

## บทที่ 2

### ปริทัศน์เอกสารข้อมูล

#### 2.1 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

##### 2.1.1 ลักษณะของคีเฟอร์ (Kefir)

นมคีเฟอร์เป็นผลิตภัณฑ์นมที่มีการหมักเพื่อผลิตนมที่มีกรดและแอลกอฮอล์เล็กน้อย กรดในนมชนิดนี้เป็นกรดแลคติกและกรดแลคติก ทำให้เกิดความเปรี้ยว นมหมักคีเฟอร์ผลิตจากการหมักนมกับเม็ดคีเฟอร์ (Kefir grain) การทำนมคีเฟอร์ เดิมทีแพร่หลายในชนเผ่าพื้นเมืองของพวกคอเคซัส โดยพระธิดาจากเทือกเขาเกียนเป็นคนเผยแพร่ และศาสตราจารย์นายแพทย์ชาวโปแลนด์นำไปเผยแพร่ในยุโรปเนื่องจากสามารถรักษา มะเร็งได้ ต่อมาได้กระจายทั่วไปในกลุ่มประเทศทางตะวันตก การหมักนมคีเฟอร์ในชนเผ่าดั้งเดิม หมักไว้ในถุงหนังสัตว์แล้ววางไว้ในตู้ประตู้บ้าน เมื่อคนผ่านเข้าออกประตูบ้านก็จะผลักถุงหรือแตะถุงนมเพื่อให้เกิดการผสมกันของนม สำหรับในประเทศไทยส่วนใหญ่ได้รับเม็ดคีเฟอร์มาจากประเทศไซเบต “เม็ดคีเฟอร์” หรือที่รู้จักกันในนามของชื่อ “บัวหิมะ” คือ การรวมกลุ่มของจุลินทรีย์หลายชนิดประกอบด้วย Lactic acid bacteria, Lactococci, Leuconostoc และ yeast หลากหลายชนิดรวมถึงจุลินทรีย์ อื่น ๆ อีกหลายชนิด (Mascher *et al.*, 2003)

##### 2.1.2 ลักษณะเม็ดคีเฟอร์

ลักษณะเม็ดคีเฟอร์จะมีสีขาวเหมือนดอกกะหล่ำ จุลินทรีย์เหล่านี้มาเกาะกลุ่มรวมกัน (Cluster) แบบเอื้อประโยชน์แก่กันเป็นความสัมพันธ์แบบพึ่งพา (Symbiosis) (Pintado *et al.*, 1996; Frengova *et al.*, 2002) สร้างสารอาหารที่มีประโยชน์เป็นส่วนผสมในนมคีเฟอร์ แบคทีเรียและยีสต์หลายชนิดนี้ จะมีชีวิตอยู่รอดและเจริญได้ดีต้องอาศัยการอยู่ร่วมกัน ต้องอาศัยซึ่งกันและกัน ชีวิตหนึ่งจะอยู่รอดได้ขึ้นอยู่กับสิ่งมีชีวิตอีกหลายสายพันธุ์ เมื่อจุลินทรีย์ทั้งหลายเหล่านี้มาอยู่ร่วมกันก็จะสร้างสารที่มีประโยชน์การแยกสายพันธุ์บริสุทธิ์ออกมาเป็นสิ่งที่ทำได้ยาก ถ้าแยกกันอยู่จุลินทรีย์เหล่านี้ไม่สามารถที่จะเจริญเติบโตได้ และกิจกรรมทางชีวเคมีที่สร้างสารที่มีประโยชน์จะลดลง นี่คือตัวอย่างการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยอย่างแท้จริง (Mascher *et al.*, 2003)

##### 2.1.3 ประโยชน์ของนมคีเฟอร์

1) มีกรดโฟลิก (Folic acid) จำนวนมาก โดยเฉพาะหากทิ้งไว้ถึง 48 ชั่วโมง กรดโฟลิกจะเพิ่มมากถึง 116 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาณของนมเดิม กรดโฟลิกทำหน้าที่สร้างเลือด เม็ดเลือดแดงและป้องกันการพิการของทารกแรกเกิด จากผลการวิจัยพบว่า นมคีเฟอร์สามารถดื่มขณะมีครรภ์และสามารถนำมาเลี้ยงทารกได้

2) มีน้ำตาลเชิงซ้อนที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ คีเฟอร์แรน (Kefiran) ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น ทำเครื่องสำอาง ใช้นมคีเฟอร์ทาใบหน้าจะช่วยกระชับรูขุมขน ทำให้ใบหน้าดูอ่อนเยาว์เต่งตึง และยังช่วยขจัดสิว คีเฟอร์แรนยังช่วยป้องกันการเกิดแผลพุพองในปากที่เกิดจากเชื้อรา (Thrush) ชนิด *Candida albicans*

3) มีวิตามินบีรวมหลายชนิด B6, B12, B13

- 4) ช่วยขยายเส้นเลือด ทำให้โลหิตมีการไหลเวียนดี เนื่องจากผลการหมักนมจะมี แอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบเล็กน้อย ตั้งแต่ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ไม่เกิน 1.5 เปอร์เซ็นต์
- 5) มีวิตามิน K ช่วยในการทำงานของตับไต
- 6) ช่วยให้ระบบต่าง ๆ ของร่างกายสร้างระบบภูมิคุ้มกันชีวิตที่ดีขึ้น รักษาภูมิแพ้
- 7) สามารถป้องกันโรคหัวใจ และระบบการทำงานของหัวใจที่บกพร่อง
- 8) ช่วยให้การทำงานของตับ ม้ามดีขึ้น
- 9) ป้องกันโรคนิวในถุงน้ำดี และช่วยสลายนิ่วในถุงน้ำดี
- 10) สร้างภูมิคุ้มกันให้ร่างกาย ขจัดเชื้อโรคที่จะเข้าสู่ร่างกาย
- 11) ช่วยปรับความดันโลหิตให้ปกติ
- 12) ระวังการแพร่กระจายของโรคมะเร็ง
- 13) ช่วยให้การทำงานของไต และกระเพาะปัสสาวะดีขึ้น
- 14) ทำให้ร่างกายสดชื่น ไม่อ่อนเพลีย ลดความเครียดได้ เพราะในคีเฟอร์มี Tryptophan จำนวนมาก ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็น ช่วยการทำงานของระบบประสาท นอกจากนี้ในนมคีเฟอร์ยังมี แคลเซียม (Ca) และ แมกนีเซียม (Mg) มากทำให้ความเครียดคลายลง
- 15) เนื่องจากนมชนิดนี้มีสภาพเป็นกรด จึงมีคุณค่าในการบำบัดโรค (Therapeutic) ของระบบทางเดินอาหาร โดยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในนมคีเฟอร์ จะผลิตกรดออกมามีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสีย ในลำไส้ และรักษาแผลในกระเพาะลำไส้ ลดการเกิดแก๊สในทางเดินอาหาร แก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ และยังช่วยย่อยจึงทำให้ระบบขับถ่ายดี เนื่องจากนมคีเฟอร์อุดมสมบูรณ์ไปด้วยแร่ธาตุ และกรดอะมิโนที่จำเป็นมากชนิด จึงรักษาสุขภาพร่างกายได้แข็งแรง และโปรตีนในนมคีเฟอร์เป็นโปรตีนโมเลกุล ที่ง่ายต่อการดูดซึมไปเสริมสร้างร่างกาย ทำให้ร่างกายกลับมาดีสุขภาพที่ดีขึ้น นอกจากนี้ เม็ดคีเฟอร์ยังช่วยลดคอเลสเตอรอล โดยถ้าหมักนม 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส คอเลสเตอรอลในนมจะลดลง 22.63 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาณเริ่มต้น หมัก 48 ชั่วโมง คอเลสเตอรอลในนมจะลดลง 41.84 เปอร์เซ็นต์ ปัจจุบันมีการทดลองนำคีเฟอร์มารักษาคันไซโรคเลียด เช่น ทาลาสซีเมีย โลหิตจาง โรคเกร็ดเลือดต่ำ
- 16) ใช้ลดความอ้วนได้ ด้วยการดื่มนมคีเฟอร์แทนอาหารมื้อค่ำ
- 17) ช่วยย่อยน้ำตาลแลคโตส ไม่ว่าจะเป็นผู้ใหญ่หรือเด็กที่มีปัญหาเกี่ยวกับขาดเอนไซม์ย่อยน้ำตาลในนม เมื่อดื่มนมคีเฟอร์แล้ว จุลินทรีย์ในนมคีเฟอร์จะช่วยย่อยน้ำตาลในนม ทำให้สามารถดื่มนมทุกชนิดได้โดยท้องไม่เสีย (พิมพ์พิเศษ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนานนท์, 2556)

## 2.2 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลคติก

การนิยามและการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB) มีการให้นิยามเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่อง ในอดีตนั้นหมายถึงกลุ่มแบคทีเรียที่ทำให้น้ำนมเปรี้ยวจากการผลิตกรด ซึ่งรวมถึงแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มโคลิฟอร์มด้วย (Stiles and Holzapfel, 1997) ปัจจุบันแม้ไม่มีนิยามที่ชัดเจนและเป็นเอกฉันท์ แต่ลักษณะพื้นฐานซึ่งยอมรับทั่วไปของแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ขาดเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) ขาดไซโตโครม ทนต่อสภาวะมีอากาศ (Aero tolerant) ทนต่อความเป็นกรด ต้องการสารอาหารสูงในการเติบโต และผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักจาก

การหมักน้ำตาล ลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่า มีทั้งรูปร่างแท่งและรูปร่างกลม การจัดเรียงกลุ่มแบคทีเรียแลคติกในสกุลต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับรูปร่างลักษณะรูปแบบของการหมักน้ำตาลกลูโคส การใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ และการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ การผลิตเกลือแลคติกเจริญในที่มีเกลือความเข้มข้นสูง และการทนต่อกรดหรือต่าง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติกได้แก่ *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostos* อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกลุ่มนี้บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียม (Pseudocatalase) ซึ่งขาดกลุ่มพอร์ไฟริน (Porphyrin group) และในสภาวะจำกัดสารอาหารกลุ่ม *Streptococci* เช่น *Streptococcus bovis* มีการผลิตกรดแลคติกเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Wood and Holzapfel, 1997)

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถจำแนกได้เป็น 12 สกุล ได้แก่

1. *Streptococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 - 1.2 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือคู่ผลิตภัณฑ์กรดแลคติกชนิด L (+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส (Homofermentative) ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ มีหลายสปีชีส์เป็นปรสิตในคนหรือสัตว์และบางสปีชีส์สามารถทำให้เกิดโรคได้ เจริญที่อุณหภูมิ 20 - 41 องศาเซลเซียส ปัจจุบันประกอบด้วย 39 สปีชีส์ มีเปอร์เซ็นต์โมล G + C ระหว่าง 34-46 เปอร์เซ็นต์ (Hardie and Whiley, 1995)

