บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แลคติคแอสิดแบคทีเรีย

แลคติคแอสิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria ; LAB) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive bacteria) ที่จัดอยู่ใน Family Lactobacillaceae มีรูปร่างหลายแบบขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียบางชนิดอาจมีรูปร่างกลม (cocci) บางชนิดอาจมีรูปร่างแท่ง (rod) ไม่สร้างสปอร์ (non spore forming) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) เจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มี growth factor และวิตามินหลายชนิด เช่น ไบโอติน (biotin) ไรโบฟลาวิน (riboflavin) และต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส (Mn) แมกนีเซียม (Mg) ฟอสฟอรัส (P) (Tittsler *et al.*, 1952) ต้องการอากาศในการเจริญเพียงเล็กน้อย (microaerophile) แต่บางชนิดก็ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ (stricIty anaerobe) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากกระบวนการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจนจึงสามารถหมักน้ำตาลแล้วให้ผลผลิตหลักเป็นกรดแลคติค (lactic acid) แลคติคแอสิดแบคทีเรียเป็นเชื้อกลุ่มใหญ่ที่พบได้ในธรรมชาติสามารถแยกได้จากอาหารหมักดองทั่วไป เช่น ผักดอง ผลไม้ดอง หญ้าหมัก แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว โยเกิร์ต ผลิตภัณฑ์เนื้อต่างๆ นอกจากนี้ยังพบได้ในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร และลำไส้เล็กของมนุษย์และสัตว์ (Hammes *et al.*, 1991) กระบวนการหมักที่เกิดขึ้นจะแปรรูปทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่ที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัวทั้ง กลิ่น รสชาติ และเนื้อสัมผัส เช่น การเปลี่ยนจากนมให้กลายเป็นโยเกิร์ต เนย นมเปรี้ยว (Gonzalez *et al.*, 1994) อีกทั้งยังช่วยถนอมอาหารทำให้ยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาอาหารได้นานขึ้นโดยคุณค่าทางโภชนาการแทบจะไม่เสียไป

นอกจากนี้ยังมีการนำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียไปผลิตเป็นโปรไบโอติกซึ่งความหมายของโปรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่ดำรงชีวิตในระบบทางเดินอาหารและก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่แต่จุลินทรีย์เหล่านี้จะสามารถทำงานและสร้างประโยชน์แก่ร่างกายได้ก็ต่อเมื่อจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถรอดพ้นจากการทำลายของกรดที่กระเพาะอาหารและน้ำดีที่ลำไส้เล็กแล้วเคลื่อนไปถึงลำไส้เล็กส่วนล่างโดยที่ยังมีชีวิตอยู่ได้อย่างปลอดภัย

คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติก (Salminen *et al.*, 1996)

1. มีความทนทานต่อกรดในกระเพาะอาหารและน้ำดีในลำไส้เล็ก สามารถเคลื่อนผ่านไปจนถึงลำไส้เล็กส่วนล่างได้และมีจำนวนเซลล์มากพอที่จะสร้างประโยชน์ให้แก่ร่างกาย

2. เมื่อลงไปถึงลำไส้สามารถเกาะจับอยู่ที่เยื่อบุลำไส้ กลายเป็นตัวป้องกันอีกชั้นหนึ่งทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคไม่สามารถเกาะและฝังตัวที่เยื่อบุลำไส้เพื่อเข้าสู่ผนังลำไส้ได้

3. สามารถเจริญร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่นได้ (normal flora)

4. ช่วยให้ระบบขับถ่ายดีขึ้น

5. สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสในนมลดอาการท้องอืด ท้องเสีย ให้กับคนที่ดื่มนมไม่ได้

6. สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น กรดแลคติค รูเทอริน แบคเทอริโอซินหรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ตัวอย่างแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis* และ *Streptococcus thermophilus* (Semih *et al*., 2003)

2.1.1 ตัวอย่างอาหารที่พบเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย (สุรีย์รัตน์ เงินดวง, 2545)

2.1.1.1 แหนม

เป็นอาหารหมักประเภทเนื้อชนิดหนึ่งที่เป็นที่นิยมแพร่หลายในทุกภาคของประเทศ ทำโดยการนำเนื้อหมูบดละเอียดผสมกับหนังหมู เครื่องเทศต่างๆ เช่น เกลือ ดินประสิว กระเทียม ข้าวสุก พริกไทย และพริกขี้หนู นำส่วนผสมต่างๆ มาคลุกเคล้าให้เข้ากันห่อด้วยใบตองหรือพลาสติกให้แน่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 ถึง 4 วัน ก็สามารถนำมารับประทานได้ จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักได้แก่ *Pediococcus* และ *Lactobacillus* โดยช่วง 24 ชั่วโมงหลังการหมักจะพบจุลินทรีย์ที่สร้างกรดได้ดีและเจริญในสภาวะที่มีอากาศน้อย ได้แก่ *Pediococcus cerevisiae* และ *Pediococcus acidilactici* ต่อมาจะพบ *Lb. Plantarum* ในวันที่ 4 ของการหมักจะมีค่า pH ที่ต่ำกว่า 4.5 และมีกรดแลคติคสูงกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะทำให้จุลินทรีย์พวกที่ไม่ทนกรดตาย

2.1.1.2 ไส้กรอกเปรี้ยว

เป็นอาหารหมักประเภทเนื้อชนิดหนึ่งที่เป็นที่นิยมบริโภคทั่วไป ส่วนประกอบที่สำคัญของไส้กรอกเปรี้ยว ได้แก่ เนื้อหมูสด มันหมู หนังหมู มีการเติมข้าวสุกเพื่อเพิ่มสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตให้กับจุลินทรีย์และเป็นการลดต้นทุนการผลิต ใส่เกลือเพื่อยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์บางชนิดที่ทำให้อาหารเน่าเสียและยังช่วยเพิ่มกลิ่นรสให้ดียิ่งขึ้น นอกจากนั้นยังมีเครื่องเทศต่างๆ และมีการใส่ praque powder เพื่อให้เนื้อมีสีแดงและรักษาสีเนื้อให้คงอยู่ ปกติเนื้อจะมีไมโอโกลบิน (myoglobin) เมื่อถูกกับอากาศจะเปลี่ยนเป็น ออกซีไมโอโกลบิน

(oxymyoglobin) ที่มีสีแดง ถ้าถูกออกซิไดซ์ต่อไปจะได้เมทไมโอโกลบิน (metmyoglobin) ที่มีสีน้ำตาลคล้ำ แต่ถ้าเติม praque powder ที่มีไนเตรทและไนไตรท์จะทำให้เนื้อมีสีแดงเพราะทำให้เกิดไนตริกออกไซด์ (nitricoxide) ที่ไปรวมตัวกับไมโอโกลบินได้เป็นไนโตรโซไมโอโกลบิน (nitrosomyoglobin) ที่มีสีแดงไม่เปลี่ยนแปลง ปริมาณไนไตรท์ในอาหารกฎหมายกำหนดไม่ให้เกิน 200 ppm. ในรูปของเกลือโซเดียมหรือโปตัสเซียมไนไตรท์ เนื่องจากไนไตรท์ที่มีมากเกินจะรวมตัวกับเอมีน (amine) กลายเป็นไนโตรซามีน (nitrosamine) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ไส้ที่ใช้บรรจุมักจะใช้ไส้แท้ของหมูนำมาล้างให้สะอาดและขูดเมือกออกให้หมด จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักได้แก่ *Streptococcus* และ *Lactobacillus* ซึ่งจะผลิตกรดออกมาทำให้ pH ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น

2.1.1.3 โยเกิร์ต

เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักนมประกอบด้วยเชื้อที่สำคัญ 2 ชนิด คือ *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ชนิดเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ทนความร้อน (thermophilic lactic acid bacteria) สามารถเจริญที่ 40 ถึง 45 องศาเซลเซียส และเป็นการเจริญแบบ symbiosis โดย *S. Salivarius* subsp. *thermophilus* จะเจริญก่อนทำให้อากาศมีปริมาณลดลงพร้อมกับการสร้างกรดออกมากระตุ้นให้ *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* เจริญสร้างกรดและย่อยเคซีน ทำให้ได้กรดอะมิโนวาลีนที่จำเป็นในการเจริญ เมื่อค่า pH ลดลงจาก 6.4 เป็น 4.4 หลังการบ่ม จะทำให้น้ำตาลแลคโตสประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวทและเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติคในที่สุด แต่ไพรูเวทบางส่วนจะเปลี่ยนไปเป็นอะซิตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) และ ไดอะซิติล (diacetyl) ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นหอม วิธีการทำโยเกิร์ตมีขั้นตอนดังนี้ นำนมจืดใส่น้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ นมพร่องมันเนย 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มปริมาณ solid content ซึ่งจะทำให้ลักษณะตะกอนของโยเกิร์ตดีขึ้น นำมาปั่นให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 70 ถึง 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจนอุณหภูมิลดลงเหลือ 42 องศาเซลเซียส เติมหัวเชื้อลงไปประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 42 องศาเซลเซียส จนกว่าจะเกิดลักษณะข้นแข็งและมีรสเปรี้ยว

2.1.1.4 หน่อไม้ดองเปรี้ยว

กรรมวิธีการดอง คือ นำหน่อไม้มาตัดส่วนที่แข็งๆ ออกและล้างให้สะอาด หั่นให้เป็นชิ้นบางๆ นำน้ำเกลือ 2 เปอร์เซ็นต์ มาผสมบรรจุใส่ภาชนะ นำไปหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ถึง 4 สัปดาห์ บางครั้งอาจเติมน้ำซาวข้าวลงไปเพื่อทำให้กระบวนการหมักเกิดเร็วขึ้น หน่อไม้ดองที่นำมารับประทานจะมีกรดแลคติคประมาณ 0.9 ถึง 1.16 เปอร์เซ็นต์ จุลินทรีย์ที่พบใน

ระยะแรกจะเป็น *P. cerevisiae* และ *Lb. plantarum* ในระยะสุดท้ายจะพบ *Lactobacillus brevis* และ *Leuconostoc mesenteroides*

2.2 การจัดจำแนกชนิดของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

ปัจจุบันแลคติคแอสิดแบคทีเรียถูกจำแนกเป็น 12 สกุล ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา กระบวนการหมักน้ำตาล ความสามารถในการเจริญที่สภาวะต่างๆ ชนิดไอโซเมอร์ของกรดแลคติค รวมถึงข้อมูลด้านพันธุกรรม

2.2.1 *Streptococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 ถึง 1.2 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือเป็นคู่ ผลิตกรดแลคติคชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักจากกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส (homofermentative) ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ มีหลายสปีชีส์เป็นปรสิตในคนหรือสัตว์ บางสปีชีส์สามารถทำให้เกิดโรคได้ เจริญที่อุณหภูมิ 20 ถึง 41 องศาเซลเซียส มีโมเลกุล G+C ระหว่าง 34 ถึง 36 เปอร์เซ็นต์ (Hardie and Whiley, 1995)

