชนิด คือ trypsin และ pronase และแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. thetaiotaomicron* มีมวลโมเลกุลโปรตีนประมาณ 30 KDa ซึ่งแบคทีเรียเริ่มผลิตแบคเทอริโอซินในช่วง logarithmic phase ของการเจริญของแบคทีเรีย และจะหยุดผลิตแบคเทอริโอซินในช่วง stationary ของการเจริญของแบคทีเรีย ต่อมาในปี ค.ศ. 2000 Robredo and Torres ได้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากระบบทางเดินอาหารสัตว์ หมู สุนัข แมว จำนวน 29 ไอโซเลท มาทดสอบกับเชื้อทดสอบ ซึ่งที่เป็นแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกมาจากมูลสัตว์ จำนวน 52 ชนิด พบว่า เป็นแบคทีเรีย *Lb. salivaius* ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ จำนวน 11 ไอโซเลทจากทั้งหมด 18 ไอโซเลท ซึ่งแยกจากมูลวัว คิดเป็น 61 เปอร์เซ็นต์ ของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ไม่สามารถผลิต แบคเทอริโอซิน และ พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท X13 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบดีที่สุด คือ สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบจำนวน 11 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus, S .epidermidi, Listeria murrayi, Lb. salivarius, Lb. fermentum, Lb. paracasei, Pediococcus acidilactici* และ *P. pentosaceus* ดังนั้น แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. salivarius* ไอโซเลท X13 เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารถนอมอาหาร ในปี ค.ศ. 2004 Arici และ คณะ ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก จีนัส *Lactobacillus* ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้จากอุจจาระเด็กทั้งหมด 21 ไอโซเลท ซึ่งเป็นแบคทีเรีย *Lb. rhamnosus* จำนวน 7 ไอโซเลท แบคทีเรีย *Lb. paracasei* spp. จำนวน 4 ไอโซเลท *Lb. fermentum* จำนวน 4 ไอโซเลท *Lb. buchneri* จำนวน 2 ไอโซเลท และ *Lb. brevis* จำนวน 1 ไอโซเลท และ *Lactobacillus* spp. จำนวน 2 ไอโซเลท เพื่อทดสอบการผลิตกรด การทนต่อยาปฏิชีวนะ

การผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และหาค่ากิจกรรมยับยั้งต่อเชื้อทดสอบที่ก่อโรคบางชนิด โดยวิธี well diffusion assay พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตแบคเทอริโอซินยับยั้งเชื้อทดสอบดังนี้ *B. cereus* FMC19, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 2392 และ *Y. enterocolitica* ATCC 1501 แบคทีเรียบางไอโซเลทที่ทำการคัดแยกผลิตแบคเทอริโอซินที่มีค่ากิจกรรมยับยั้งแบบกว้าง ซึ่งมีศักยภาพเป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตอาหารหมัก และเป็นสายพันธุ์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกได้อีกด้วย ต่อมาใน ค.ศ. 2006 Pilasombut และ คณะ ได้ทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติก จีนัส *Lactobacillus* ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้จากลำไส้ไก่ในฟาร์มของประเทศไทย โดยใช้วิธีทดสอบหากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินด้วยวิธี spot-on-lawn พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติก *Lb. salivaius* K7 ที่จำแนกโดยใช้วิธีทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและหาลำดับเบส DNA ในส่วนของยีน 16S rDNA ซึ่งแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. salivaius* K7 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ แบคทีเรีย *B. coagulans*, *Leu. mesenterides* และ *Lb. sakei* เป็นต้น แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ แบคเทอริโอซินชนิดนี้ เสียสภาพกิจกรรมการยับยั้งโดยเอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยโปรตีน เช่น trypsin, proteinase K และ pepsin เป็นต้น มีความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และมีความเสถียรต่อพีเอชที่กว้างคือ 3.0-10.0 มีมวลโมเลกุลโปรตีนประมาณ 4331.70 Da โดยใช้เทคนิค ESI mass spectrometry และต่อมาใน ค.ศ. 2007 Strompfova และ Laukova ทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก จีนัส *Enterococci* ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้จากระบบทางเดินอาหารไก่ จำนวน 17 ไอโซเลท มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ 20 ชนิด โดยวิธี agar diffusion พบว่า ไอโซเลท EF55, EF3S1, EF2S3, EF2S1 และ EFH31 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ และจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทโดยวิธี PCR พบว่า เป็นแบคทีเรีย *E. faecium* และพบว่า แบคทีเรียไอโซเลท EF55 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินสูงสุดเท่ากับ 200 AU/ml และมีฤทธิ์ยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก นอกจากนี้ แบคเทอริโอซินยังเสียสภาพโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ protease, trypsin, alpha-chymotrypsin และ pepsin นอกจากนี้ มีความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20,10 และ10 นาที ตามลำดับ และมีความคงทนต่อพีเอชแบบกว้าง คือ พีเอช 3.0-9.0 เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท EF55 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 5 ชนิด คือ อาหารสูตร MRS อาหารสูตร BHI อาหารสูตร TSY อาหารสูตร TH และอาหารสูตร NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารสูตร MRS ที่มีพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.0-7.0 ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด และแบคเทอริโอซินชนิดนี้มีมวลโมเลกุลโปรตีนประมาณ 10 KDa