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

3. *Lactococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 - 1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตภัณฑ์กรดแลคติกชนิด L (+) จากการหมักกลูโคส มักใช้เป็นก้ำเชื้อ (starter) ในผลิตภัณฑ์นม สามารถเจริญได้ที่ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส พบในแหล่งต่าง ๆ เช่น ผักกาด ถั่ว หน้า มัถน์ น้่านมดิบ ปัจจุบันประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *L. Lactis ssp. Lactic*, *L. Lactis ssp. cremoris*, *L. lactis ssp. hordniae*, *L. Garvieae*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* และ *L. piscium* มีเปอร์เซ็นต์โมล G + C ระหว่าง 34 - 43 เปอร์เซ็นต์

4. *Enterococcus* เซลล์มีรูปไข่ จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว หรือสายโซ่สั้น ๆ ผลิตภัณฑ์กรดแลคติก ชนิด L (+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ สามารถเจริญที่ 10 หรือ 45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียมได้ และบางสปีชีส์ทำให้เกิดโรค ปัจจุบันประกอบด้วย 5 กลุ่มสปีชีส์ ได้แก่ กลุ่ม *Enterococcus faecalis*, *E. avium*, *E. gallinarum* และ *E. cecorum* มีเปอร์เซ็นต์โมล G + C ระหว่าง 37-40 เปอร์เซ็นต์

5. *Pediococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36-1.43 ไมครอน แบ่งตัวลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน โดยแบ่งตัวครั้งที่ 2 ในทิศด้านขวามือของครั้งแรก ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์ 4 เซลล์ติดกันคล้ายจตุรัส (tetrad formation) ในสภาวะไม่มีอากาศ ผลิตภัณฑ์กรดแลคติกชนิด DL และ L (+) จากการหมักกลูโคสบางสปีชีส์ทำให้เปียร์และไวน์เสีย ปัจจุบันประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Pediococcus acidilactici*, *P. damonosus*, *P. dextrinicus*, *P.*

*inopinatum*, *P. parvulus* และ *P. pentosaceus* มีเปอร์เซ็นต์โมล G + C ระหว่าง 34–44 เปอร์เซ็นต์ (Stiles and Hozapfel, 1997)

6. *Tetragenococcus* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* เนื่องจากเดิม คือ สปีชีส์ *P. halophilus* ซึ่งจัดจำแนกใหม่จากการเจริญในอาหารซึ่งมีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับเบสบน 16s rRNA ใกล้เคียงกับเชื้อสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม

7. *Aerococcus* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Aerococcus viridians* และ *A. urinae* ซึ่งเปลี่ยนแปลงจาก *P. homari* และ *P. urinaeequi* ตามลำดับ โดย *A. viridians* ทำให้กึ่งลอบสเตอร์เกิดโรคและเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในคน (Stiles and Holzapfel, 1997)

8. *Leuconostoc* เซลล์มีสัณฐานขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ในอาหารซึ่งมีกลูโคสเซลล์มีลักษณะยีสต์ออกคล้ายกลุ่ม *Lactobacilli* แต่ในน้ำนมเซลล์จะมีรูปร่างกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว อยู่เป็นคู่หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลางผลิตภัณฑ์กรดแลคติกชนิด D (-) เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์และ สารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส (Heterofermentative) จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง การเจริญต้องการสารอาหารสูง ปัจจุบันประกอบด้วย 8 สปีชีส์ *Leuconostoc mesenteroides*, *L. lactis*, *L. gelidum*, *L. carnosum*, *L. pseudomesenteroides*, *L. citreum*, *L. argentinum* และ *L. fallax* (Stiles and Holzapfel, 1997) มีเปอร์เซ็นต์โมล G+C ระหว่าง 37-40 เปอร์เซ็นต์ (Dellaglio et al., 1995)

9. *Oenococcus* ประกอบด้วยสปีชีส์เดียวคือ *Oenococcus oeni* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Leuc. oenos* ด้วยสมบัติการทนต่อกรดและเอทานอลปริมาณสูง รวมทั้งข้อมูลพันธุกรรมจากดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอไฮบริโดเซชัน และลำดับเบสของ 16s rRNA ต่างจากสปีชีส์อื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่าง ชัดเจน (Dellaglio et al., 1995)

10. *Weissella* ประกอบด้วยแบคทีเรีย 7 สปีชีส์ ซึ่งลักษณะคล้าย *Leuconostoc* รูปร่างเซลล์เป็นแท่งและกลม มีสปีชีส์ซึ่งเดิมอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* คือ *L. paramesenteroides* (*Weissella paramesenteroides*), *Lactobacillus confusus* (*W. confusus*), *Lb. halololerans* (*W. halotolerans*), *Lb. kandleri* (*W. kandleri*), *Lb. minor* (*W. minor*), *Lb. viridescens* (*W. viridescens*) และสปีชีส์ที่แยกได้จากไส้กรอกหมัก คือ *W. hellenica* (Stiles และ Holzapfel, 1997)

11. *Actobacillus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของ ลักษณะทางพีโนไทป์ สมบัติทางชีวเคมีและสรีระ เนื่องจากความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์โมล G + C ภายในสกุลสูงคือระหว่าง 32-53 เปอร์เซ็นต์ พบในแหล่งต่าง ๆ เช่น เยื่อเมือกของมนุษย์และสัตว์ พืช และน้ำทิ้ง เป็นต้น บางสปีชีส์เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในมนุษย์ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนหรือ ทรงรี (cocci) ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ ประกอบด้วย 55 สปีชีส์ ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (Stiles and Holzapfel, 1997) คือ กลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli หมักน้ำตาล แลคโทส (มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์) เป็นกรดแลคติกโดยวิถี Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) ผลิต เอนไซม์ 1, 6 biphosphate–aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทส และกลูโคสไม่ได้ ประกอบด้วย 18 สปีชีส์ กลุ่ม Facultatively heterofermentative lactobacilli

หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลคติกผ่านวิถี EMP มีการผลิตเอนไซม์ทั้ง aldolase และ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทสได้ กลุ่ม Obligately heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซส และ เพนโทส ผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนทเป็น แลคเตท เอทานอล และ คาร์บอนไดออกไซด์ ประกอบด้วย 19 สปีชีส์

12. *Carnobacterium* เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรงขนาดสั้นถึงปานกลางหรือเป็นท่อนเรียว (Slender rod) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 – 0.7 ไมครอน และยาว 1.1–3.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ มักไม่พบการเรียงเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติก ชนิด L (+) คาร์บอนไดออกไซด์ อะซีเตท และเอทานอลจากการหมักน้ำตาลเฮกโซส ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ คือ *Carnobacterium divergens*, *C. piscicola*, *C. mobile*, *C. funditum* และ *C. alterfunditum* มีเปอร์เซ็นต์โมล G+C ระหว่าง 31.6 - 37.2 เปอร์เซ็นต์ (Stiles และ Holzapfel, 1997)

#### 2.2.1 สารยับยั้งที่ได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้สารแบคทีเรียที่สร้างขึ้นมีดังนี้

2.2.1.1 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) สามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นได้ โดยแบคทีเรียแลคติกสามารถทำปฏิกิริยากับ Endogenous thiocyanate ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย Lactoperoxidase เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ Intermediary oxidation ซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ สามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษานมสดได้โดยไม่ต้องแช่ตู้เย็น

2.2.1.2 ไดอะซีทิล (Diacetyl 2, 3 -butanedione) เป็นผลจากการย่อยสลายอาหารจากแบคทีเรีย แลคติกบางสปีชีส์ เป็นสารให้กลิ่นในผลิตภัณฑ์นมหมัก และยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ แต่ต้องใช้ในปริมาณมาก และทำให้มีกลิ่นรบกวน

3 รูเทอริน (Reuterin) เป็นสารที่มีโมเลกุลต่ำที่ไม่ใช่โปรตีนและสามารถละลายน้ำได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เช่น ยีสต์ รา รวมทั้งโปรโตซัว จึงสามารถนำไปใช้ในการถนอมอาหารเพื่อลดจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และทำให้อาหารไม่เน่าเสียจากแบคทีเรีย

2.2.1.4 ไมโครการ์ด (Microgard) สามารถต่อต้านแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา แต่ไม่ต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวก ประกอบด้วย กรดโพรพิโอนิก ไดอะซีทิล กรดอะซิติก และกรดแลคติก

2.2.1.5 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) เป็นสารที่มีผลในการยับยั้งในช่วงแคบ เป็นผลิตจากแบคทีเรียที่ผลิตออกมายับยั้งเฉพาะแบคทีเรียในจีนัสเดียวกัน และยับยั้งในช่วงกว้าง เป็นแบคทีเรียที่มีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (Dasechel and Klaenhammer, 1989)

#### 2.2.2 ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย และทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยนำแบคทีเรียที่แยกได้ประมาณ 1000 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas fragi* และ *Lactobacillus bulgaricus* ผลการทดลองพบว่าส่วนใหญ่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ 1 ชนิด มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้มากกว่า 1 ชนิด จึงได้ทำการทดลองเชื้อ *Lactobacillus lactis* 280 สายพันธุ์ พบว่ามีเพียง 16 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน เช่น สายพันธุ์

*L. lactis* ssp. *lactis* var *diacetylactis* สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ร้อยละ 1 สายพันธุ์ *L. lactis* ssp. *cremoris* ผลิตได้ร้อยละ 5 และสายพันธุ์ *L. lactis* ssp. *lactis* ผลิตได้ร้อยละ 9 โดยแบคทีเรียโอซินที่ผลิตได้จะถูกยับยั้งกิจกรรมโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนและทำให้ตกตะกอนได้ (Vandenbergh, 1993)

## 2.3 สารต้านจุลชีพ (Antimicrobial agents)

ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics) หมายถึง สารที่สร้างขึ้นและแยกได้จากเชื้อจุลชีพชนิดหนึ่ง และออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายเชื้อจุลชีพอีกกลุ่มหนึ่ง ส่วนสารต้านจุลชีพ (Antimicrobial agents) หมายถึง กลุ่มของสารหรือยาที่แยกได้จากเชื้อจุลชีพหรือกิ่งสังเคราะห์เหมือนสารที่แยกได้จากเชื้อจุลชีพ และที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีโดยตรงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญหรือทำลายเชื้อจุลชีพ ดังนั้น สารต้านจุลชีพจึงมีความหมายรวมถึงยาปฏิชีวนะด้วย อาจกล่าวได้ว่า สารต้านจุลชีพเป็นสารที่ใช้สำหรับทำลาย หรือ ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพที่ทำให้เกิดการติดเชื้อหรืออักเสบในร่างกายคนเรา ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา เชื้อโปรโตซัว (เช่น มาลาเรีย บิดอะมีบิ) และเชื้อริกเกตเซีย (เช่น ไทฟัส) แต่จะไม่ได้ผลต่อเชื้อไวรัส (เช่น ไข้หวัด ไข้หวัดใหญ่ หัด อีสุกอีใส คางทูม) แต่อย่างใด (กองเผยแพร่และควบคุมโฆษณา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2552)

### 2.3.1 การจำแนกประเภทของสารต้านจุลชีพ

สารต้านจุลชีพ จำแนกเป็นประเภทต่าง ๆ ได้หลายแบบ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ หลักเกณฑ์ในการจำแนก