2.2.2 *Vagococcus*

เป็นแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถเคลื่อนที่ได้เป็นบางสายพันธุ์ ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *V. fluvialis* ซึ่งเดิมอยู่ใน Streptococci กลุ่ม N และ *V. salmoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค (Stiles and Holzapfel, 1997)

2.2.3 *Lactococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ถึง 1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติคชนิด L(+) จากกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส มักใช้เป็นหัวเชื้อ (starter culture) ในผลิตภัณฑ์นม เจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *hordniae*, *Lc. garvieae*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis* และ *Lc. piscium* มีโมเลกุล G+C ระหว่าง 34 ถึง 43 เปอร์เซ็นต์ (Teuber, 1995)

2.2.4 *Enterococcus*

เซลล์มีรูปร่างไข่จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือโซ่สายสั้นๆ ผลิตกรดแลคติคชนิด L(+) จากกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสเท่านั้น ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญสามารถเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียม (pseudocatatalase) และก่อโรคได้ประกอบด้วย *Ent. faecalis*, *Ent. avium*, *Ent. gallinarum* และ *Ent. cecorum* มีโมเลกุล G+C ระหว่าง 37 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ (Devriese and Pot, 1995)

2.2.5 *Pediococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36 ถึง 1.43 ไมครอน แบ่งตัวลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกันโดยแบ่งตัวครั้งที่ 2 ในทิศด้านขวามือของครั้งแรกทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็น 4 เซลล์ติดกันคล้ายจัตุรัส (tetrad formation) ในสภาวะไม่มีอากาศจะผลิตกรดแลคติคชนิด DL และ L(+) จากกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส บางสปีชีส์ทำให้ไวน์และเบียร์เสีย ประกอบด้วย *P. acidilactici*, *P. damonosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus* และ *P. pentosaceus* (Stiles and Holzapfel, 1997)

2.2.6 *Tetragenococcus*

มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* เนื่องจากเดิมคือสปีชีส์ *P. halophilus* ซึ่งจัดจำแนกใหม่จากการเจริญในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับเบสบน 16S rRNA ใกล้เคียงกับสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* (Simpson and Taguchi, 1995)

2.2.7 *Aerococcus*

มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *A. viridans* และ *A. urinae* ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจาก *P. homari* และ *P. urinae-equi* ตามลำดับ โดย *A.viridans* ทำให้กุ้งมังกรลอบสเตอร์เกิดโรคและเกี่ยวกับการติดเชื้อในคน (Stiles and Holzapfel, 1997)

2.2.8 *Leuconostoc*

ลักษณะเซลล์จะขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกลูโคสเซลล์จะมีลักษณะยืดออกคล้ายกลุ่ม Lactobacilli แต่ในน้ำนมเซลล์จะมีลักษณะกลม การจัดเรียงตัวมักเป็นแบบเซลล์เดี่ยวอยู่เป็นคู่หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลาง ผลิตกรดแลคติคชนิด D(-), เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส (heterofermentative) จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. lactis*, *Leuc. gelidum*, *Leuc. carnosum*, *Leuc. pseudomesenteroides*, *Leuc. citrem*, *Leuc. argentinum* และ *Leuc. fallax* (Stiles and Holzapfel, 1997)

2.2.9 *Oenococcus*

มีเพียงสปีชีส์เดียวคือ *O. oeni* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Leuc. oenos* ด้วยคุณสมบัติการทนต่อกรดและให้เอทานอลในปริมาณที่สูง รวมทั้งข้อมูลพันธุกรรมจาก DNA:DNA hybridization และลำดับเบสของ 16S rRNA ที่ต่างจากสปีชีส์อื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่างชัดเจน (Dellaglio *et al.*, 1995)

2.2.10 ***Weissella***

ประกอบด้วย 7 สปีชีส์ ซึ่งมีลักษณะคล้าย *Leuconostoc* (*Leuconostoc*-like bacteria) ลักษณะรูปร่างเซลล์มีทั้งกลมและแท่ง มีสปีชีส์ซึ่งเดิมอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* คือ *Leuc. paramesenteroides* (*Weissella paramesenteroides*), *Lb. confuses* (*W. confuses*), *Lb. halotolerans* (*W. halotolerans*), *Lb. kandleri* (*W. kandleri*), *Lb. minor* (*W. minor*), *Lb. viridescens* (*W. viridescens*) และสปีชีส์ใหม่ที่แยกได้จากไส้กรอกหมัก คือ *W. hellenica* (Stiles and Holzapfel, 1997)

2.2.11 ***Lactobacillus***

เป็นแลคติคแอสิดแบคทีเรียกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ สมบัติทางชีวเคมี เนื่องจากความแตกต่างของโมเลกุล G+C ภายในสกุลสูงสุดคือ 32 ถึง 53 เปอร์เซ็นต์ (Axelsson, 1998) พบในแหล่งต่างๆ เช่น เยื่อเมือกของมนุษย์และสัตว์ พืช และน้ำทิ้ง เป็นต้น บางสปีชีส์สามารถก่อโรคติดเชื้อในมนุษย์ (Adam, 1999) ลักษณะรูปร่างเซลล์เป็นท่อนหรือทรงรี (coccobacilli) ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (Stiles and Holzapfel, 1997) คือ

1) Obligately homofermentative lactobacilli

หมักน้ำตาลแลคโตส (มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์) ให้เป็นกรดแลคติคโดยวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ผลิตเอนไซม์ 1, 6 biphosphate-aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทส และกลูโคเนทไม่ได้

2) Facultatively heterofermentative lactobacilli

หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลคติคผ่านวิถี EMP มีการผลิตเอนไซม์ทั้ง aldolase และ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทสได้

3) Obligately heterofermentative lactobacilli

หมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโทส ผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนทเป็น แลคเตท เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์

2.2.12 ***Carnobacterium***

เซลล์มีรูปร่างลักษณะเป็นท่อนตรงขนาดสั้นถึงปานกลางหรือเป็นท่อนเรียว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ถึง 0.7 ไมครอน ยาว 1.1 ถึง 3.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ มักไม่พบการเรียงแบบสายโซ่ ผลิตกรดแลคติคชนิด L(+) คาร์บอนไดออกไซด์ อะซีเตท และเอทานอลจากการหมักน้ำตาลเฮกโซส ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ คือ *C. divergens*, *C. piscicola*,

C. gallinarum, *C. mobile*, *C. funditum* และ *C. alterfunditum* มีโมเลกุล G+C ระหว่าง 31.6 ถึง 37.2 เปอร์เซ็นต์ (Schillinger and Holzapfel, 1995)

ตารางที่ 1 ลักษณะสำคัญเปรียบเทียบแลคติคแอสิดแบคทีเรียในสกุล (genus) ต่างๆ [a]

ลักษณะ	รูปร่างท่อน		รูปร่างกลม									
	Carno.	**Lb.**	**Aer.**	**Ent.**	**Vago.**	**Oenoc.**	**Pedioc.**	**Strepto.**	**Tetra.**	**Weissella** [b]	**Lc.**	**Leu.**
เซลล์ต่อกัน 4 เซลล์	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
ผลิต CO_2 จากกลูโคส	- [e]	±	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
เจริญที่ 10 °C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+	+	+
เจริญที่ 45 °C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-	-	-
เจริญที่ NaCl 6.5%	ND [f]	±	+	+	-	±	±	-	+	±	-	±
เจริญที่ NaCl 18%	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
เจริญที่ pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±	±	±
เจริญที่ pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
ชนิดกรดแลคติค [d]	L	D,L,DL [g]	L	L	L	D	D, DL [g]	L	L	D, DL [g]	L	D

หมายเหตุ [a] +, ใช่ -, ไม่ใช่, ±, ผลขึ้นกับสปีชีส์ ND, ไม่ระบุ

[b] Weissella บางสายพันธุ์มีรูปร่างท่อน [c] +, homofermentative -, heterofermentative

[d] ชนิดของกรดแลคติคที่ได้จากกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส [e] อาจผลิต CO_2 ปริมาณเล็กน้อย ขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ

[f] ไม่มีการระบุถึงการเจริญในอาหารที่มี NaCl 8% [g] ชนิดของกรดแลคติคแตกต่างกันตามสปีชีส์

ที่มา : Axeslsson (1998)

2.3 กระบวนการหมักกรดแลคติค (lactic acid fermentation)