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

กรอบแนวความคิด

เนื่องจากในปัจจุบันมีการใช้สารปฏิชีวนะผสมในอาหารสัตว์เพื่อเร่งการเจริญเติบโต และการเติมสารเคมีลงไปในอาหาร เพื่อเป็นสารถนอมอาหารเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสารเหล่านี้เมื่อสะสมอยู่ในร่างกายปริมาณมาก ๆ จะเป็นอันตรายต่อร่างกาย ผู้บริโภคมีความวิตกกังวลเกี่ยวกับอันตรายที่อาจส่งผลเสียต่อสุขภาพ ดังนั้น มีการศึกษาหาสารอื่นมาทดแทนสารปฏิชีวนะและสารเคมีเพิ่มมากขึ้น สารธรรมชาติที่ผลิตโดยเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติกได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากเชื้อกลุ่มนี้มีความสำคัญทั้งในอาหารคนและอาหารสัตว์ ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกที่มีประโยชน์มากในอุตสาหกรรมหลาย ๆ ชนิด และยังสามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ หรือทำลายแบคทีเรียในกลุ่มแลคติกเอง หรือแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ และเมื่ออยู่ในลำไส้สัตว์ช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของสัตว์ได้อีกด้วย นอกจากนี้ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ทำให้มนุษย์จำเป็นต้องหายาต้านทานจุลชีพใหม่ๆ เพื่อทดแทนยาต้านทานจุลชีพชนิดเดิม แบคเทอริโอซินซึ่งเป็น antimicrobial protein จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นับว่ามีศักยภาพสูงในการผลิตสารต้านทานจุลชีพชนิดใหม่ นอกเหนือจากความได้เปรียบทางด้านความปลอดภัยเนื่องจากความเป็นธรรมชาติแล้ว การพัฒนาการผลิตในระบบอุตสาหกรรมโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพก็สามารถทำได้โดยง่ายซึ่งนักวิจัยส่วนใหญ่ศึกษาการผลิตแบคเทอริโอซิจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารและผลิตภัณฑ์นม เพื่อมุ่งเน้นนำไปเป็นสารถนอมอาหาร ประกอบกับการศึกษาการผลิตแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกในระบบทางเดินอาหารยังมีน้อย ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาแบคเทอริโอซินจากแหล่งใหม่ ๆ คือ ระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ เพื่อสามารถนำไปพัฒนาใช้เป็นโปรไบโอติกในอาหารคนและอาหารสัตว์ ซึ่งจะช่วยส่งเสริมสุขภาพสัตว์และลดปัญหาการเกิดโรคติดเชื้อในสัตว์เศรษฐกิจได้