#### 2.3.1.1 จำแนกตามสูตรโครงสร้างทางเคมี

- 1) เบต้า-แลคแทม แอนติไบโอติก (Lactam antibiotics) เพนิซิลิน (Penicillins) เซฟาโลสปอริน (Cephalosporins)
- 2) แมโครไลด์ (Macrolides) เช่น อีริโทรมัยซิน
- 3) ลินโคซามายด์ (Lincosamides) เช่น ลินโคมัยซิน
- 4) อะมิโนกลัยโคไซด์ (Aminoglycosides) เช่น เจนตามิซิน
- 5) เตตราไซคลิก (Tetracyclines) เช่น เตตราไซคลิก
- 6) โพลีเปปไทด์ (Polypeptides) เช่น แวนโคมัยซิน
- 7) ซัลโฟนาไมด์ (Sulfonamides) เช่น ซัลฟาไดอะซีน
- 8) ฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolones) เช่น เอ็นโรฟลอกซาซิน
- 9) กลุ่มอื่น ๆ เช่น คลอแรมเฟนิคอล ไนโตรฟูแรนโตอิน

#### 2.3.1.2 จำแนกตามขอบเขตการออกฤทธิ์

- 1) Broad spectrum ยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เช่น แอมพิซิลลิน (Ampicillins) หรือออกฤทธิ์ทั้งต่อแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนด้วย ได้แก่ คลอแรมเฟนิคอล (Cloramphenicol) นอกจากนี้ยังอาจครอบคลุมทั้งโปรโตซัว และริกเกตเซีย ได้แก่ เตตราไซคลิก (Tetracyclines) คลอแรมเฟนิคอล (Choramphenicol) เมโทรนิดาโซล (Methronidazole)

2) Medium spectrum ยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบางชนิดเท่านั้น ได้แก่ ซัลโฟนาไมด์ (sulfonamides)

3) Narrow spectrum ยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียบางชนิด มีฤทธิ์ส่วนใหญ่ต่อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ คล็อกซาซิลลิน (Cloxacillin) หรือมีฤทธิ์ส่วนใหญ่ต่อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ อะมิโนกลัยโคไซด์ (Aminoglycosids) (กองเผยแพร่และควบคุมโฆษณา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2552)

### 2.3.1.3 การจำแนกตามกลไกออกฤทธิ์

1) Bactericidal หมายถึง ยาต้านจุลชีพมีฤทธิ์ฆ่าหรือทำลายเชื้อจุลชีพ โดยทั่วไปมักมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ และต่อเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย

2) Bacteriostatic หมายถึง ยาต้านจุลชีพมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ มักมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีน ดังนั้น จึงต้องการระบบภูมิคุ้มกันเซลล์เม็ดเลือดขาวเพื่อเก็บกินเชื้อจุลชีพ ถ้าเพิ่มขนาดยามากขึ้นยาต้านจุลชีพเหล่านี้อาจออกฤทธิ์ฆ่าหรือทำลายเชื้อจุลชีพ

### 2.3.1.4 จำแนกตามกลไกการออกฤทธิ์

1) ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ เช่น เพนิซิลลิน เซฟาโลสปอริน  
แวนโคมัยซิน

2) ออกฤทธิ์ต่อเซลล์เมมเบรน เช่น โพลีมิกซิน-บี คีโตโคนาโซล แอมโฟเทอริซิน-บี

3) ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีน เช่น คลอแรมเฟนิคอล เตตราซัยคลิน  
อีริโทรมัยซิน และ อะมิโนกลัยโคไซด์

4) ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก เช่น ไรแฟมปีซิน ควิโนโลน  
เมโทรนิดาโซล

5) รบกวนการสังเคราะห์เมตาบอไลต์ที่จำเป็นในการดำรงชีพของเชื้อจุลชีพ เช่น  
ซัลโฟนาไมด์ ไอโซโนอะซิด

ยาต้านจุลชีพที่ดีควรออกฤทธิ์ต่อเชื้อจุลชีพเท่านั้น ไม่ควรมีผลต่อเซลล์ของร่างกายผู้ป่วย ยาต้านจุลชีพที่มีการออกฤทธิ์อย่างเลือกเฟ้น (Selective) โดยเฉพาะเชื้อ ได้แก่ กลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ เช่น ยาปฏิชีวนะกลุ่ม เบต้า-แลคแทม ยากลุ่มนี้จึงใช้ได้ค่อนข้างปลอดภัย ส่วนยาต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีน โดยจับกับไรโบโซมซึ่งเป้าหมายที่มีทั้งในเซลล์ของแบคทีเรียและเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่พบว่า ไรโบโซมแตกต่างกัน กล่าวคือ ไรโบโซมของแบคทีเรียเป็น 70s ส่วนไรโบโซมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็น 80s ยกเว้นในไมโตคอนเดรีย ในเซลล์ไขกระดูกเป็น 70s ดังนั้นยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ โดยจับกับไรโบโซม จึงพบว่าค่อนข้างปลอดภัย แต่บางชนิดอาจเกิดอาการข้างเคียงถึงขั้นเป็นพิษได้ เช่น คลอแรมเฟนิคอล จึงต้องใช้ใช้อย่างระมัดระวัง (กองเผยแพร่และควบคุมโฆษณา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2552)

## 2.4 แบคทีริโอซิน (Bacteriocins)

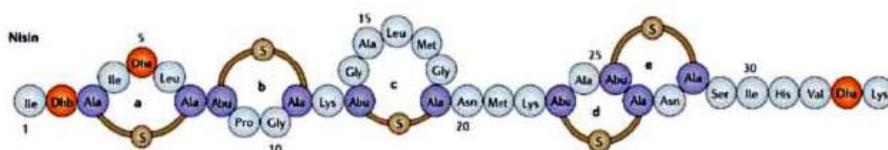
แบคทีริโอซินเป็นโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรียมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นได้ ปกติแบคทีเรียที่สร้างแบคทีริโอซินจะมีภูมิคุ้มกันต่อแบคทีริโอซินที่ตัวเองสร้างออกมา

ดังนั้นจึงทำให้ไม่ถูกยับยั้งจากแบคทีเรียโอซินของตัวเอง การสร้างแบคทีเรียโอซิน ของเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่าเกิดจากการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่มีเชื้อหลายชนิดเจริญอยู่ร่วมกันทำให้เชื้อที่สร้างแบคทีเรียโอซินสามารถแย่งอาหารและพื้นที่เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ส่วนเชื้อชนิดอื่นที่ไม่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้จะตายในที่สุด การศึกษาทางด้านสสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยทั่วไป อาจจะมีความสับสนหรือไม่แน่ใจระหว่างแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะ ได้สรุปความต่างระหว่าง แบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะไว้ดังแสดงในตาราง 2.1 (พงษ์เทพ วิไลพันธ์, 2546)

ตาราง 2.1 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะ

ลักษณะและคุณสมบัติ	แบคทีเรียโอซิน	สารปฏิชีวนะ
การนำไปใช้งาน	ทางอาหาร	ทางการแพทย์
กระบวนการสังเคราะห์	ผลิตจากไรโบโซม	ผลิตโดยผ่านกระบวนการที่เป็น secondary metabolite
ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายที่มีความหลากหลาย	น้อย	มาก
การสร้างระบบภูมิคุ้มกันตนเองของเซลล์ผู้ผลิต	มี	ไม่มี
กลไกในการต่อต้านของเซลล์เป้าหมาย	โดยปรับสภาพองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์	โดยการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม
ลักษณะของปฏิกิริยาบนเซลล์เป้าหมาย	ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์หรือโครงสร้างภายในเซลล์
ความเป็นพิษหรือผลข้างเคียง	ยังไม่มีรายงาน	มี

ที่มา: พงษ์เทพ วิไลพันธ์ (2546)



ที่มา: Gosaarak (2006)

ภาพประกอบ 2.1 โครงสร้างของ ไนซิน (nisin: Aba: amino butyric; Dha: dehydroalanine; Dhb: dehydrobutyrate ( $\beta$ -methyldehydroalanine); Ala-S-Ala: lanthionine; Aba-S-Ala:  $\beta$ -methyl(lanthionine))

แบคทีเรียโอซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียในลำไส้ที่ทำให้เกิดโรค เช่น *Salmonella* หรือ *Shigella* ได้ด้วย (Klaenhammer, 1988; Daeschel, 1993) ตัวอย่างเช่น ไนซิน (nisin) เป็น

แบคทีเรียโอซินชนิดเดียวที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา สหรัฐอเมริกา (US. Food and Drug Administration) ให้ใช้ได้ในการบริโภค โครงสร้างทางเคมีเกิดจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นสายยาว และยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มนี้ที่ใกล้เคียงกันโดยที่แบคทีเรียแลคติกแต่ละสายพันธุ์จะให้คุณสมบัติของแบคทีเรียโอซินที่แตกต่างกันไป ทั้งคุณสมบัติในการยับยั้งของแบคทีเรียชนิดอื่น โครงสร้างโมเลกุลสมบัติทางพันธุกรรมและสมบัติทางชีวเคมี (Klaenhammer, 1998; Stiles and Hastings, 1991)

#### 2.4.1 การจัดแบ่งประเภทของแบคทีเรียโอซิน (Classification of bacteriocin)

การแบ่งประเภทของแบคทีเรียโอซินโดยการพิจารณาจากโครงสร้างของโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุล มวลโมเลกุล และคุณสมบัติอื่น ๆ เช่น คุณสมบัติการทนต่อความร้อน ความสามารถในการทนต่อพีเอช (pH) คุณสมบัติเหล่านี้สามารถนำมาใช้ในการแบ่งประเภทของแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติกออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ (Klaenhammer, 1993)

1) กลุ่ม lantibiotic เป็นกลุ่มที่มีสายเปปไทด์ขนาดเล็กประกอบไปด้วยจำนวนกรดอะมิโนระหว่าง 19-38 โมเลกุล โดยทั่วไปมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 5,000 ดาลตัน มีชนิดของกรดอะมิโนที่แตกต่างจากกรดอะมิโนทั่ว ๆ ไป เช่น Dehydrobutyline, Dehydroalanine ซึ่งมีวงแหวนที่เกิดจากพันธะระหว่างโมเลกุลของสารประกอบซัลเฟอร์ภายในโมเลกุลที่เรียกว่า Lanthionine และ Methyl lanthionine และเป็นแบคทีเรียโอซินชนิดที่ทนต่อความร้อน เช่น ไนซิน (Nisin) และ เมอซาไซดิน (Mersacidin)

2) กลุ่ม non lantibiotic มีขนาดเล็กและทนต่อความร้อน เป็นแบคทีเรียโอซินในกลุ่มที่มีขนาดของโมเลกุลใหญ่กว่า 15,000 ดาลตัน เป็นแบคทีเรียโอซินชนิดหนึ่งที่ทนความร้อนได้ดี สามารถแบ่งออกได้ 2 กลุ่ม ได้แก่