2.3.1 Homofermentation

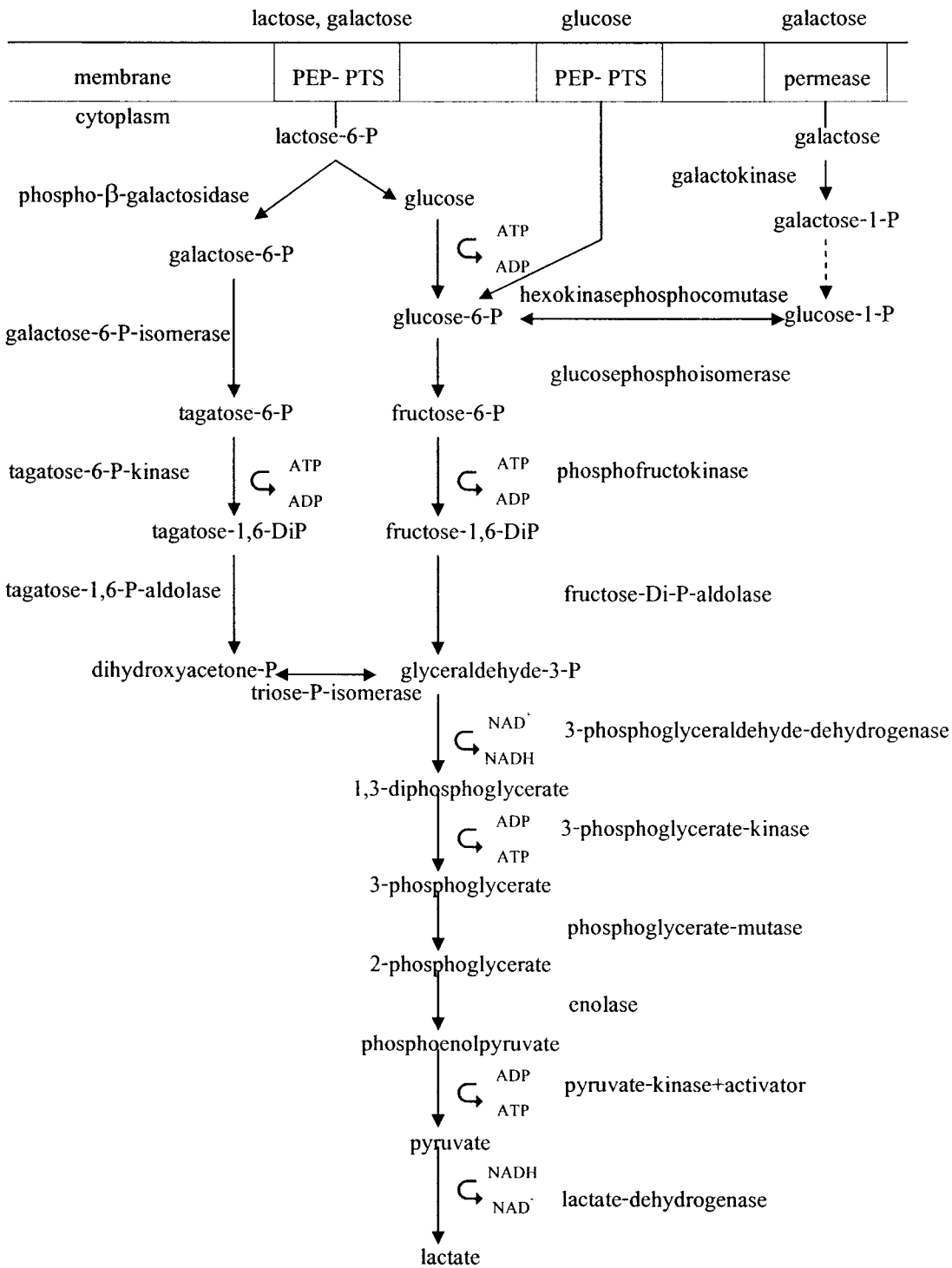
ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการส่วนใหญ่จะเป็นกรดแลคติคประมาณ 85 ถึง95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเกิดจากกลุ่มจุลินทรีย์พวก homofermentative lactic acid bacteria โดยจะเริ่มจากการนำน้ำตาลแลคโตสผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียโดยอาศัยเอนไซม์ phosphoenol-pyruvate-dependent phosphotransferase system (PEP-PTS) ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้น้ำตาลแลคโตสเกิดปฏิกริยาการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) อยู่ในรูปของ lactose-6-phosphate จากนั้นจะเปลี่ยนเป็น galactose-6-phosphate และกลูโคส ด้วยเอนไซม์ phospho-β-galactosidase ซึ่งกลูโคสก็จะผ่านเข้าสู่กระบวนการต่างๆของ Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMP pathway) จนกลายเป็น lactate ในขั้นตอนสุดท้ายที่เปลี่ยนมาจาก pyruvate โดยเอนไซม์ lactate dehydrogenase ส่วน galactose-6-phosphate จะเข้าสู่กระบวนการต่างๆในวิถี tagatose-6-phosphate ได้เป็น tagatose-1,6-diphosphate และเปลี่ยนเป็น dihydroxyacetone-phosphate ด้วยเอนไซม์ tagatose-1,6-diphosphate-aldolase จากนั้น dihydroxyacetone-phosphate จะเปลี่ยนเป็น glyceraldehyde-3-phosphate ด้วยเอนไซม์ triose phosphate isomerase ซึ่ง glyceraldehyde-3-phosphate เป็นสารตัวกลางในกระบวนการ EMP pathway ก็จะเปลี่ยนไปเป็น lactate

น้ำตาลกลูโคสสามารถเข้าสู่เซลล์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรียโดยอาศัยเอนไซม์ PEP-PTS ทำให้กลูโคสอยู่ในรูป glucose-6-phosphate ซึ่งจะเข้าสู่ EMP pathway และเปลี่ยนไปเป็น lactate ในที่สุด ส่วนน้ำตาลกาแลคโตสจะสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรียได้หลังจากที่มีการเติมหมู่ฟอสเฟตโดยเอนไซม์ galactokinase กลายเป็น galactose-1-phosphate จากนั้นจะเข้าสู่ Leloi pathway จนเป็น glucose-1-phosphate จากนั้นเอนไซม์ hexokinase phosphoglucomutase จะเปลี่ยน glucose-1-phosphate เป็น glucose-6-phosphate ซึ่งเป็นสารตัวกลางในกระบวนการ EMP pathway และสุดท้ายก็จะถูกเปลี่ยนไปเป็น lactate (ภาพที่ 1)

2.3.2 Heterofermentation

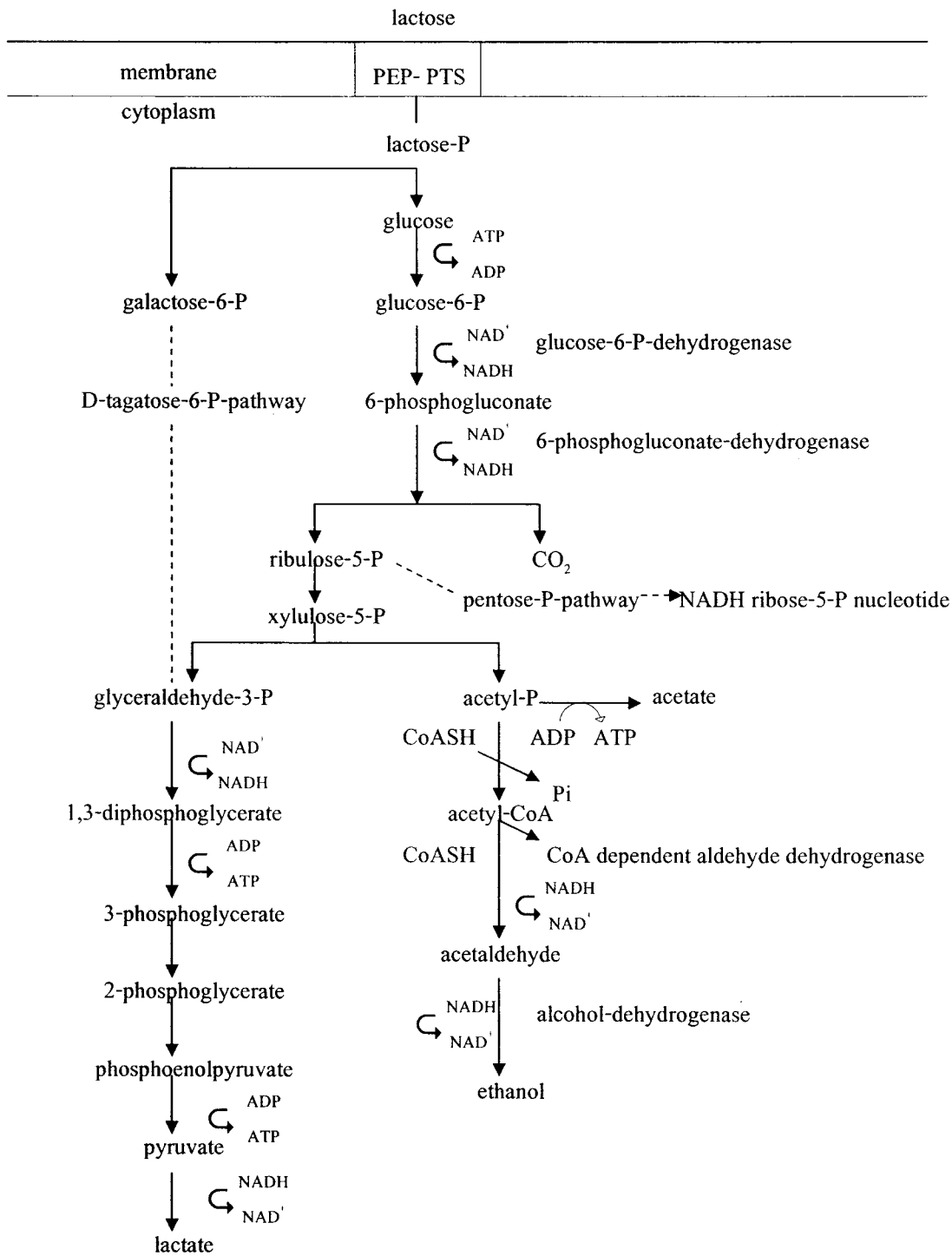
ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการส่วนใหญ่จะเป็นกรดแลคติคประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และจะได้ผลิตภัณฑ์อื่นร่วมด้วย ซึ่งเกิดจากกลุ่มจุลินทรีย์พวก heterofermentative lactic acid bacteria ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะไม่มีเอนไซม์ fructose diphosphate aldolase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกระบวนการ glycolysis จึงไม่สามารถเปลี่ยน fructose-1,6-diphosphate ไปเป็น glyceraldehyde-3-phosphate ได้ จึงต้องออกซิไดซ์ glucose-6-phosphate เป็น 6-phosphogluconate จากนั้นจึงเกิดปฏิกริยา decarboxylate ได้เป็น pentose-phosphate กับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่ง pentose-phosphate จะแตกตัวเป็น glyceraldehyde-3-phosphate และ acetyl-phosphate โดยเอนไซม์

phosphoketolase ซึ่ง glyceraldehyde-3-phosphate จะสามารถเปลี่ยนไปเป็น lactate ได้ ส่วน acetyl-phosphate จะเปลี่ยนไปเป็น acetaldehyde ด้วยเอนไซม์ CoA dependent aldehyde dehydrogenase สุดท้าย acetaldehyde จะเปลี่ยนไปเป็นเอทธานอลด้วยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase นอกจากนี้ แลคติคแอสิดแบคทีเรียกลุ่มนี้ยังมีการใช้กระบวนการต่างๆ ในการสร้างผลิตภัณฑ์อื่นๆ อีก เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกลีเซอรอล เป็นต้น (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 กระบวนการหมักของ homofermentative lactic acid bacteria

ที่มา : De Vuyst and Vandamme (1994)



ภาพที่ 2 กระบวนการหมักของ heterofermentative lactic acid bacteria

ที่มา : De Vuyst and Vandamme (1994)

2.4 สารยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่สร้างจากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

2.4.1 กรดอินทรีย์ (organic acid)

กรดอินทรีย์ที่สร้างจากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย คือ กรดแลคติคและกรดอะซิติก ในอาหารที่มีแลคติคแอสิดแบคทีเรียจะมีการสะสมของกรดอินทรีย์ทำให้ค่า pH ของอาหารลดลง ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญทำให้แลคติคแอสิดแบคทีเรียถูกนำมาใช้ในการถนอมอาหารเนื่องจากสภาวะที่เป็นกรดจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวกได้ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์จะขึ้นอยู่กับค่า pH, pKa และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ โดยทั่วไปกรดอะซิติกจะมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ดีกว่ากรดแลคติค กลไกการทำงานของกรดอินทรีย์เกิดจากกรดอินทรีย์ที่อยู่ในรูปไม่แตกตัวจะสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียและเกิดการสะสมทำให้ pH ภายในเซลล์สูงกว่าภายนอกเซลล์ กรดอินทรีย์ที่สะสมภายในเซลล์จะแตกตัวให้ไฮโดรเจนอิออน (hydrogen ion) เป็นจำนวนมาก ไฮโดรเจนอิออนจะไปรบกวนกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์แบคทีเรีย เช่น กระบวนการ translocation และ oxidative phosphorylation เป็นต้น (Baird-Parker, 1980) แต่ยังมีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถทนต่อกรดอินทรีย์ได้ เช่น ยีสต์ รา และแบคทีเรียบางชนิดที่สร้างกรด (acid producing bacteria)

แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญโดยกรดแลคติคจากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งกรดแลคติคดังกล่าวสร้างโดยเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากโยเกิร์ต (Kao and Frazier, 1966) เป็นต้น ส่วนแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญจากกรดอะซิติก ได้แก่ *Salmonella* spp. (Goepfert and Hicks, 1969) นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียบางชนิดที่ถูกยับยั้งการเจริญได้โดยทั้งกรดแลคติคและกรดอะซิติกซึ่งสร้างจากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย ได้แก่ *S. aureus* (Daly *et al.*, 1972)

2.4.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide)

แลคติคแอสิดแบคทีเรียสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่มีออกซิเจน กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรียมีดังนี้

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

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

$$\text{lactate} + O_2 \xrightarrow{\text{NAD–independent}} \text{pyruvate} + H_2O_2$$

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

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้เนื่องจากไปทำให้เกิด peroxidation ของไขมันที่อยู่ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียแล้วทำให้ permeability ของเยื่อหุ้มเซลล์สูงขึ้นความสามารถในการซึมผ่านเข้าและออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ของสารต่างๆ จึงเสียไป และยังมีผลทำให้เกิดการทำลายชีวโมเลกุลอื่นๆ ภายในเซลล์ด้วย เช่น โปรตีน และกรดนิวคลีอิก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นอกจากจะมีผลต่อเซลล์โดยตรงแล้วยังอาจมีผลในทางอ้อมด้วย เช่นเมื่อรวมกับ thiocyanate ภายในเซลล์และมีเอนไซม์ lactoperoxidase เป็นคะตะลิสจะทำให้เกิดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้เรียกกระบวนการดังกล่าวว่า lactoperoxidase antibacterial system (Thomas, 1985)

เนื่องจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ ดังนั้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ถูกสร้างและปล่อยออกมานอกเซลล์จึงสะสมอยู่ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเป็นจำนวนมากเมื่อมีการสะสมมากขึ้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก็อาจจะยับยั้งการเจริญของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียได้ด้วย แต่บางครั้งแลคติคแอสิดแบคทีเรียก็มีการปรับตัวทำให้สามารถทนต่อฤทธิ์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ โดยการกระตุ้นให้เซลล์สร้างโปรตีนชนิดหนึ่งที่เรียกว่า stress protein มายับยั้งการทำงานของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Condon, 1987)

จุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งการเจริญด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีอยู่หลายชนิด เช่น *S. aureus* ถูกยับยั้งการเจริญได้โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดย *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* (Dahiya and Speck, 1968) *Pseudomonas* spp. ถูกยับยั้งการเจริญได้โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดย *Lb. plantarum* (Price and Lee, 1970) และ *Pseudomonas fragi* ถูกยับยั้งการเจริญได้โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดย *Lb. acidophilus* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบอยู่ใน skim milk และ low fat milk (Collins and Aramaki, 1980) เป็นต้น

2.4.3 ไดอะซิติล (diacetyl)

ไดอะซิติลหรือ 2,3-butanedione เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึมของ pyruvate ทั้งแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างไดอะซิติลได้จะต้องสามารถเฟอร์เมนต์ซิเตรท (citrate) ได้ ไดอะซิติลเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ไดอะซิติลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และราได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรม

บวก กลไกการทำงานของไดอะซิติลเกิดจากการไปรบกวนการใช้อาร์จินีน (arginine) ภายในเซลล์ โดยไดอะซิติลจะไปทำปฏิกิริยากับ arginine-binding protein ของแบคทีเรียแกรมลบ (Jay, 1982)

ไดอะซิติลเป็นสารให้กลิ่นหอมซึ่งเป็นกลิ่นที่มีอยู่ในอาหารหมักหลายชนิด เช่น เนย ชีส ไวน์แดง ไวน์ขาว บรั่นดี และกาแฟ เป็นต้น ความเข้มข้นของไดอะซิติลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารทั่วไปจะมากกว่า 400 ไมโครกัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของไดอะซิติลในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป เช่น ปริมาณ 200 ไมโครกัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบได้ ปริมาณ 300 ไมโครกัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ ที่ไม่ใช่แลคติคแอสิดแบคทีเรียได้ เป็นต้น (Jay, 1982) ถึงแม้ว่าไดอะซิติลจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ แต่การนำไปใช้ต้องใช้ในปริมาณค่อนข้างสูง อีกทั้งยังเป็นสารที่ให้กลิ่นหอมดังนั้นจึงไม่นิยมนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหารเพื่อหวังผลในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ แต่มักจะนิยมใช้เป็น aseptic agent ในการทำความสะอาดภาชนะหรือเครื่องมือต่างๆ ในอุตสาหกรรมอาหารมากกว่าเนื่องจากไดอะซิติลเป็นสารที่ระเหยได้รวดเร็ว

2.4.4 อะซิตัลดีไฮด์ (acetaldehyde)

อะซิตัลดีไฮด์เป็นสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมทาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โดย heterofermentative lactic acid bacteria ซึ่งในที่สุดจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ถ้าแลคติคแอสิดแบคทีเรียขาดเอนไซม์ alcohol dehydrogenase จะทำให้มีอะซิตัลดีไฮด์หลั่งออกมานอกเซลล์ อะซิตัลดีไฮด์ยังเป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะในโยเกิร์ตอีกด้วย อะซิตัลดีไฮด์ที่สร้างจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียบางชนิดที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1 ถึง100 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดในอาหารได้ เช่น *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella typhimurium* เป็นต้น (Klushrestha and Martin, 1974) เนื่องจากปริมาณอะซิตัลดีไฮด์ที่พบในอาหารมีน้อยมาก เช่น ในโยเกิร์ตจะพบอะซิตัลดีไฮด์ประมาณ 25 ppm เท่านั้น ดังนั้นบทบาทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารของอะซิตัลดีไฮด์จึงนับว่าน้อยมาก

2.4.5 รูเทอริน (reuterin)

รูเทอรินที่มีการศึกษากันมากได้มาจากรูเทอรินที่สร้างจากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย *Lactobacillus reuteri* รูเทอรินมีคุณสมบัติที่สำคัญ คือ มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายน้ำไม่ใช่โปรตีน เนื่องจากไม่ถูกทำลายจาก proteolytic enzyme จึงทำให้รูเทอรินแตกต่างจากแบคเทอริโอซิน (Axellson *et al.*, 1989) เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของรูเทอริน พบว่าเป็น β-hydroxypropionaldehyde ซึ่งอาจอยู่ในรูป monomer หรือ dimer โดยเกิดขึ้นในกระบวนการออกซิไดซ์ของ glycerol ในสภาพที่มีอากาศ โดยทั่วไปแลคติคแอสิดแบคทีเรียจะไม่มี oxidative

pathway สำหรับ glycerol ทำให้ไม่สามารถถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ดังนั้นวิธีการที่แลคติคแอสิดแบคทีเรียจะใช้ glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนได้คือ การทำให้ glycerol ให้เข้าสู่ intermediate state ของ 3-hydroxypropionaldehyde

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นของรูเทอรินค่อนข้างกว้างสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ยีสต์ รา และ โปรโตซัว แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญจากรูเทอริน ได้แก่ *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus* และ *Listeria* เป็นต้น (Axellson *et al.*, 1989) กลไกการทำงานของรูเทอรินเชื่อว่าเกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิด เช่น ribonucleotide reductase จึงทำให้การสังเคราะห์ DNA เสียไป ดังนั้นรูเทอรินหรือแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างรูเทอรินได้จึงน่าจะนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารเพื่อถนอมอาหารหรือในอุตสาหกรรมอาหารอื่นๆ ที่ต้องการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

2.4.6 แบคเทอริโอซิน (bacteriocin)

แบคเทอริโอซินเป็นโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรียมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นได้ ปกติแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินจะมีภูมิคุ้มกันต่อแบคเทอริโอซินที่ตนสร้างออกมา ดังนั้นจึงทำให้ไม่ถูกยับยั้งจากแบคเทอริโอซินของตนเอง การสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียเชื่อว่าเกิดจากการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่มีเชื้อหลายชนิดเจริญอยู่ร่วมกันทำให้เชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซินสามารถแย่งอาหารและพื้นที่เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ส่วนเชื้อชนิดอื่นที่ไม่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ก็จะตายลงในที่สุด (Jack *et al.*, 1995)

2.5 คุณสมบัติที่สำคัญของสารที่จัดเป็นแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1925 โดย Gratia เป็นแบคเทอริโอซินที่ถูกสร้างโดยเชื้อ *Escherichia coli* v (หรือ *Escherichia coli* สายพันธุ์ CA7) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ϕ (หรือ *Escherichia coli* สายพันธุ์ CA81) ได้ ด้วยเหตุที่แบคเทอริโอซินดังกล่าวถูกสร้างโดยเชื้อ *E. coli* ดังนั้นจึงถูกตั้งชื่อว่า colicin หลังจากที่มีการค้นพบ colicin แล้วก็มีการค้นพบแบคเทอริโอซินอีกหลายชนิดในเวลาต่อมา โดยอาศัยการศึกษาคุณสมบัติจาก colicin เป็นต้นแบบ แบคเทอริโอซินที่ถูกค้นพบภายหลังจะถูกนำไปเปรียบเทียบกับ colicin หากพบว่ามีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไปก็จะจัดเป็นแบคเทอริโอซินชนิดใหม่ อย่างไรก็ตามการกำหนดคุณสมบัติของสารที่จัดเป็นแบคเทอริโอซินยังไม่แน่ชัดเพราะแบคเทอริโอซินผลิตมาจากแบคทีเรีย

หลายกลุ่มจึงทำให้มีคุณสมบัติแตกต่างกันค่อนข้างมากจนในที่สุดสามารถสรุปคุณสมบัติที่สำคัญของสารที่จัดเป็นแบคเทอริโอซินได้ดังนี้

2.5.1 แบคเทอริโอซินเป็นโปรตีน

การทดสอบว่าสารยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ที่สนใจเป็นแบคเทอริโอซินหรือไม่ มักจะนำสารดังกล่าวมาทดสอบกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ถ้าเอนไซม์ย่อยโปรตีนสามารถทำลายสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สนใจได้ ก็แสดงว่าสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สนใจนั้นเป็นโปรตีนสารดังกล่าวจึงน่าจะเป็นแบคเทอริโอซิน แต่เอนไซม์ย่อยโปรตีนทั้งหมดไม่สามารถย่อยแบคเทอริโอซินได้ทั้งหมด เช่น nisin ไม่ถูกย่อยด้วย pepsin หรือ trypsin แต่ถูกย่อยด้วย α-chymotrypsin (Hurst and Hoover, 1993)