(1) กลุ่มของแบคทีเรียโอซินที่สามารถทำลายเชื้อ *Listeria* sp. ได้ดี เป็นสายเปปไทด์ตั้งต้นที่ถูกสร้างขึ้นมา ยังไม่สามารถใช้ทำลายเซลล์เป้าหมายได้ แต่จะถูกดัดแปลงโดยการตัดสายเปปไทด์ในตำแหน่งที่มีกรดอะมิโนไกลซีน 2 โมเลกุล ติดกันได้เป็นสายเปปไทด์ที่สมบูรณ์ และมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์เป้าหมาย เช่น pediocin PA-1, sakacin A และ leucocin A

(2) เป็นแบคทีเรียโอซินที่ประกอบด้วยเปปไทด์ 2 สาย ที่แตกต่างกัน และในการทำลายเซลล์เป้าหมายอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของสายเปปไทด์ดังกล่าว เช่น brochocin C, enterocin L 50, lactococcin G, plantarici EF, plantarcin W

3) กลุ่ม lantibiotic ที่มีขนาดใหญ่และไม่ทนความร้อน เป็นแบคทีเรียโอซินในกลุ่มที่มีขนาดของโมเลกุลใหญ่กว่า 30,000 ดาลตัน และเป็นแบคทีเรียโอซินที่ไม่ทนต่อความร้อน เช่น helveticins J, acidophilucin A, lactacins A, lactacins B

4) กลุ่มที่รวมกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขนาดใหญ่กับสารอื่น ๆ เช่น ไชมัน หรือ คาร์โบไฮเดรต

Klaenhammer (1988) แบ่งแบคทีเรียโอซินตามความสามารถในการยับยั้งเป็น 2 ชนิดคือ

1) แบคทีเรียโอซินที่มีผลในการยับยั้งในช่วงแคบ (Narrow inhibition spectrum) เป็นแบคทีเรียโอซินที่มีผลยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียในจีนัสเดียวกัน เช่น lactocin 27 จากเชื้อ *Lactobacillus helveticus* LP27 ยับยั้งเฉพาะ *Lactobacilli diplococcin* จากเชื้อ *Lactococcus*

*Lactis* ssp. *cremoris* 346 ยับยั้งเฉพาะ Lactococci หรือยับยั้งแบคทีเรียในจีนัสอื่นได้เล็กน้อย เช่น lactacin F ยับยั้ง Lactobacilli และ *Enterococcus faecalis*

2) แบคทีเรียโอซินที่มีผลยับยั้งในช่วงกว้าง (Broad inhibition spectrum) เป็นแบคทีเรียโอซินที่มีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกอื่น ๆ เช่น โนซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้ pediocin AcH จากเชื้อ *Pediococcus acidilactici* ยับยั้ง *Pediococci*, *Lactobacilli*, *Leuconostocs*, *Bacilli*, *Enterococci*, *Staphylococci*, *Listeriae* และ *Clostridia*

#### 2.4.2 รูปแบบการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของแบคทีเรียโอซิน

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคทีเรียโอซิน เกิดจากแบคทีเรียโอซินแต่ละโมเลกุลมารวมกัน ทำให้เกิดรูหรือช่องว่างที่มีลักษณะคล้ายซี่ไม้ที่มาประกอบกันเป็นถังไม้ซึ่งมีช่องว่างตรงกลาง (Barrel-stave) ที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย ซึ่งจะทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโน และสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มฟอสฟอรัส ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ ซึ่งเป็นขั้นตอน และรูปแบบในการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรียโอซิน เช่น colicins ที่ สร้างจาก *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบจะเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ ประมาณ 40-70 กิโลดาลตัน และยีนที่ควบคุมการสร้าง Colicins จะอยู่บนพลาสมิด โดย *E. coli* จะสร้าง Colicins แล้วปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ในช่วงการเจริญระยะ exponential phase รูปแบบการทำลายเซลล์เป้าหมายแบ่งได้ 3 ขั้นตอน คือ

1) บริเวณตรงกลางโมเลกุลของ colicins จะทำหน้าที่ในการจับกับตำแหน่งที่จำเพาะบนผิวเซลล์ ของแบคทีเรียเป้าหมาย

2) บริเวณปลายด้าน N (N-terminal) จะทำหน้าที่เคลื่อนย้ายโมเลกุลของ Colicins ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย

3) บริเวณปลายด้าน C (C-terminal) จะทำหน้าที่ในการทำลายเซลล์เป้าหมาย

#### 2.4.3 กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติต่างกัน ความสามารถในการยับยั้งหรือการทำลายจะแตกต่างกันด้วย สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินชนิดต่าง ๆ พอจะแบ่งได้ดังนี้

1) ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่นอกสุดของเซลล์ มีความแข็งแรงทำหน้าที่ป้องกันสิ่งที่อยู่ในเซลล์ สำหรับแบคทีเรียผนังเซลล์เป็นส่วนที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียเป็นแกรมบวก แกรมลบ โครงสร้างพื้นฐานของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดที่ต่างกัน คือ Peptidoglycan แบคทีเรียแกรมบวกจะมีส่วนนี้หนามาก ในแกรมลบจะบางกว่า และแกรมลบจะมีส่วนของ Lipopolysaccharide หุ้มอีกชั้นหนึ่ง Peptidoglycan ของแบคทีเรียจะมีโครงสร้างหลักเป็น polysaccharide ซึ่งสลับกันระหว่าง N-acetylglucosamine (GlcNAC) และ N-acetylmuramate (MurNAC) แต่มี side chain แตกต่างกันไปบ้าง แบคทีเรียโอซินจะไปยับยั้งการสร้าง Peptidoglycan ซึ่งส่งผลให้หยุดการสร้างผนังเซลล์เนื่องจากผนังเซลล์มีความสำคัญมากหากถูกทำลายหรือสร้างไม่สมบูรณ์แบคทีเรียจะตายได้ แบคทีเรียโอซินพวกนี้จึงจัดเป็น Bacteriocidal (Klaenhammer, 1988)

2) รบกวนหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนที่ถัดจากผนังเซลล์เข้ามา หน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ทั่วไป คือ osmotic barrier ที่ช่วยป้องกันไม่ให้สารต่าง ๆ เข้าหรือออกจากเซลล์ง่ายเกินไป

และเกี่ยวข้องกับระบบขนส่งเพื่อนำสารเข้า ออกเซลล์ โดยมีผลต่อ Proton motive force ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ความสมดุลของโพแทสเซียม ( $K^+$ ) ของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป โดยมีการผ่านเข้าไปในเซลล์มากขึ้นและเกิดการสะสมทำให้แรงดันในเซลล์ไม่สมดุลเซลล์จะแตกและตายในที่สุด (Klaenhammer, 1988)

3) ยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิกกรดนิวคลีอิกมี 2 ชนิด คือ Deoxyribonucleic acid (DNA) และ Ribonucleic acid (RNA) ในการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ขึ้นกับการสังเคราะห์ DNA ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมแต่ RNA มีความจำเป็นสำหรับเซลล์เพราะเป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์ โปรตีนและเอนไซม์

4) ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนได้จากการแปลรหัสบน mRNA หรือเรียกว่าขั้นตอน translation กระบวนการนี้เกิดขึ้นใน ribosome สำหรับ ribosome ของแบคทีเรียจะเป็นชนิด 70s (ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ 30s และ 50s) การยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนจะเกิดจากแบคทีเรียโอซินที่มีโครงสร้างแบบ Aminoglycoside คือมี amino sugar โมเลกุลทำให้เกิดพันธะ Glycosidic ซึ่งมีความสามารถจับกับ 30s Ribosomal subunit ทำให้ไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน และลดความสามารถในการขนส่งรหัสทางพันธุกรรม นอกจากนี้ยังทำให้การอ่านรหัสในการสร้าง mRNA ผิดพลาดเพราะบางตำแหน่งถูกบดบังส่งผลให้ความสามารถในการสร้างโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ผิดพลาดเมื่อไม่มีเอนไซม์การทำงานของเซลล์จะผิดปกติไป ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหลายขั้นตอนที่แบคทีเรียโอซินยับยั้งได้นั้น สามารถ กลับสู่สภาพเดิมได้เมื่อลดความเข้มข้นลงด้วยเหตุนี้แบคทีเรียโอซินที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนส่วนใหญ่เป็น Bacteriostatic (Klaenhammer, 1988)

5) รบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึม กระบวนการเมตาบอลิซึมสามารถกลับเข้าสู่สภาพเดิมได้เมื่อปริมาณแบคทีเรียโอซินลดลง ดังนั้นแบคทีเรียโอซินพวกนี้จึงจัดเป็น Bacteriostatic

#### 2.4.4 ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการผลิตแบคทีเรียโอซิน

ในการผลิตแบคทีเรียโอซิน อาหารเลี้ยงเชื้อควรมีสารอาหารที่จำเป็นอย่าง ครบถ้วน เพื่อที่จะสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ในปริมาณสูงสุด ไม่ขัดขวางต่อการปลดปล่อยแบคทีเรียโอซินออกจากตัวเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อต้องไม่มีผลต่อแบคทีเรีย ที่ใช้ในการทดสอบ ดังนั้นจึงมีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการผลิตแบคทีเรียโอซินดังต่อไปนี้

##### 1) ชนิดของจุลินทรีย์

แบคทีเรียโอซินสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติก หลายสายพันธุ์การสังเคราะห์แบคทีเรียโอซินจะต้องประกอบด้วยกระบวนการถอดรหัส (Transcription) และกระบวนการแปลรหัส (Translation) เพื่อถอดรหัสทางพันธุกรรมจากยีนสำหรับแบคทีเรียโอซิน โดยยีนสำหรับแบคทีเรียโอซินอาจเป็นยีนที่อยู่ในพลาสมิด (Plasmid) หรือเป็นยีนที่อยู่ในโครโมโซม (Chromosome) ก็ได้

##### 2) องค์ประกอบต่าง ๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการผลิตแบคทีเรียโอซินจะต้องคำนึงถึงแหล่งและปริมาณคาร์บอน ปริมาณไนโตรเจนและปริมาณฟอสเฟส ตลอดจนปริมาณสารยับยั้งและสารลดแรงตึงผิวต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียโอซินสามารถผลิตได้ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน การผลิต Nisin Z จากเชื้อ *Lc. lactis* IO-1 สามารถผลิตได้โดยใช้น้ำตาลกลูโคส (glucose) ซูโครส

(sucrose) และ ไซโลส (xylose) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยการใช้น้ำตาลกลูโคสจะให้ผลดีที่สุด (4000 IU/ml) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาล xylose (3000 IU/ml) (Matsusaki *et al.*, 1996)

ในการผลิตแบคทีเรียโอสซินโดยใช้การหมักแบบควบคุมอุณหภูมิ พบว่าการเจริญของเชื้อและการผลิตแบคทีเรียโอสซินขึ้นอยู่กับปริมาณคาร์โบไฮเดรตเริ่มต้นจากการทดลองของ De Vuyst และ Vandamme (1994) พบว่าเมื่อใช้ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณโนซินสูงสุดและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเป็น 40 กรัมต่อลิตร ปริมาณโนซินที่ได้จะลดลงเป็น 10.9 มิลลิกรัมต่อกรัม แสดงว่าแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการสังเคราะห์หรือมีผลต่อกิจกรรมของ Prenisin-modifying เอนไซม์ โดยซัสเตรตที่ใช้และผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อและลดการผลิต Enterocin 1146 ได้เช่นกันในการผลิต Amylovorin L471 พบว่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดที่ได้ไม่ได้เกิดจากการเพิ่มปริมาณกลูโคส (20-60 กรัมต่อลิตร) แต่ในทางตรงกันข้ามการใช้น้ำตาลกลูโคสในปริมาณสูงกลับทำให้เกิดการสลายตัวของแบคทีเรียโอสซินด้วยเช่นกัน

นอกจากแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอสซินแล้วแหล่งไนโตรเจนก็มีผลมากต่อการผลิตเช่นกัน Kim *et al.*, (1997) พบว่า ปริมาณการผลิตโนซินจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจน ถึงแม้ว่าอัตราการเจริญของเชื้อจะลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนก็ตามนอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอสซินเช่นกัน De Vuyst and Vandamme (1994) ทำการทดลองเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจน (10 กรัมต่อลิตร) ในการผลิตโนซินพบว่าการใช้ cotton-seed meal จะให้ผลผลิตดีที่สุด (2500 IU/ml) ในขณะที่การใช้ yeast extract และ fish meal ก็ให้ผลผลิตสูงเช่นกัน (น้อยกว่า 2000 IU/ml) ในการผลิตแบคทีเรียโอสซินจากเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 ใน Filtered stillage-based medium เปรียบเทียบกับอาหาร LTB พบว่าปริมาณโนซินใน Filtered stillage-based medium สูงกว่าในอาหาร LTB

สารอนินทรีย์ต่าง ๆ ทั้ง anions (สารประกอบฟอสเฟต) และ Cations จำพวก แมกนีเซียม ( $Mg^{2+}$ ) และแคลเซียม ( $Ca^{2+}$ ) ก็มีผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอสซินเช่นกันแต่ทั้งนี้จะขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วยจากการทดลองของ De Vuyst and Vandamme (1994) พบว่า ฟอสเฟตช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตโนซินจากเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 โดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 6.8 จะให้ผลการ ผลิตดีที่สุดแต่จะไม่มีผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอสซินจากสายพันธุ์ *Lc. lactis* IO-1 (Matsusaki *et al.*, 1996)

แมกนีเซียม ( $Mg^{2+}$ ) สามารถเพิ่มการผลิต Pediocin ACh และช่วยเพิ่มการผลิตและลดการเกาะตัวกันของโนซินจากเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 แต่ไม่สามารถเพิ่มการผลิตโนซินจากเชื้อ *Lc. lactis* IO-1 ได้ นอกจากนี้การเติม  $CaCl_2$  ปริมาณ 0.1 โมลต่อลิตร ยังช่วยเพิ่มปริมาณ nisin Z แต่ไม่มีผลใด ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อหรือการผลิต lactate จากน้ำตาล ไซโลสและกลูโคสในการผลิตแบบที่มีการควบคุมพีเอช (Matsusaki *et al.*, 1996)

Tween 80 สามารถส่งเสริมการผลิตแบคทีเรียโอสซินได้ในบางชนิด ถึงแม้ว่า Tween 80 จะมีคุณสมบัติในการป้องกันการดูดซับบนพื้นผิวแต่จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตได้ Biswas *et al.*, (1991) พบว่าอาหารที่มีกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนและมีการเติม Tween 80 และ  $Mg^{2+}$  ให้ปริมาณมวลชีวภาพและปริมาณการผลิต Pediocin ACH จากเชื้อ *Pediococcus acidilactici* สูงสุดและยังช่วยเพิ่มการผลิต Lactocin S อีกด้วย สารเหล่านี้จะเข้าไปมีผลต่อการแสดงออกของยีน

ช่วยป้องกันการเกาะรวมกันของแบคทีเรียโอสลินและยังช่วยเพิ่มผลิตผลภายใต้สภาวะควบคุมต่าง ๆ ได้ (Matsusaki *et al.*, 1996)

#### 2.4.5 การนำแบคทีเรียโอสลินไปใช้ในการปรับปรุงความปลอดภัยในอาหาร

แบคทีเรียโอสลินจะช่วยเพิ่มความปลอดภัยในอาหารและลดการป่วยอันเนื่องมาจากอาหารเป็นพิษ การใช้แบคทีเรียโอสลินมักใช้เป็นตัวเสริมในภายหลังเพื่อป้องกันโรคอาหารเป็นพิษเท่านั้น โดยทั่วไปการควบคุมการผลิตอาหารในโรงงานอุตสาหกรรมควรจะมีระบบที่ป้องกันหรือลดจำนวนการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ทั้งนี้รวมถึงการมีระบบสุขาภิบาล สุขอนามัย และการจัดการที่ดี (Good manufacturing practices) ซึ่งครอบคลุมถึงกระบวนการตั้งแต่การคัดเลือกวัตถุดิบ บริเวณโรงงานผลิต ควบคุมผลิตภัณฑ์อาหาร รวมทั้งอนามัยส่วนบุคคล นอกจากนี้การควบคุมความปลอดภัยของอาหาร (Adam and Moss, 1995) โดยอาศัยหลักการพื้นฐานของ Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) นั้น จะวัดจากการที่โรงงานสามารถจำแนก ประเมิน และควบคุมระบบอันตรายที่ส่งผลถึงความปลอดภัยในอาหาร อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าจะมีระบบควบคุมที่เคร่งครัด แต่การระบาดของโรคอาหารเป็นพิษก็ยังคงพบได้ทั่วไป จากรายงานของ Council for Agricultural Science and Technology พบว่ามีผู้ป่วยจากโรคติดเชื้อที่มากับอาหาร 6.5-33 ล้านคน และมีการตายถึง 9,000 ราย ต่อปี ในจำนวนนี้โรคติดเชื้อที่เกิดจาก *Listeria monocytogenes* นับว่ามีความสำคัญมากเชื่อกันดี นี้จะปนเปื้อนในโรงงานผลิตภัณฑอาหารและส่งผลร้ายต่อผู้บริโภค โดยเฉพาะหญิงมีครรภ์ทารก ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันอ่อนแอ *L. monocytogenes* นี้พบทั่วไปในสิ่งแวดล้อม สามารถรอดชีวิตได้ในอุณหภูมิตู้เย็น และที่ความเข้มข้นของเกลือสูง รายงานในประเทศเวลส์และอังกฤษพบผู้ป่วยที่เป็นโรคจากเชื้อนี้ 194 คนในปี 2000 และตาย 68 คน นอกจากนี้ในประเทศสหรัฐอเมริกายังพบผู้ป่วยประมาณ 2,500 คน และทำให้เกิดการตาย 500 คนต่อปี จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมเชื้อ ซึ่งแบคทีเรียโอสลินจะเข้ามา มีบทบาท นอกจาก *L. monocytogenes* แล้วยังมีเชื้อก่อโรคในกลุ่มแกรมลบที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Escherichia coli* VTEC 0157, *Campylobacter* และ *Salmonella* ถึงแม้ว่าฤทธิ์ของแบคทีเรียโอสลินจะไม่สามารถทำลายผนังเซลล์ของกลุ่มแกรมลบได้อย่างสมบูรณ์ แต่สามารถใช้ร่วมกับกรรมวิธีอื่น เช่น การใช้ความดันสูง (High Hydrostatic Pressure; HHP) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ หรือใช้ร่วมกับกรดแลคติกที่ความเข้มข้นสูง จะส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อในกลุ่มแกรมลบ เช่น *Salmonella anatum* ที่พบมากในแฮม ถูกทำลายได้เร็วขึ้น ดังนั้นแบคทีเรียโอสลินสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและพวกที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร โดยเฉพาะจะเข้าไปมีบทบาทในการควบคุมการปนเปื้อนภายหลังกระบวนการผลิตแบคทีเรียโอสลินได้เข้ามา มีบทบาทอย่างน้อย 3 ทางในการควบคุมความปลอดภัยในอาหาร คือ การใช้แบคทีเรียโอสลินที่บริสุทธิ์หรือบริสุทธิ์บางส่วนในการเติมเป็นส่วนประกอบหนึ่งในอาหาร การใช้สายพันธุ์ของเชื้อที่สร้างแบคทีเรียโอสลิน ผสมกับองค์ประกอบที่ใช้เตรียมอาหาร หรือการใช้สายพันธุ์ที่สร้างแบคทีเรียโอสลินแทนสายพันธุ์เดิมที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในอาหารหมัก (เยวาลักษณ์ สุรพันธุ์พิศิษฐ์, 2536)

#### 2.4.6 การเติมแบคทีเรียโอสลินในรูปของส่วนผสมในอาหาร

แบคทีเรียโอสลินสามารถใช้เติมลงในอาหาร อาจใช้ในรูปแบบที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ก็ได้ นอกจากนี้ยังสามารถเตรียมได้เอง เช่น โนซินสามารถเตรียมได้เองจากการหมักน้ำนมที่ไม่มีไขมันโดยใช้เชื้อ *Lactococcus lactis* ซึ่งสร้างโนซินได้ โดยการเติมโนซินลงในอาหารนอกจากจะช่วยป้องกันการเน่าเสียของอาหารแล้วยังช่วยเพิ่มอายุการเก็บของอาหารให้ยาวนานขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้โนซินใน

อาหารมีข้อจำกัดหลายด้าน เช่น การให้ความร้อนในกระบวนการผลิตอาหาร ทำให้ฤทธิ์ในการเป็นสารยับยั้งเชื้อลดลง นอกจากนี้สมบัติทางกายภาพและเคมีของอาหาร เช่น pH และปริมาณไขมัน ก็เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการนำแบคทีเรียโอสลินไปใช้เช่นกัน โดยพบว่าโนซินจะมีกิจกรรมการยับยั้งในช่วง pH ที่เป็นกรด แต่จะสูญเสียกิจกรรมการยับยั้งที่ pH มากกว่า 7 ในขณะที่แลคโตบาซิลอื่น เช่น Lacticin 3147 สามารถรักษากิจกรรมการยับยั้งได้ในช่วง pH ที่เป็นกลางและทนต่อความร้อนได้ที่ pH เป็นกรด นอกจากนี้โนซินยังไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในการถนอมอาหารประเภทเนื้อเนื่องจากสารที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อ เช่น ฟอสโฟไลปิด หรือส่วนที่มีไขมันสูง จะจำกัดกิจกรรมของโนซิน แบคทีเรียโอสลิน subclass IIa เช่น Pediocin PA-1/AcH ได้รับความสนใจมากขึ้นเนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* โดยการนำไปใช้ร่วมกับวิธี Modified Atmosphere Packaging (MAP) ซึ่งวิธี MAP จะใช้ในการบรรจุผลิตภัณฑ์จากเนื้อภายใต้ภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ในระดับสูง เพื่อลดการเน่าเสียอันเนื่องมาจากแบคทีเรียแกรมลบ และภาวะดังกล่าวยังช่วยให้แบคทีเรียแลคติกเพิ่มจำนวนและสร้างแบคทีเรียโอสลินได้ ทำให้ยืดอายุการเก็บของอาหารที่แช่เย็น แบคทีเรียแลคติกที่พบทั่วไปในเนื้อแช่เย็นได้แก่กลุ่มแลคโตบาซิลไล (lactobacilli) กลุ่มเพดิโคคโคค (pediococci) และสายพันธุ์ที่สร้าง Pediocin PA-1/AcH ได้ก็สามารถแยกได้จากเนื้อเช่นกัน เพดิโคคโคค PA-1/AcH เป็นแบคทีเรียโอสลินที่ถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์นมหลาย ชนิด โดยพบว่าสามารถรักษากิจกรรมการยับยั้งได้ในช่วง pH กว้างและในที่มีไขมัน แลคติซิน 3147 สร้างได้จากเชื้อ *L. lactis* DPC 3147 เป็นแบคทีเรียโอสลิน อีกชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้เป็นสารกันเสียอย่างแพร่หลาย โดยพบว่าสามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* Scott A และ *Bacillus cereus* ในโยเกิร์ตธรรมชาติ และในชีส เป็นต้น (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2550: 145-160)