2.5.2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้อย่างจำเพาะ

คุณสมบัติข้อนี้ทำให้แบคเทอริโอซินแตกต่างจากสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ถูกสร้างโดยแลคติคแอสิดแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือรูเทอริน เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แบบไม่จำเพาะ การยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์แบบจำเพาะของแบคเทอริโอซิน คือ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวกันหรือสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน (narrow spectrum) ได้ เช่น แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกก็จะสามารถยับยั้งการเจริญเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก ตัวอย่าง เช่น diplococin ที่สร้างจาก *Streptococcus cremoris* จะสามารถยับยั้งการเจริญของ *Streptococcus lactis* ได้แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรียแกรมบวกหรือแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นได้ pediocin ที่สร้างจาก *Pediococcus pentosaceus* และ pediocin AcH ที่สร้างจาก *P. acidilactici* สามารถยับยั้งได้เฉพาะ *S. aureus* และ *Clostridium perfringen* (Bhunia *et al.*, 1988) เท่านั้น แต่ในปัจจุบันได้มีรายงานว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกสามารถที่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ เช่น pediocin F ที่สร้างจาก *P. acidilactici* F นอกจากจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ แล้วยังสามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli* ได้ (Osmanagaoglu *et al.*, 1998)

การที่แบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้อย่างจำเพาะเกิดจากแบคเทอริโอซินสามารถจับกับบริเวณที่เป็นตำแหน่งจำเพาะ (specific binding site หรือ specific receptor) ซึ่งอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ไวต่อแบคเทอริโอซิน เมื่อแบคเทอริโอซินจับกับบริเวณที่รับแล้วก็จะทำให้เกิดรู (pore) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำลายการผ่านเข้าออกของไอออนและสารต่างๆ (permeability) ทำให้เซลล์เสียความสมดุลจนแตกสลายหรือเหี่ยวตายในที่สุด เช่น lactacin F จะทำให้เซลล์สูญเสีย permeability ทำให้เกิดการไหลของโพแทสเซียมไอออน (K^+) ออก

จากเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่า nisin จะไปรบกวน proton motive force (PMF) ของ *Listeria monocytogenes* (Bruno *et al.*, 1992) แต่ก็ยังมีแบคเทอริโอซินบางชนิดที่ทำให้เซลล์ตาย โดยที่ยังคงสภาพเดิมได้ (Itoh *et al.*, 1995) ซึ่งกลไกอาจเกิดจากการยับยั้งการสร้าง DNA, RNA หรือโปรตีน เช่น lactocin 27 สามารถยับยั้งการเจริญของกลุ่ม Lactobacilli ได้โดยการขัดขวางการสังเคราะห์ primary protein และลดระดับของ adenosine 5-triphosphate (Upreti and Hinsdill, 1975) lactostrepcin 5 ที่สร้างจาก *S. cremoris* 202 จะทำให้หยุดการสังเคราะห์ DNA, RNA, โปรตีน ยับยั้งกระบวนการเคลื่อนย้าย uridine และเหนี่ยวนำให้เกิดการไหลของโพแทสเซียมไอออน (K^+) (Zajdei and Ceglowski, 1985)

2.5.3 ทนความร้อน

เนื่องจากแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กจึงสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิสูงได้ การทนความร้อนของแบคเทอริโอซินขึ้นอยู่กับการเตรียมแบคเทอริโอซินโดยที่ crude bacteriocin จะทนความร้อนได้ดีกว่า purified bacteriocin (Davey and Richard, 1981) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นอีก เช่น pH แบคเทอริโอซินบางชนิด เช่น enteric DPC 1146 จะสูญเสีย activity ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที ที่ pH 7 (Parente and Hill, 1992) nisin จะสูญเสีย activity ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที ที่ pH 4 นอกจากนี้ยังพบว่า lactostrepsin ที่สร้างจาก *Streptococcus* ส่วนใหญ่จะทำงานได้ดีที่ pH เป็นกรด (Kozak *et al.*, 1978) และ piscicolin 126 สามารถทนความร้อนได้สูง ในสภาวะที่เป็นกรด ทำให้สามารถนำเอาแบคเทอริโอซินมาใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารพวกที่เป็นกรดได้ เช่น อาหารหมักดองต่างๆ และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่ต้องใช้ความร้อนสูงได้ด้วย

2.6 การตั้งชื่อแบคเทอริโอซิน

การตั้งชื่อแบคเทอริโอซินส่วนมากมักเติมคำว่า "cin" ต่อท้ายชื่อ genus หรือ species ของแบคที่เรียที่สร้างแบคเทอริโอซินนั้นๆ เช่น

colicin	เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย	*Escherichia coli*
pediocin	เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย	*Pediococcus acidilactici*
helveticin	เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย	*Lactobacillus helveticus*
plantaricin	เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย	*Lactobacillus plantarum*
mesenteroicin	เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย	*Leuconostoc mesenteroides*

นอกจากนี้บางครั้งอาจมีการเติมตัวเลขหรืออักษรต่อท้ายชื่อของแบคเทอริโอซินเพื่อบ่งบอกความแตกต่างของแบคเทอริโอซินที่ถูกสร้างโดยแบคที่เรียที่อยู่ใน genus หรือ species เดียวกัน เช่น lactococcin I สร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain AC1 ส่วน lactococcin A สร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain LMG2130 เป็นต้น

2.7 การจัดจำแนกแบคเทอริโอซิน (classification of bacteriocin)

นับตั้งแต่มีการค้นพบ colicin เป็นต้นมาก็ได้มีการค้นพบแบคเทอริโอซินอีกมากมายหลายชนิดจึงได้มีการจัดแบ่งกลุ่มของแบคเทอริโอซินชนิดต่างๆ ออกเป็นหมวดหมู่เพื่อง่ายต่อการศึกษาโดยอาศัยคุณสมบัติต่างๆ ของแบคเทอริโอซิน เช่น ขนาดมวลโมเลกุล (molecular mass) การทนต่อความร้อน (thermostability) การไวต่อเอนไซม์ชนิดต่างๆ (enzyme sensitivity) การดัดแปลงกรดอะมิโนหลังจากผ่านกระบวนการแปลรหัส (translation) และกลไกในการทำงาน (mode of action) จนทำในที่สุด Klaenhammer. (1993) ได้ใช้เกณฑ์ดังกล่าวจัดจำแนกแบคเทอริโอซินออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

2.7.1 Class I bacteriocins

ประกอบด้วยแบคเทอริโอซินที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 5 กิโลดาลตันและถูกจัดเป็น lantibiotics คือ กลุ่มแบคเทอริโอซินที่มีกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากผ่านกระบวนการแปลรหัส (posttranslationally modified amino acid) ซึ่งได้แก่ dehydroalanine, dehydrobutirine, lantionine และ β-methyl- lantionine แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ยังจำแนกได้อีก 2 กลุ่มย่อย โดยอาศัยโครงสร้าง (structure) และประจุ (charge)

2.7.1.1 Group Ia bacteriocins

ประกอบด้วยแบคเทอริโอซินที่มีรูปร่างเป็นเกลียว (screw shaped) และมีประจุสุทธิเป็นบวก (cation) กลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้มักทำให้เกิดรู (pore) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) จำนวนกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการแปลรหัสแตกต่างกันออกไปตามแต่ชนิดของแบคเทอริโอซิน เช่น pep5 มีกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการแปลรหัส 3 ตัว (Res *et al.*, 1994) epidermin pep5 มีกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการแปลรหัส 4 ตัว (Allgarier *et al.*, 1986) และ nisin มีกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการแปลรหัส 5 ตัว (Hurst, 1981) เป็นต้น

2.7.1.2 Group Ib bacteriocins

ประกอบด้วยแบคเทอริโอซินที่มีรูปร่างกลม (globular shape) และมีประจุสุทธิเป็นลบ (anion) หรือเป็นกลาง (neutral) เช่น mutacin A (Woodruff *et al.*, 1998), mersacidin (Altena *et al.*, 2000) และ cinnamycin (Kaletta *et al.*, 1991) เป็นต้น

2.7.2 Class II bacteriocins

ประกอบด้วยแบคเทอริโอซินที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน สามารถทนความร้อนได้สูง ไม่มีกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการแปลรหัสแบคเทอริโอซิน กลุ่มนี้ยังจำแนกได้อีก 3 กลุ่มย่อย

2.7.2.1 Group IIa bacteriocins

เป็นแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria* ได้ดี มี consensus sequence ที่บริเวณ N-terminus เป็น –Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys กลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้มักทำให้เกิดรู (pore) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของเซลล์เป้าหมาย ตัวอย่างแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ ได้แก่ pediocin AcH (Bhunia *et al.*, 1988), pediocin PA1 (Henderson *et al.*, 1992), mesentericin Y105 (Hechard *et al.*, 1992), enterocin A (Aymerich *et al.*, 1996) และ sakacin P (Tichaczek *et al.*, 1992) เป็นต้น

2.7.2.2 Group IIb bacteriocins

เป็นแบคเทอริโอซินที่มีกลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินโดยทำให้เกิดรู (pore) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของเซลล์เป้าหมาย แต่การทำงานต้องอาศัยแบคเทอริโอซิน 2 ชนิดจึงจะสามารถทำงานได้ เช่น enterocin L50A ต้องทำงานร่วมกับ enterocin L50B (Cintas *et al.*, 1998), lactococcin M ต้องทำงานร่วมกับ lactococcin N (Van Belkum *et al.*, 1991) และ plantaricin EF ต้องทำงานร่วมกับ plantaricin JK (Anderssen *et al.*, 1998) เป็นต้น

2.7.2.3 Group IIc bacteriocins

ประกอบด้วยแบคเทอริโอซินที่ไม่สามารถจัดอยู่ใน group IIa หรือ group IIb bacteriocins ได้ แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ยังจำแนกได้อีก 2 กลุ่มย่อย

1) เป็นแบคเทอริโอซินที่มีกรดอะมิโน cysteine 1 หรือ 2 ตัว ซึ่งได้แก่ แบคเทอริโอซินที่จัดอยู่ในกลุ่ม thiolbiotics และ cystibiotics ตัวอย่าง เช่น cerin 7, lactococcin B, enterocin B (Nes and Holo, 2000) และ carnobacteriocin A (Worobo *et al.*, 1994) เป็นต้น

2) เป็นแบคเทอริโอซินที่ไม่มีกรดอะมิโน cysteine เช่น lactococcin A และ acidocin B (Leer *et al.*, 1995) เป็นต้น

2.7.3 Class III bacteriocins

เป็นแบคเทอริโอซินที่ไม่ทนความร้อน (heat labile) มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 30 กิโลดาลตัน ส่วนใหญ่แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้จะผลิตโดยแบคทีเรียใน genus *Lactobacillus* ตัวอย่าง เช่น helveticin J (Joerger and Klaenhammer, 1986), helveticin V-1829 (Vaughan *et al.*, 1992) และ lactacin B (Barefoot and Klaenhammer, 1984)

2.7.4 Class IV bacteriocins

เป็นแบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็น glycoprotein หรือ lipoprotein ตัวอย่างแบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็น glycoprotein ได้แก่ lactocin 27 (Upreti and Hinsdill, 1975) ตัวอย่างแบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็น lipoprotein ได้แก่ lactostrepcins (Kozak *et al.*, 1978)