#### 2.4.7 การเติมสายพันธุ์ที่สร้างแบคทีเรียโอสลินลงในอาหาร

การนำแบคทีเรียแลคติกที่มีชีวิตที่สร้างแบคทีเรียโอสลินได้ไปใช้ในอาหารจะช่วยเป็นสารกันเสียทางชีวภาพในอาหาร ดังนั้นจะช่วยในการยืดอายุของอาหารและเพิ่มความปลอดภัยในอาหาร อย่างไรก็ตามปัญหาที่พบในการใช้แบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีเรียโอสลินไปใช้ในการผลิตอาหารหมักคือสายพันธุ์ที่สร้างแบคทีเรียโอสลินอาจมีผลยับยั้งสายพันธุ์อื่นที่ใช้ในการหมัก เช่น ในการผลิตชีส พบว่าสายพันธุ์ที่สร้างโนซินมักจะยับยั้งสายพันธุ์ที่เป็นเชื้อตั้งต้นที่ใช้ การแก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยใช้สายพันธุ์ที่สร้างโนซินเป็นเชื้อตั้งต้นแทนเชื้อตั้งต้นเดิม พบว่าเชื้อสร้างกรดได้เพียงเล็กน้อย และมีกิจกรรมในการย่อยโปรตีน (Proteolytic activity) ไม่เพียงพอ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อจะถูกทำลายด้วยแบคทีเรียโอสลินเพิ่มขึ้น ดังนั้นสายพันธุ์ที่สร้างโนซินจึงไม่เหมาะในการผลิตชีส อย่างไรก็ตามได้มีการรายงานการใช้เชื้อตั้งต้นหลาย ๆ สายพันธุ์ (multi-strain starters) ร่วมกับสายพันธุ์ที่สร้างแบคทีเรียโอสลินในการผลิตชีส พบว่าช่วยให้เกิดลักษณะที่ต้องการได้เช่นกัน เช่น ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างกรดการใช้สายพันธุ์ที่สร้างแบคทีเรียโอสลินในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อใช้เป็นสารกันเสียทางชีวภาพได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน เช่น การใช้ *L. curvatus* และ *L. lactis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สร้างแบคทีเรียโอสลิน เมื่อใช้ในรูปแบบระเหิดแห้ง (Lyophilised bacteriocin-producing cultures) (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2550: 145-160)

## 2.5 การแยกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดย เทคนิคเจลฟิเตรชันโครมาโตกราฟี

เทคนิคเจลฟิเตรชันโครมาโตกราฟี (Gel filtration chromatography) หรือ Size exclusion หรือ Molecular sieve chromatography เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยคุณสมบัติความแตกต่างกันของ ขนาด มวลและรูปร่างของสารตัวอย่าง ค้นพบเมื่อปี 1959 โดยการศึกษาของ Porath และ Flodin ที่ห้องวิจัย AB-Pharmacia Research ในประเทศสวีเดน (Unger, 1990) เพื่อใช้ในการแยกโพลิแซคคาไรด์โดยใช้โพลีเมอร์สังเคราะห์จากเดกซ์แทรน และ Epichlorohydrin เป็นตัวกลางในการแยก ต่อมาในปี 1962 ได้มีการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการแยกเกลือและสารโมเลกุลเล็กอื่น ๆ แยกออกจากสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ โดยอาศัยคุณสมบัติของเม็ดเจลที่มีลักษณะช่องว่างภายในที่เกิดจากการเชื่อมไขว้ ของโพลีเมอร์ที่ใช้ ในการสร้างเจล (Gel matrix) โดยภายในเม็ดเจลแต่ละเม็ดมีขนาดช่องว่างที่จำเพาะยอมให้สารที่มีขนาดโมเลกุลค่าหนึ่งผ่านเข้าไปในเม็ดเจลได้ ส่วนสารที่มีขนาดใหญ่กว่าไม่สามารถผ่านเข้าไปได้ถูกชะออกมาที่สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะหลุดออกจากคอลัมน์ก่อน จากหลักการข้างต้นเห็นได้ว่าสามารถแยกสารที่มี ขนาดเล็กและใหญ่ออกจากกันได้ โครงสร้างของเม็ดเจลและการแยกสารตามขนาดโมเลกุลในขณะที่ผ่านลงมาตามคอลัมน์ (Voet and Voet, 1990)

สารที่มีรูพรุนมักจะเป็นสารจำพวกโพลีเมอร์ (ตาราง 2.2) เช่น Sephadex ซึ่งมีขนาดรูพรุนแตกต่างกันออกไปเพื่อใช้แยกสารที่มีขนาดต่าง ๆ ได้ เช่น Sephadex G-50 ใช้แยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 15,000-30,000 ดาลตัน Sephadex G-200 ใช้แยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 5,000-250,000 ดาลตัน นอกจากนี้ยังมีสาร Sephacyl ซึ่งมีโครงสร้างแข็งแรงกว่า Sephadex ใช้สำหรับแยกสารที่มีน้ำหนักในช่วง 100,000-1,000,000 ดาลตัน

ตาราง 2.2 ตัวอย่างของ Support material

Materail	น้ำหนักโมเลกุล (MW)
Dextran	
Sephadex G-10	0-700
Sephadex G-200	5,000-800,000
Polyacrylamide	
Bio-gel P-2	100-1,800
Bio-gel P-300	60,000-400,000
Agarose	
Sepharose 2B	$2 \times 10^6$ - $25 \times 10^6$

ที่มา: ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม (2554)

Dextran เป็นโพลีเมอร์ของกลูโคสที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* จากนั้นนำโพลีเมอร์ดังกล่าวมาเชื่อมไขว้เข้า ด้วยกันระหว่างเดกซ์แทรน กับ Epichlorohydrin แสดงลักษณะโครงสร้างดังรูปที่ 3.4 มีชื่อทางการค้าว่า Sephadex แบ่งออกเป็นเกรด ต่าง ๆ กันเรียกว่า G-

type มีความแตกต่างกันในด้านระดับของการเชื่อมโยง (Degree of cross linked) และช่วงมวลโมเลกุลของโปรตีนที่เหมาะสมในการแยกแสดงดังตารางที่ 3.3 คุณสมบัติทางเคมีของ Sephadex ที่สำคัญ คือไม่ละลายในตัวทำละลายทุกชนิด มีความเสถียรสูงในน้ำ สารละลายเกลือ ตัว ทำละลายอินทรีย์ สารละลายต่างและกรดอ่อน ส่วนในสารละลายกรดแก่เกิดการสลายตัวได้ อย่างไรก็ตามยังคงมีความคงตัวในสารละลาย 0.1 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก นาน 1-2 ชั่วโมง และคงตัวได้นาน 6 เดือนใน 0.02 โมลาร์กรดชนิดเดียวกัน ข้อควรระวังของการใช้งาน Sephadex คือไม่ควรใช้กับ strong oxidizing agent สำหรับคุณสมบัติทางกายภาพที่สำคัญของเดกซ์แทรน คือ สามารถทนอุณหภูมิและ 44 ความดันสูงได้ สามารถฆ่าเชื้อภายใต้ความดันสูง 15 psi นาน 30 นาทีที่พีเอชเป็นกลางได้ แต่ถ้าอยู่ในรูปของเจลแห้งจะทนความร้อนได้ไม่เกิน 120 องศาเซลเซียส เกิดการหลอมตัวได้ (Voet and Voet, 1990)

## 2.6 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสาร

อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide-gel electrophoresis: SDS-PAGE)

เป็นวิธีที่ดีที่สุดวิธีหนึ่งในการแยกและเตรียมสารที่มีประจุให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังใช้ในการพิสูจน์ความบริสุทธิ์ของสารละลาย โดยอาศัยหลักที่ว่าสารที่มีประจุไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้า โดยเคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้ามกันและโมเลกุลขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีประจุเท่ากัน

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulphate: SDS) เป็นสารละลายที่มี แอนไอออนิกดีเทอร์เจนต์ (anionic detergent) ชนิดหนึ่งที่มีประจุลบโดย SDS จะจับกับโปรตีนตรงบริเวณที่เป็นไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) ของโมเลกุลทำให้โปรตีนคลายการขดม้วนออกเป็นสายยาวที่มีรูปร่างเป็นแท่ง และทำให้โมเลกุลของโปรตีนเป็น อิสระจากการรวมตัวกันกับโปรตีนอื่น ๆ หรือกับไขมัน ตัวกลางที่ใช้ค้ำจุน (inert matrix)

เมื่อโปรตีนถูกจับด้วย SDS ที่มีประจุลบ จะทำให้โปรตีนมีประจุลบด้วย และการจับของโมเลกุลโปรตีนกับ SDS จะเป็นอัตราส่วนที่คงที่ (1 โมเลกุลของ SDS ต่อทุก ๆ กรดอะมิโน 2 ตัว หรือ 1.42 กรัม SDS ต่อกรัมโปรตีน) เมื่อให้สนามไฟฟ้าโปรตีนแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก แต่จะแยกออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดของโมเลกุลหรือน้ำหนักโมเลกุล วิธีนี้ใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของสายโพลีเปปไทด์ เช่นเดียวกับหน่วยย่อยของโปรตีนและเป็นวิธีที่ให้ผลเร็วมีประสิทธิภาพในการแยกสูง การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสและการย่อยสามารถทำเสร็จภายใน 1 วัน โปรตีนที่แยกออกจากกันสามารถหาตำแหน่งได้โดยการย้อมสี ถ้าโปรตีนมีความเข้มข้นประมาณ 0.1 ไมโครกรัม สามารถให้แถบที่ชัดเมื่อย้อมด้วยโคแมสซึบริลเลียนท์บลู (Coomassie Brilliant Blue) ถ้าความเข้มข้นของโปรตีนต่ำกว่า 10 นาโนกรัม ต้องใช้การย้อมด้วยวิธีการย้อมด้วยซิลเวอร์ (silverstaining) (อาภัสสรฯ ชมิทธ์, 2537)

ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคทีเรียโอสซินนิยมใช้วิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE ในการวิเคราะห์เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย และรวดเร็วแต่อาจเป็นปัญหาสำหรับแบคทีเรียโอสซินบางชนิด เช่น ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของ leucocin A-UAL 187 Mesenteriocin Y105 และ

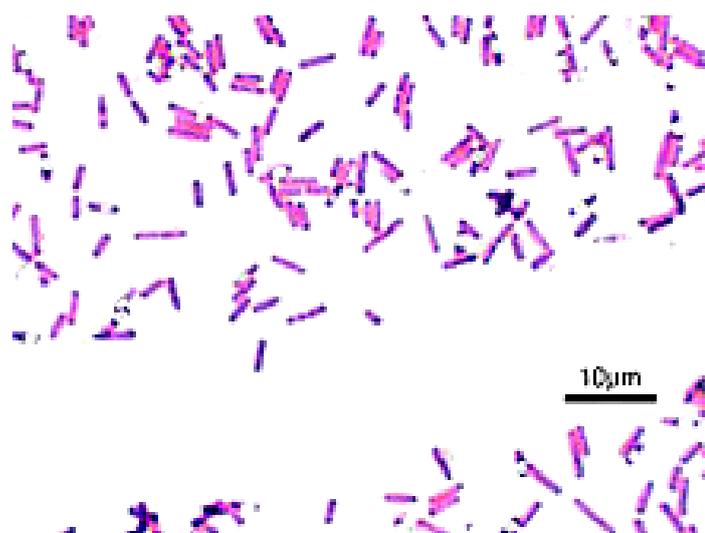
Lactobin A (Contreras *et al.*, 1997) โดยวิธี SDS-PAGE หลังจากการย่อยสลายด้วยสารละลาย Coomassie brilliant blue จะเกิดเป็นแถบโปรตีนที่กระจายตัวกว้าง เนื่องจากแบคทีเรียโอซินมีขนาดเล็กและมีคุณสมบัติการเป็น Hydrophobic ทำให้แบคทีเรียโอซินกระจายออกจากแผ่นเจลได้ในขณะที่แบคทีเรียโอซินบางชนิดไม่สามารถมองเห็นแถบโปรตีนเลย จากปัญหาเหล่านี้ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคทีเรียโอซินได้ เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงมีการใช้สีย้อมตัวอื่น เช่น silver stain มาใช้หรือใช้วิธีการแช่แผ่นเจลลงในสารละลาย formaldehyde เพื่อเพิ่มความไวในการติดสีของแถบโปรตีน หรือใช้เทคนิคอื่นในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล เช่น ในการทำบริสุทธิ์ Lactobin A จากเชื้อ *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139 ซึ่งเกิดปัญหาในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล โดยวิธี SDS-PAGE จึงนำเทคนิค Electrospray mass spectrometry (EMS) มาช่วยในการวิเคราะห์ (Contreras *et al.*, 1997)

## 2.7 จุลินทรีย์ก่อโรค

### 2.7.1 *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) ผลทดสอบ catalase เป็นบวก มีแฟลกเจลลา (flagella) แบบ peritrichous สามารถสร้าง capsule ได้ อยู่ในกลุ่ม obligate aerobe สามารถสร้าง endospore ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญได้ดี รูปร่างเป็นท่อน (rod-shaped) แห้งที่อยู่อาศัยพบได้ทั่วไปในดิน (Madigan and Martinko, 2005) เดิมถูกเรียกว่า *Vibrio subtilis* โดย Christian Gottfried Ehrenberg ในปี ค.ศ. 1835 ต่อมาในปี ค.ศ. 1872 ได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Bacillus subtilis* โดย Ferdinand Cohn และในปี ค.ศ. 1966 U.S. Army's Special Operations Division ได้นำเชื้อชนิดนี้มาใช้ทดลองเกี่ยวกับสงครามชีวภาพสืบพันธุ์โดยการแบ่งเซลล์จากหนึ่งเป็นสอง (binary fission) โดยการแบ่งเป็นแบบไม่สมมาตร (Ryan and Ray, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อมีสภาวะในการเจริญที่ไม่เหมาะสม เช่น ขาดอาหารหรือขาดน้ำ แบคทีเรียชนิดนี้จะมีการสร้าง endospore ซึ่งเป็นโครงสร้างพิเศษที่มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญนั้นได้เป็นระยะเวลานาน และจะงอกออกมาเป็นเซลล์ที่สมบูรณ์ได้เมื่อมีสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญอีกครั้ง ในบางครั้งอาจไม่ถือว่า endospore เป็นโครงสร้างสืบพันธุ์ เนื่องจากไม่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์

*B. subtilis* และ *B. pumilus* ก่อให้เกิดโรคโลหิตเป็นพิษ กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ ไช้กระดูกอักเสบ พบการติดเชื้อกับผู้ป่วยติดยาเสพติดพวกฉีดยาเข้าเส้น บาดแผลน้ำร้อนลวก บาดแผลไฟไหม้เป็นต้น (จันจิรา แข็งแรง และอัจฉรา จันทสิทธิ์, 2550)

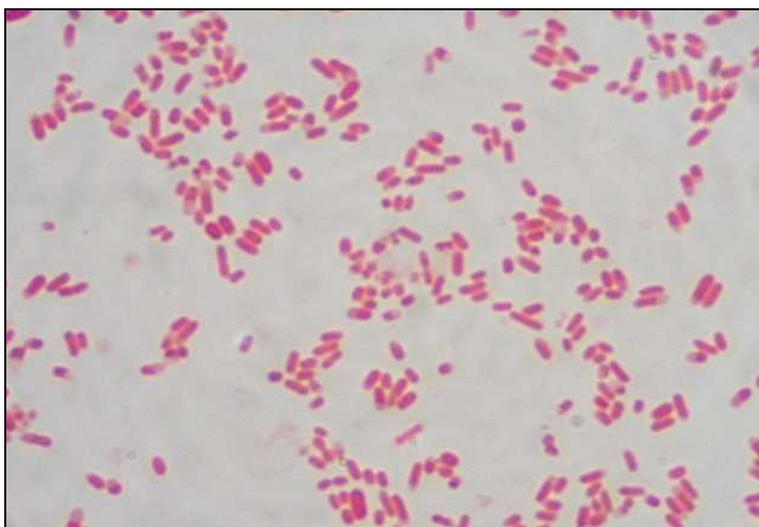


ที่มา: [http://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus\\_subtilis](http://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_subtilis)

ภาพประกอบ 2.2 *Bacillus subtilis* ติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเล็ต

### 2.7.2 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* เป็นเซลล์รูปท่อนสั้น แกรมลบ (Gram-negative) ไม่สร้างสปอร์ โคลินีเรียบ ไม่มีสี เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร ในเวลา 18 ชั่วโมง แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารที่แสดงความแตกต่าง (differential media) เช่น Mac Conkey agar โคลินีมีสีแดงชมพู ขนาดใหญ่ เนื่องจากการหมักแลคโทส เชื้อนี้เจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง (15-45 องศาเซลเซียส) บางสายพันธุ์ทนความร้อน 60 องศาเซลเซียส 15 นาที หรือ 55 องศาเซลเซียส 60 นาที เชื้อ *E. coli* อยู่ในกลุ่มของ Coliform bacteria เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Enteric bacteria คือ พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคออกสู่ภายนอกโดยไปกับอุจจาระและเข้าสู่ร่างกายโดยการปนเปื้อน (Contamination) มากับอาหารและน้ำเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่มีรอบตัว peritrichous flagella ปัจจุบันพบว่า *E. coli* บางสายพันธุ์สามารถก่อโรคในคนได้ โดยเป็นสาเหตุของโรคทางเดินปัสสาวะอักเสบและโรคในระบบทางเดินอาหาร



ที่มา: <http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/Labs/Microbiology/Gram Stain/Gram stain images/E coli 2000 P7201172.jpg>

### ภาพประกอบ 2.3 *Escherichia coli* ติดสีแดงของซาฟานินโอ

จีโนม *Escherichia* มีอยู่ 5 สปีชีส์ โดยมี *E. coli* เป็น Type species ของจีโนม จากการศึกษาทางพันธุศาสตร์ โดยจากความสัมพันธ์ของ DNA-DNA recombination พบว่า *E. coli* และ *Shigella* เป็นสปีชีส์เดียวกัน อย่างไรก็ตาม ปฏิกริยาทางชีวเคมีของเชื้อทั้งสองมีความแตกต่างกัน *E. coli* เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ ปกติจะไม่ทำให้เกิดโรค แต่จะทำให้เกิดโรคได้ถ้าเชื้ออยู่นอกลำไส้ เช่น ในท่อปัสสาวะ ท่อน้ำดี ปอด เยื่อหุ้มปอด เยื่อหุ้มสมอง และไขสันหลังในเด็กแรกเกิด เชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรคท้องร่วงในคนและสัตว์

*E. coli* สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรค ดังนี้คือ ท้องร่วง (Gastroenteritis) ทางเดินปัสสาวะ อักเสบ (Urinary tract infections) โลหิตเป็นพิษ (Septicemia) และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Neonatal meningitis)

#### 2.7.2.1. ท้องร่วง (Gastroenteritis)

เชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรคท้องร่วงในคนและสัตว์ ได้แก่

##### 1) *Enteroinvasive E. coli* (EIEC)

ทำให้เกิดโรคท้องร่วงคล้ายโรคบิดที่เกิดจาก *Shigella* ถึงแม้ว่า *Shigella* จะมีความรุนแรงมากกว่าเพราะใช้เชื่อน้อยกว่าในการทำให้เกิดอาการ โรคนี้เกิดขึ้นได้กับทุกวัยตั้งแต่เด็กโตและผู้ใหญ่ เชื้อ EIEC คล้ายกับ *Shigella* ทั้งกลไกการเกิดโรคและอาการของโรค นอกจากนี้เชื้อยังไม่เคลื่อนที่เหมือน *Shigella* และให้ผลกับแลกโทสเป็นลบ ทำปฏิกิริยาข้าม (Cross reaction) กับแอนติเจน ของ *Shigella* ปัจจัยที่ทำให้เชื้อมีความรุนแรงอยู่ที่ความสามารถในการบุกรุกเข้าเยื่อบุลำไส้เล็ก นอกจากนี้ยังสร้าง Shiga-like toxin (SLT-1) และ Shiga-like toxin -11 (SLT-11) อย่างไรก็ตาม ปริมาณที่อกซินที่สร้างก็น้อยกว่าที่สร้างโดย *Shigella* หรือ EHEC EIEC มีพลาสมิดขนาดใหญ่ (140 ล้านดาลตัน) อาจทำหน้าที่เกี่ยวกับการจับของเชื้อกับเซลล์ของโฮสต์ ทำให้มันบุกรุกเข้าเยื่อบุลำไส้คน

เมื่อบุกรุกแล้วจะเพิ่มจำนวนในเซลล์เยื่อบุผิวของไอเลียม (ลำไส้เล็ก) และโคลอน (ลำไส้ใหญ่) และเข้าทำลายเซลล์ทำให้เกิดเป็นแผล จึงทำให้มีอาการปวดท้องมีหนองและมีเลือดออกในอุจจาระ