2.8 แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

2.8.1 carnobacteriocin A1, A2, A3

แบคเทอริโอซินทั้ง 3 ชนิดสร้างจาก *Carnobacterium piscicola* LV17 จัดอยู่ในกลุ่ม Group IIc bacteriocins เป็นโปรตีนที่สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นค่อนข้างแคบ ถูกสร้างออกมาในช่วงแรกของการเจริญและถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ยีนที่กำหนดการสร้างแบคเทอริโอซินอยู่บน plasmid carnobacteriocin A1, A2 และ A3 มีน้ำหนักโมเลกุล 5100, 5123 และ 5127 ดาลตัน ตามลำดับ (Nettle and Barefoot, 1993)

2.8.2 carnocin

สร้างจาก *Leuconostoc carnosum* LA44A ซึ่งแยกได้จากไส้กรอก Vienna-type-sausage สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* และ *Listeria* spp. ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น chymotrypsin, trypsin และ amylase ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เสถียรที่ pH ตั้งแต่ 2 ถึง 10 ถูกสร้างออกมาในช่วงปลายระยะ exponential phase ของการเจริญ มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 2,510 ถึง 6,000 ดาลตัน (van Laack *et al.*, 1992)

2.8.3 carnocin U149

สร้างจาก *Carnobacterium piscicola* ที่แยกได้จากเนื้อปลา ทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* และ *Lactococcus* ถูกสร้างออกมาในช่วงกลางระยะ exponential phase

ของการเจริญที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เป็นแบคเทอริโอซินที่จัดอยู่ในกลุ่ม lantibiotic ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 35 ถึง 37 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 4,500 ถึง 5,000 ดาลตัน (Stoffels *et al.*, 1992)

2.8.4 curvacin A

สร้างจาก *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 จัดอยู่ในกลุ่ม Group IIa bacteriocins ซึ่งแยกได้จากเนื้อสัตว์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *L. monocytogenes* และ *Listeria ivanovii* ถูกทำลายโดยเอนไซม์ proteinase K และ trypsin แต่ไม่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ pepsin ทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 3,000 ถึง 5,000 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนตั้งแต่ 38 ถึง 41 ตัว (Tichaczek *et al.*, 1992)

2.8.5 diplococcin

สร้างจาก *Streptococcus cremoris* 346 ซึ่งนับเป็นแบคเทอริโอซินชนิดแรกๆ ที่ค้นพบว่าผลิตจากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย มีน้ำหนักโมเลกุล 5,300 ดาลตัน ถูกสร้างออกมาในช่วงแรกของระยะ stationary phase ไม่เสถียรที่อุณหภูมิห้องและไม่ทนความร้อน ถูกทำลายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน chymotrypsin, pronase และ trypsin สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* และ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* กลไกการทำงานจะไปยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ DNA และ RNA ทำให้เซลล์เป้าหมายตายโดยที่เซลล์ไม่แตกสลาย (Davey, 1981)

2.8.6 helveticin J

สร้างจาก *Lactobacillus helveticus* 481 จัดอยู่ในกลุ่ม Group III bacteriocins เป็นแบคเทอริโอซินที่ถูกทำลายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนหลายชนิดและไม่ทนความร้อน สามารถยับยั้งการเจริญของ Lactobacilli สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันได้ มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 37,000 ดาลตัน ยีนที่กำหนดการสร้างแบคเทอริโอซินอยู่บนโครโมโซม (Joerger and Klaenhammer, 1986)

2.8.7 lactacin F

สร้างจาก *Lactobacillus acidophilus* 11088 ซึ่งแยกได้จากนม ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน proteinase K, trypsin, ficin และ subtilicin ทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. fermentum* และ *Ent. faecalis* ถูกสร้างออกมามากสุดในช่วงแรกของระยะ stationary phase ของการเจริญ (Muriana and Kleanhammer, 1991)

2.8.8 lacticin 481

สร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ481 เป็นแบคเทอริโอซินในกลุ่ม lantibiotic สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่ม *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* และ *Clostridium tyrobutyricum* เชื้อจะสร้างแบคเทอริโอซินมากสุดเมื่ออยู่ในสภาวะที่ pH เท่ากับ 5 สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 5,000 ถึง 10,000 ดาลตัน (Piard *et al.*, 1992)

2.8.9 lactocin S

สร้างจาก *Lactobacillus sake* L45 จัดอยู่ในกลุ่ม Group Ia bacteriocins เป็นโปรตีนที่ทนความร้อน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pediococcus*, *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* ถูกสร้างในช่วงท้ายของระยะ exponential phase ของการเจริญ มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 13,700 ถึง 30,000 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 33 ตัว ยีนที่กำหนดการสร้างแบคเทอริโอซินอยู่บน plasmid ที่มีขนาด 50 กิโลเบส (Mortvedt *et al.*, 1991)

2.8.10 lactococcin A

สร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LMG2130 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lb. lactis* subsp. *lactis* ถูกทำลายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนหลายชนิด เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ มี alanine และ glycine เป็นองค์ประกอบค่อนข้างมาก มีน้ำหนักโมเลกุล 5,778 ดาลตัน มีฤทธิ์ในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย ยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินอยู่บน plasmid (Holo *et al.*, 1991)

2.8.11 lactococcin I

สร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AC1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactococcus* และ *Clostridium* บางชนิดได้ ทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที มีน้ำหนักโมเลกุล 6,000 ดาลตัน ยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินอยู่บน plasmid (Geis *et al.*, 1983)

2.8.12 lactostrepcin

สร้างจาก *Lactococcus lactis biovar diacetylactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* และ *Lc. lactis* subsp. *lactis* เป็นแบคเทอริโอซินที่ทำงานได้ดีที่สุดเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด (pH น้อยกว่า 5) และจะไม่ทำงานเมื่ออยู่ในสภาวะเป็นกลาง (pH เท่ากับ 7) ทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ถูกสร้างออกมาในช่วงแรกของ exponential phase มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 ดาลตัน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Lactococci, Streptococci group A, C และ

G, *Bacillus cereus*, *Lb. helveticus*, *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* และ *L. paracitrovorum* (Kozak *et al.*, 1978)

2.8.13 leucocin A

สร้างจาก *Leuconostoc gelidum* ซึ่งแยกได้จากเนื้อสัตว์ ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เสถียรที่ pH ประมาณ 2 ถึง 3 ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนหลายชนิด เช่น protease, chymotrypsin, trypsin, papain และ pepsin สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Ent. faecalis* และ *L. monocytogenes* ถูกสร้างออกมาในช่วงแรกระยะ exponential phase ของการเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 2,500 ถึง 3,000 ดาลตัน (Hastings *et al.*, 1991)

2.8.14 mesenteroicin 5

สร้างจาก *Leuconostoc mesenteroides* UL5 ซึ่งแยกได้จากเนยแข็ง swiss-type cheese ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน protease ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ถูกสร้างออกมาในช่วงแรกระยะ stationary phase ของการเจริญสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *L. monocytogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Brevibacterium linens* และ *P. pentosaceus* มีน้ำหนักโมเลกุล 4,500 ดาลตัน (Daba *et al.*, 1991)

2.8.15 nisin

สร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* จัดอยู่ในกลุ่ม Group Ia bacteriocins ประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 3,500 ดาลตัน สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด เช่น *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *S. aureus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *L. monocytogenes* และ *Lactobacillus* สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ถูกทำลายโดยเอนไซม์ chymotrypsin แต่ไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์ pronase และ trypsin ถูกสร้างออกมาในช่วง exponential phase หลังจากการผ่านกระบวนการแปลรหัสแล้ว nisin จะอยู่ในรูป pronisin ก่อน เมื่อถูกส่งออกนอกเซลล์จะถูกตัดบางส่วนออกไปทำให้กลายเป็น nisin กลไกการทำงานของ nisin เป็นแบบทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของเซลล์เป้าหมาย ยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินอาจอยู่บน plasmid หรืออยู่บนโครโมโซมขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่สร้าง (Buchman *et al.*, 1988)

2.8.16 pediocin AcH

สร้างจาก *Pediococcus acidilactici* H จัดอยู่ในกลุ่ม Group IIa bacteriocins ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *S. aureus*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes* และ *Pseudomonas putida* ถูกทำลายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน

หลายชนิด ทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เสถียรที่ pH ตั้งแต่ 2.5 ถึง 9.0 ถูกสร้างออกมาในช่วง stationary phase มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 2,700 ถึง 50,000 ดาลตัน กลไกการทำงานจะยับยั้งการสังเคราะห์ ATP รบกวนการส่งสารภายในเซลล์ และทำลายความสามารถในการผ่านเข้าออกของสาร (permeability) ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Bhunia *et al.*, 1988)

2.8.17 pediocin PA-1

สร้างจาก *Pediococcus acidilactici* strain PAC-1.0 จัดอยู่ในกลุ่ม Group IIa bacteriocins ถูกสร้างออกมาในช่วงระยะ stationary phase ของการเจริญ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *L. mesenteroides* และ *L. monocytogenes* ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนแต่ไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์ lipase, phospholipase, lysozyme, DNase หรือ RNase ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 80 ถึง 100 องศาเซลเซียส เสถียรที่ pH ตั้งแต่ 4 ถึง 7 มีน้ำหนักโมเลกุล 16,500 ดาลตัน ยีนที่กำหนดการสร้างแบคเทอริโอซินอยู่บน plasmid (Henderson *et al.*, 1992)

2.8.18 plantaricin A

สร้างจาก *Lactobacillus plantarum* C-11 มีน้ำหนักโมเลกุล 6,000 ดาลตัน จัดอยู่ในกลุ่ม Group IIb bacteriocins ทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทำงานได้ที่ pH อยู่ในช่วง 4 ถึง 6.5 ถูกสร้างออกมาในช่วงกลางของ exponential phase ของการเจริญเติบโต (Daeschel *et al.*, 1990)

2.8.19 plantaricin B

สร้างจาก *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193 จัดอยู่ในกลุ่ม Group IIb bacteriocins มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อชนิดอื่นค่อนข้างแคบ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lb. plantarum*, *Lb. mesenteroides* และ *P. damnosus* ถูกทำลายด้วย lipase และ α-amylase จึงเชื่อว่าน่าจะเป็นแบคเทอริโอซินที่มีไขมันและคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ (West and Warner, 1988)

2.8.20 sakacin A

สร้างจาก *Lactobacillus sake* 706 จัดอยู่ในกลุ่ม Group IIa bacteriocins เป็นโปรตีนที่ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ถูกสร้างในช่วงกลางและช่วงท้ายของระยะ exponential phase ของการเจริญ ยีนที่กำหนดการสร้างแบคเทอริโอซินอยู่บน plasmid ที่มีขนาด 27.7 กิโลเบส สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ได้หลายสายพันธุ์ (Schillinger and Lucke, 1989)

2.9 การคัดเลือกแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน

แลคติคแอสิดแบคทีเรียนอกจากจะสามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้แล้วยังสามารถสร้างสารอื่นๆ เช่น กรดอินทรีย์ หรือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นเช่นเดียวกับแบคเทอริโอซิน ดังนั้นในการคัดเลือกแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ต้องการ จึงต้องมีการกำจัดปัจจัยดังกล่าวที่จะไปรบกวนผลการทดลอง เช่น การกำจัดผลที่เกิดขึ้นจากกรดอินทรีย์ทำได้โดยเตรียมอาหารที่มีส่วนประกอบของสารเคมีที่จะทำปฏิกิริยากับกรดที่สร้างจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียเพื่อให้มีสภาพเป็นกลางก่อนที่จะนำไปทำการทดลองในขั้นต่อไป หรือลดปริมาณของน้ำตาลกลูโคสในสูตรอาหารเพื่อเป็นการจำกัดแหล่งคาร์บอนที่จะถูกนำไปสร้างเป็นกรดอินทรีย์ ส่วนการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถทำได้โดยการบ่มเชื้อที่สภาวะไร้ออกซิเจน หรือเติมเอนไซม์คะตะเลสเพื่อเปลี่ยนให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กลายเป็นน้ำและออกซิเจน เป็นต้น วิธีที่นิยมใช้ในการคัดเลือกแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน ได้แก่

2.9.1 agar spot test

เป็นวิธีการที่อาศัยความสามารถของแบคเทอริโอซินในการแพร่กระจายเข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งหรือชนิดกึ่งแข็งได้ โดยนำแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้มาหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง นำเชื้อไปบ่มประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากที่เชื้อเจริญก็ให้นำเอาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็งที่มีเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเจริญอยู่มาเททับบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มีแลคติคแอสิดแบคทีเรีย จากนั้นนำไปบ่มเพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเจริญ ถ้าแลคติคแอสิดแบคทีเรียสามารถสร้างแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ ก็จะเกิดบริเวณยับยั้งรอบๆ หยดของแลคติคแอสิดแบคทีเรียนั้น ในการทดลองที่ใช้เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียหลายๆ ชนิดพร้อมกัน ในขั้นตอนการเทอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็งทับบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งควรระมัดระวังไม่ให้หยดของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียแต่ละหยดกระจายไปทั่วผิวหน้าอาหารผสมกับหยดของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียอื่นๆ ซึ่งจะทำให้การวิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้ยากลำบาก

2.9.2 spot on lawn

เป็นการคัดเลือกโดยให้เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินเจริญไปพร้อมๆ กับเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยการแต้มเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียลงบนผิวหน้าอาหารชนิดแข็งหรือกึ่งแข็งที่เกลี่ยเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบไว้ วิธีนี้เหมาะสมกับเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ต้องสร้างแบคเทอริโอซินในช่วงตอนต้นของการเจริญและเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบต้องเจริญได้ก่อนที่แบคเทอริโอซินจะแพร่กระจาย

2.9.3 well diffusion

เป็นการคัดเลือกโดยไม่ต้องอาศัยการเจริญของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ทำโดยการนำเอาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็งที่มีเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบมาเททับบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งรอจนอาหารชนิดกึ่งแข็งดังกล่าวแข็งตัว เจาะอาหารด้วยที่เจาะวุ้นปลอดเชื้อ (sterile cork borrer) จากนั้นนำเอาส่วนใส (supernatant) ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียมาเติมลงหลุมที่เจาะไว้ รอให้ supernatant ซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มและสังเกตผล ถ้ามีบริเวณยับยั้งเกิดขึ้นรอบๆ หลุมที่หยด supernatant ลงไปก็แสดงว่าเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียสามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้และควรระมัดระวังในขั้นตอนการเจาะหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งอาจมีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น

2.9.4 swab-paper disc

เป็นวิธีการคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn. (1998) เป็นวิธีการที่ทำได้ง่ายเหมาะกับคนที่ขาดความชำนาญในการใช้วิธี agar spot test และ well diffusion โดยไม่ต้องมีการเทอาหารชนิดกึ่งแข็งทับบนผิวหน้าอาหารชนิดแข็งหรือไม่ต้องมีการเจาะหลุม ซึ่งวิธีดังกล่าวมีขั้นตอนดังนี้ นำไม้พันสำลีปลอดเชื้อไปจุ่มเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากนั้นนำไปป้าย (swab) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง นำแผ่น paper disc ปลอดเชื้อวางลงบนผิวหน้าอาหาร หยด supernatant ของแลคติคแอสิดแบคทีเรียลงบนแผ่น paper disc นำไปบ่มและสังเกตผล ถ้ามีบริเวณยับยั้งเกิดขึ้นรอบๆ แผ่น paper disc แสดงว่าเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียสามารถสร้างแบคเทอริโอซินไปยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้

2.10 การตรวจหาตำแหน่งของยีนที่สร้างแบคเทอริโอซิน

การสร้างแบคเทอริโอซินจะต้องประกอบด้วยกระบวนการถอดรหัส (transcription) และแปลรหัส (translation) เพื่อถอดรหัสจากยีนให้กลายเป็นโปรตีน โดยยีนที่สร้างแบคเทอริโอซินอาจเป็นยีนที่อยู่บน plasmid หรือเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซม การตรวจหาตำแหน่งของยีนที่สร้างแบคเทอริโอซินว่าเป็นยีนที่อยู่บน plasmid หรือเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมจะเริ่มจากการศึกษาก่อนว่าแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้มี plasmid หรือไม่ โดยการนำแลคติคแอสิดแบคทีเรียดังกล่าวไปสกัด plasmid ถ้าจากการทดลองพบว่าแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ไม่มี plasmid ก็แสดงว่ายีนสำหรับแบคเทอริโอซินน่าที่จะเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมแต่ถ้าจากการทดลองพบว่าแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้มี plasmid ก็จะต้องทำการตรวจสอบต่อไปว่ายีนดังกล่าวเป็นยีนที่อยู่บน plasmid หรือเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซม

ตัวอย่างยีนสำหรับแบคเทอริโอซินที่อยู่บนโครโมโซม เช่น plantaricin D ที่สร้างโดย *Lb. plantarum* BFE 905 (Franz *et al.*, 1998), plantaricin KW 30 ที่สร้างโดย *Lb. plantarum* KW 30 (Kelly *et al.*, 1996) และ helveticin J ที่สร้างโดย *Lb. helveticus* 481 (Joerger and Klaenhammer,1986) เป็นต้น

ตัวอย่างยีนสำหรับแบคเทอริโอซินที่อยู่บน plasmid DNA เช่น coagulin ที่สร้างโดย *Bacillus coagulans* I4 (Hyronimus *et al.*, 1998) แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lb. curvatus* IFLP 105 (Casla *et al.*, 1996) และ colicins (Pugsley and Oudega, 1987) เป็นต้น

วิธีการต่างๆที่ใช้ในการสกัด plasmid DNA จากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

Cords *et al.* (1974) ทำการสกัด plasmid จาก group N Streptococci ที่เลี้ยงในอาหาร trypticase soy broth ที่ประกอบด้วย H^3-thymine แล้วทำให้เซลล์แตกโดยใช้ lysozyme ร่วมกับ ethylenediamine tetra-acetic acid และ sodium lauryl sulfate จากนั้นทำการแยก plasmid DNA ให้บริสุทธิ์โดยวิธี cesium chloride-ethidium bromide equilibrium density gradient วิธีการดังกล่าวมีข้อเสียคือ มีการใช้ ethidium bromide ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และให้ปริมาณ plasmid น้อย เนื่องจากขั้นตอนการย่อยสลายเซลล์มีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ

Klaenhammer *et al.* (1978) ได้ปรับปรุงวิธีการสกัด plasmid ของ Cords *et al.* (1974) โดยเลี้ยงเซลล์ *S. lactis* ในอาหารเหลว modified Elliker ที่มี thrionine 20 mM เป็นองค์ประกอบและสกัด plasmid โดยวิธี alkaline extraction method พบว่า การใช้ lysozyme 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ sodium dodecyl sulphate (SDS) 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จะทำให้การย่อยสลายเซลล์มีประสิทธิภาพมากขึ้นทำให้สามารถสกัด plasmid ได้ในปริมาณที่มาก และยังสามารถใช้ในการสกัด plasmid ที่มีขนาดใหญ่ถึง 46.2 กิโลเบส ได้

ต่อมา Anderson and Mckay. (1983) ได้ปรับปรุงวิธีการให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งสามารถที่จะสกัด plasmid ที่มีขนาดใหญ่กว่า 46.2 กิโลเบสได้ โดยใช้ปริมาณเซลล์น้อยในการสกัด และให้ปริมาณ plasmid มากและ plasmid ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง แต่วิธีการดังกล่าวมีข้อเสีย คือ ต้องใช้เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่อยู่ในระยะ exponential phase เท่านั้น ถ้าใช้เชื้อที่เลี้ยงข้ามคืน (overnight culture) ซึ่งมักอยู่ในระยะ stationary phase จะพบว่าแลคติคแอสิดแบคทีเรียมักจะสร้างโปรตีนต่างๆ ออกมาสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งโปรตีนต่างๆ เหล่านี้จะไปรบกวนกระบวนการย่อยสลายเซลล์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย ทำให้ได้ plasmid น้อย

O'Sullivan and Klaenhammer. (1993) ได้พัฒนาวิธีสกัด plasmid โดยใช้เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ถูกเลี้ยงข้ามคืน แต่วิธีการดังกล่าวต้องใช้ ethidium bromide และต้องตกตะกอน DNA (DNA precipitation) ถึง 2 ครั้ง

Duan *et al.* (1999) ได้พัฒนาวิธีสกัด plasmid โดยใช้เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ถูกเลี้ยงข้ามคืนเช่นกัน และใช้ acetone ช่วยในการย่อยเซลล์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย ทำให้เซลล์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรียถูกย่อยสลายได้ดีขึ้น

2.10.1 การเหนี่ยวนำให้เกิดการสูญเสีย plasmid DNA (plasmid curing)

plasmid curing เป็นวิธีการทำให้เซลล์สูญเสีย plasmid โดยการใช้สารเคมีต่างๆ เช่น acridine dye, nitrosoguanidine, ethidium bromide, novobiocin หรือโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิสูง ซึ่งวิธีดังกล่าวจะถูกนำมาใช้ตรวจหาตำแหน่งของยีนที่สร้างแบคเทอริโอซินว่าเป็นยีนที่อยู่บน plasmid หรือเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย plasmid curing มักถูกใช้ในการศึกษาว่าคุณลักษณะของแบคทีเรียที่สนใจถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บน plasmid หรือไม่ ซึ่งทำโดยการนำแบคทีเรียมาเหนี่ยวนำให้สูญเสีย plasmid จากนั้นตรวจสอบดูว่าลักษณะของแบคทีเรียที่สนใจสูญหายไปพร้อมกับการสูญเสีย plasmid หรือไม่ หากลักษณะที่สนใจสูญหายไปพร้อมกับ plasmid แสดงว่าลักษณะดังกล่าวถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บน plasmid

ตัวอย่างของงานวิจัยที่เกี่ยวของกับ plasmid curing

Vescovo *et al.* (1982) ได้นำ *Lb. reuteri* และ *Lb. acidophilus* มาตรวจสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ และเมื่อทำ plasmid curing โดยใช้ acridine dye และการเพิ่มอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง พบว่าการสูญเสีย plasmid ของเชื้อทำให้คุณสมบัติในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะหายไป

West and Warner. (1985) ได้ทำการถ่ายโอนยีนจากเชื้อ *S. lactis* ไปยัง *Lb. plantarun* ได้สำเร็จและพบว่า plasmid pAM β1 ขนาด 26.2 กิโลเบส มียีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

Daeschel and Klaenhammer. (1985) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *P. pentosaceus* ในอาหาร MRS broth โดยจำกัดให้เหลือน้ำตาล glucose เพียง 0.3 mM และใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นจากเดิม 4 องศาเซลเซียส พบว่า plasmid ขนาด 21 กิโลเบสหายไป เมื่อนำไปตรวจสอบปรากฏว่าคุณสมบัติในการสร้าง pediocin หายไป จึงสรุปว่ายีนที่สร้าง pediocin เป็นยีนที่อยู่บน plasmid ขนาด 21 กิโลเบส

Florian *et al.* (1998) ได้นำ *Ent. faecium* 6T1a มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่มี novobiocin ความเข้มข้น 0.125 ถึง 0.5 ไมโครกัมต่อมิลลิลิตร หรือ MRS broth ที่มี ethidium bromide ความเข้มข้น 10 ถึง 50 ไมโครกัมต่อมิลลิลิตร พบว่า plasmid ขนาด 23 กิโลเบสหายไป และทำให้คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *L. monocytogenes* ของ *Ent. faecium* 6T1a หายไปด้วย จึงสรุปว่ายีนที่สร้าง enterocin I เป็นยีนที่อยู่บน plasmid ขนาด 23 กิโลเบส

2.11 การแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ (purification of bacteriocin)

วิธีการที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบันในการแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์มีขั้นตอนดังนี้ เลี้ยงแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม จากนั้นนำ culture ของแบคทีเรียดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เซลล์ของแบคทีเรียตกตะกอนและเก็บส่วนใส (supernatant) ซึ่งมีแบคเทอริโอซินละลายอยู่ไปผ่านขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วย ammonium sulfate (ตะกอนโปรตีนที่ได้จะประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดผสมกันอยู่) นำตะกอนโปรตีนที่ได้ไปละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม จากนั้นนำสารละลายโปรตีนดังกล่าวไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี dialysis ซึ่งเป็นการกำจัดเกลือต่างๆ และโปรตีนที่มีขนาดเล็กๆ ออกจากสารละลายโปรตีน หลังจากนั้นจึงทำการแยกโปรตีนต่างๆ ที่อยู่ในสารละลายโปรตีนออกจากกัน โดยวิธี column chromatography ก่อนที่จะนำโปรตีนแต่ละชนิดที่แยกได้ไปทดสอบว่าโปรตีนใดเป็นแบคเทอริโอซิน ตัวอย่างแบคเทอริโอซินที่ถูกแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีดังกล่าว เช่น acidocin J 1299 (Tahara and Kanatani, 1996), lacticin 481 (Piard *et al.*, 1992), leuconocin A-UAL 187 (Hastings *et al.*, 1991), pediocin AcH (Bhunia *et al.*, 1988) และ helveticin J (Joerger and Klaenhammer, 1986) อย่างไรก็ตามการแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์โดยวิธีการดังที่กล่าวต้องใช้เวลานานและใช้วัสดุอุปกรณ์ที่มีราคาค่อนข้างแพง นอกจากนี้ยังประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ หลายขั้นตอน ซึ่งในแต่ละขั้นตอนก็จะมีการสูญเสียแบคเทอริโอซินไป ดังนั้นวิธีการในการแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นจึงเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ

Yang *et al.* (1998) ได้เสนอวิธีการในการแยกแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพค่อนข้างสูงและมีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยากโดยอาศัยความแตกต่างของ pH เมื่อ pH มีค่า 6 ถึง 6.5 ผิวเซลล์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรียจะสามารถจับกับแบคเทอริโอซินได้มากที่สุด แต่เมื่อระดับ pH ลดลงเหลือ 2 หรือต่ำกว่า ผิวเซลล์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรียจะไม่สามารถจับกับแบคเทอริโอซินได้ และแบคเทอริโอซินก็จะหลุดออกจากผิวของเซลล์แบคทีเรียและละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งถ้าทำการกำจัดเอาเกลือต่างๆ ออกจากสารละลาย โดยวิธี dialysis ก็จะทำให้ได้สารละลายแบคเทอริโอซินที่บริสุทธิ์ ซึ่งวิธีการดังกล่าวนอกจากจะสกัดแบคเทอริโอซินได้ในปริมาณมากแล้วยังเป็นวิธีที่ง่ายในการปฏิบัติการ ขั้นตอนไม่ซับซ้อน รวมทั้งไม่ต้องใช้วัสดุอุปกรณ์ที่มีราคาแพง ตัวอย่างแบคเทอริโอซินที่ถูกแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการของ Yang เช่น lactococcin R (Yildirim and Johnson, 1998) และ pediocin AcM (Elegado *et al.*, 1997) เป็นต้น

2.12 การนำแบคเทอริโอซินไปใช้ประโยชน์

แลคติคแอสิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทโปรตีนและมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะโดยแบคเทอริโอซินจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีบริเวณรับจำเพาะ (specific receptor) ต่อแบคเทอริโอซินเท่านั้น จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคเทอริโอซินหลายชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียหรือจุลินทรีย์ก่อโรคได้ จึงมีนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากให้ความสนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาแบคเทอริโอซินให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารหรือในทางการแพทย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

แต่ในปัจจุบันมีเพียง nisin เท่านั้นที่เป็นแบคเทอริโอซินที่ได้รับการรับรองจาก Food and Drug Administration (FAD) และ World Health Organization (WHO) ว่ามีความปลอดภัยสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุกันเสียในอุตสาหกรรมอาหารได้ เช่น อุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง การผลิตเนย น้ำผลไม้ นม และผลิตภัณฑ์นม เป็นต้น ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาแบคเทอริโอซินชนิดอื่นเพื่อที่จะพัฒนาให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่นเดียวกับ nisin

การใช้แบคเทอริโอซินในอุตสาหกรรมอาหารจำเป็นต้องคำนึงถึงองค์ประกอบหลายอย่าง เนื่องจากโครงสร้าง องค์ประกอบของอาหาร หรือปริมาณไขมัน ที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาจทำให้ประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินลดลง ความร้อน ค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงหรือการปนเปื้อนของเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ ในระหว่างการผลิตก็จะมีผลต่อความคงตัวของแบคเทอริโอซินได้เช่นกัน จึงมักมีการใช้เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินเติมลงในกระบวนการผลิตอาหารแทนการเติมแบคเทอริโอซิน ซึ่งนอกจากจะเป็นหัวเชื้อ (starter culture) แล้วยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ด้วย นอกจากนี้ยังได้มีการนำเอาแบคเทอริโอซินไปใช้ร่วมกับวิธีการต่างๆ เพื่อทำให้แบคเทอริโอซินมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

ตารางที่ 2 การนำแบคเทอริโอซินไปใช้ร่วมกับวิธีการต่างๆ เพื่อยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

Bacteriocins	Inactivation effects
In combination with heat	
Nisin	Nisin (1,000 IU/g) enhances inactivation of *L. monocytogenes* in lobster by mild heat 60 or 65 ^{0}C.
	Nisin (500 to 2,500 IU/ml) enhances inactivation of *Salmonella enteritidis* by mild heat 55 ^{0}C.
Nisin, Pediocin AcH	Both bacteriocins reduced the viability of gram-negative and gram-positive bacterial cells surviving sublethal stress.
In combination with chealating agents	
Nisin	When use with EDTA, citrate or lactate, nisin (2,000 IU/ml) is effective against *S. typhimurium* and *E. coli* O157:H7.
	When use with modified atmosphere packaging (MAP) and low temperature, nisin at a level of 400 IU/ml increases the lag phase of *L. monocytogenes* and at 1,250 IU/ml prevents its growth.
	Combined use of MAP (100% CO_2, 80% CO_2 + 20%air) and nisin (1,000 or 10,000 IU/ml) inhibits growth of *L. monocytogenes* and *P. fragi.*
In combination with antimicrobials	
Nisin	Combined use of potassium sorbate (0.3%) and nisin (400 U/ml) inhibited the growth of *L. monocytogenes.*
	Nisin 100 IU/ml and monolaurin 0.25 mg/ml act synergistically against *Bacillus* sp. vegetative cells in milk.
Pediocin AcH	Synergistic effects between sodium diacetate (0.3 and 0.5%) and pediocin (5000 AU/ml) against *L. monocytogenes.*

ตารางที่ 2 การนำแบคเทอริโอซินไปใช้ร่วมกับวิธีการต่างๆ เพื่อยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (ต่อ)

Bacteriocins	**Inactivation effects**
In combination with Lactoperoxidase system	
Nisin	A synergistic and lasting bactericidal effect on *L. monocytogenes* between nisin (100 or 200 IU/ml) and lactoperoxidase system. Synergistic effect of nisin (10 or 100 IU/ml) an the lactoperoxidase system on inactivation of *L. monocytogenes* in skim milk.
In combination with other bacteriocins	
Leucocin F10	In combination with nisin, leucocin F10 provides greater activity against *L. monocytogenes*.
Curvaticin	Simultaneous or sequential additions of nisin 50 IU/ml and curvaticin 13 (160 AU/ml) induceds a greater inhibitory effect against *L. monocytogenes* than the use of a single bacteriocin.
In combination with high hydrostatic pressure	
Nisin	Nisin 100 IU/ml increases pressure 155 to 400 Mpa inactivation of *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *Shigella sonnei*, *P. fluorescens* and *S. aureus*. Nisin 4,000 IU/g in combination with pressure 350 Mpa and glucono-delta-lactone 1% extends the shelflife of poultry meat.
Pediocin AcH	Pediocin AcH 3,000 AU/ml enhances pressure 345 Mpa inactivation of *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *P. fluorescens*, *Lb. sake*, *L. mesenteroides* and *Serratia liquefaciences*.
Lacticin 3147	Lacticin 3147 10,000 or 15,000 AU/ml causes increased pressure 150 to 275 Mpa inactivation of *S. aureus* and *Listeria innocua* in milk and whey.

ที่มา : Chen and Hoover (2003)