## 2) *Enterotoxigenic E.coli* (ETEC)

ทำให้เกิดโรคท้องร่วงในเด็กและผู้ใหญ่ เชื้อจะสร้างเอนเทอโรทอกซินซึ่งเป็นเอกโซทอกซินอย่างหนึ่ง ทอกซินที่สร้างมี 2 ชนิด คือ

(1) ทอกซินชนิดไม่ทนความร้อน (Heat-labile enterotoxin, LT) ทอกซินนี้จะถูกทำลายด้วยความร้อน 65 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที การสร้างทอกซินมีพลาสมิด (Ent plasmid) ควบคุม และถ่ายทอดไปยังเซลล์อื่นได้ เอนเทอโรทอกซินนี้มีกลไกการทำงานคล้ายกับ cholera toxin (CT) ของเชื้อ *Vibrio cholera* LT มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 86,000 ดาลตัน ประกอบด้วยเปปไทด์ต่อกัน มี 2 ส่วนย่อย (subunit) คือ ส่วนย่อย A และส่วนย่อย B ส่วนย่อย B จะเกาะกับ GM1 แกงกลิโอไซด์ ที่บริชบอร์ดอร์ (brush border) ของเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก เป็นตัวช่วยให้ส่วนย่อย A เคลื่อนเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายขึ้น ส่วนย่อย A ประกอบด้วย A1 (น้ำหนักโมเลกุล 24,000 ดาลตัน) และ A2 (น้ำหนักโมเลกุล 5,000 ดาลตัน) เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ส่วนย่อย A1 หน่วยจะจับกับส่วนย่อย B5 หน่วย ส่วนย่อย A จะกระตุ้นเอนไซม์ อะดีนิลไซคลเลส (adenyl cyclase) หรืออะดีนิลไซคลเลสที่เยื่อบุลำไส้เล็ก ทำให้เปลี่ยน ATP เป็น cyclic adenosine-5-monophosphate (cAMP) ดังนี้



Cyclic AMP ที่เพิ่มขึ้นจะมีผลกระตุ้นให้หลังน้ำและคลอไรด์ไอออน (Cl<sup>-</sup>) ออกมามากและนาน และยับยั้งการดูดโซเดียมคลอไรด์กลับ ในช่องลำไส้จึงยึดมากและเต็มไปด้วยของเหลว และเคลื่อนไหวมากทำให้สูญเสียน้ำและอิเล็กโทรไลต์จากลำไส้ เกิดการท้องเดินอยู่หลายวัน LT มีสมบัติเป็นแอนติเจน จึงกระตุ้นการสร้างนิวทรัลไลซิงแอนติบอดี (Neutralization antibody) ในซีรัมในคนที่ติดเชื้อ ETEC

(2) ทอกซินชนิดที่ทนความร้อน (Heat-stable enterotoxin, STa และ STb) ทอกซิน STa มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,500-2,000 ดาลตัน ทนความร้อน 100 องศาเซลเซียส ในเวลา 30 นาที และทนเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ไม่มีสมบัติเป็นแอนติเจน STa จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์กวานิลเลตไซคลเลส (Guanylate cyclase) ที่เยื่อบุลำไส้ ทำให้เพิ่มการสะสม Cyclic guanosine-5-monophosphate (cGMP) ภายในเซลล์ cGMP เป็นตัวยับยั้งการดูดโซเดียมไอออนและคลอไรด์ไอออนกลับที่บริชบอร์ดอร์ จึงกระตุ้นการหลั่งของเหลวออกจากลำไส้

STb เป็นทอกซินที่ทนความร้อนอีกชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดท้องร่วง ในลูกหมู (weaned piglet) แต่ไม่แสดงผลเมื่อทดลองกับลูกหมู (Suckling mice) ยังไม่ทราบกลไกการทำงานของ STb แต่จะไม่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มการสะสมเอนไซม์ อะดีนิลไซคลเลส หรือ กวานิลเลตไซคลเลส ใน mucosa cell ของลำไส้ แต่อาจกระตุ้นการสร้างโพรสตาแกลนดิน (Prostaglandin E2) ทำให้เพิ่มการหลั่งคาร์บอเนตไอออน (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)

การสร้าง ST เกิดขึ้นโดยการควบคุมของพลาสมิด ในการทำให้เกิดโรค ถ้ามีเพียงเอนเทอโรทอกซินอย่างเดียวไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดโรคท้องร่วงได้ แต่เชื้อต้องเกาะติดกับผิว มิวโคซาร์ของเยื่อบุลำไส้เล็ก ดังนั้น ETEC จะต้องสร้างพิไลหรือพิมเบรียไปยึดกับเยื่อบุลำไส้เล็ก

สารที่จับกับเซลล์ของโฮสต์ เรียกว่า fimbrial adhesines หรือ colonization factor ระยะฟักตัวของเชื้อ ETEC กินเวลา 1-2 วัน แต่โดยเฉลี่ยกินเวลา 3-4 วันมีอาการปวดท้อง (abdominal cramp) คลื่นไส้ อาเจียน และถ่ายเหลวเป็นน้ำ โดยทั่วไปมีอาการไม่รุนแรง ปัจจุบัน ETEC เป็นตัวการทำให้เกิดโรคตั้งแต่อาการคล้ายอหิวาและท้องร่วงรุนแรงในเด็กทารก จนถึงท้องร่วงอ่อน ๆ ในผู้เดินทาง โดยเกิดจากการกินน้ำและอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อน และจะต้องมีเชื้อ  $10^8$  จึงทำให้เกิดโรคได้

### 3) Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)

พบครั้งแรกใน ค.ศ. 1982 ในสหรัฐอเมริกา *E. coli* ที่พบคือ *E. coli* (O157) ที่พบมาก คือ *E. coli* (O157: H7) ที่ทำให้เกิดอาการ

(1) ท้องร่วง โรคท้องร่วงที่เกิดขึ้นแตกต่างจากโรคบิดที่เกิดจาก *Shigella* และ EIEC คือทำให้เกิดการตกเลือดที่ลำไส้ (Hemorrhagic Colitis) มีอาการท้องเสียและปวดท้องรุนแรง อุจจาระมีน้ำมาก ต่อมาเมื่อมีเลือดปนมาก จนถ่ายเป็นเลือด (Bloody diarrhea) อาเจียน ไม่มีไข้หรือมีไข้เล็กน้อย ระยะฟักตัว 3-9 วัน โดยทั่วไปมีอาการใน 4 วัน โดยมีอาการมีน้ำ สะสมน้ำ บวมน้ำ (submucosal edema) ลำไส้ชองอ เหมือนลายนิ้วหัวแม่มือ มีเลือดคั่งที่มีวโคซา (hyperemic mucosa) โรคนี้สามารถเกิดได้กับคนทุกวัย แต่ส่วนใหญ่พบในเด็กและหาเองได้

(2) โรค Hemolytic urimic syndrome (HUS) ซึ่งพบได้ในคนทุกวัยแต่พบมากในเด็กและทารก และเป็นสาเหตุของไตวายในเด็ก โดยผู้ป่วยจะถ่ายอุจจาระเป็นเลือดด้วย มีอาการอาเจียน ชีตขาว เนื่องจากทอกซินทำลายเอนโดทีเลียลเซลล์ (Endothelial cell) ในหลอดเลือดแดงในไต (renal arteriole) ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (Hemolytic anemia) ต่อมาเกล็ดเลือดลดลงและไตทำงานผิดปกติ (Acute renal failure)

#### การรักษาและป้องกันโรคท้องร่วงจาก *E. coli*

เชื้อนี้ไวต่อยาปฏิชีวนะซัลโฟนาไมด์ อะมิโนไกลโคไซด์ เตตราไซคลิน แอมพิซิลลิน การรักษาด้วยซัลโฟนาไมด์หรือแอมพิซิลลิน เพียงพอในรายที่ติดเชื้อทางปัสสาวะเฉียบพลัน แต่ไม่มีโรคแทรกซ้อน ในรายที่เป็นเรื้อรังจึงใช้ยาเมธินาไมนแมนดีเลท กรดนาลิดีซิก เซฟาเลกซิน และคาร์เบนซิลลิน ในเด็กทารกที่เกิดท้องเดินเนื่องจาก EPEC จะให้กินนีโอไมซิน หรือ โคลิสติน นอกจากการรักษาด้วยยาแล้ว ยังต้องรีบให้น้ำเกลือและอิเล็กโทรไลต์ เพื่อไปทดแทนส่วนที่สูญเสียไป

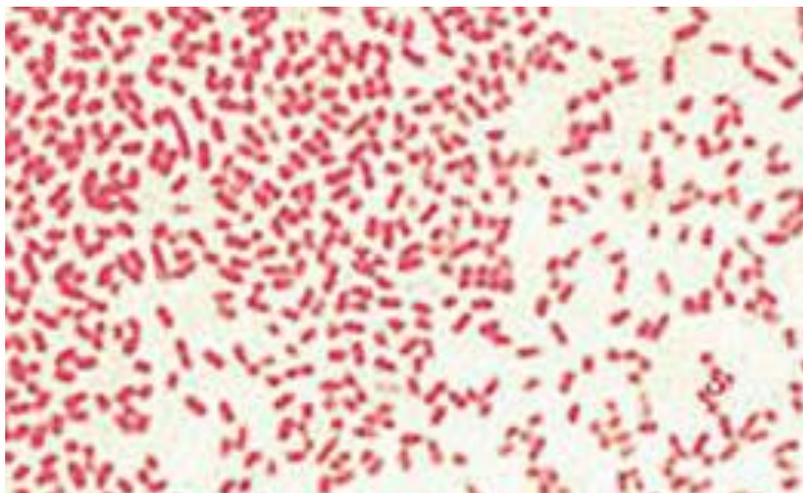
การป้องกันที่ดีที่สุด คือ การหลีกเลี่ยงการได้รับเชื้อจากอาหารและน้ำที่ปนเปื้อน รวมทั้งให้ความรู้เกี่ยวกับสุขอนามัยในการจับต้อง หรือปรุงอาหาร โดยเฉพาะที่ปรุงอาหารให้เด็ก ๆ นักเดินทางที่เดินทางเข้าไปในท้องถิ่นที่ด้อยพัฒนาโดยเฉพาะในเขตร้อน ควรรับประทานอาหารที่ทำเสร็จใหม่ ๆ และยังไม่ร้อนอยู่ รวมทั้งดื่มน้ำที่บรรจุขวดที่แน่ใจว่าผ่านกระบวนการบรรจุที่สะอาดปลอดภัย และไม่รับประทานอาหารที่ไม่ผ่านการปรุงที่สุก หรือไม่รับประทานอาหารที่สุก ๆ ดิบ ๆ รวมทั้งดื่มนมที่ผ่านความร้อนแล้ว (ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา, 2551)

#### 2.7.3. *Pseudomonas fluorescens*

*Pseudomonas* จัดอยู่ในตระกูล Pseudomonadacea เป็นแบคทีเรียรูปท่อน แกรมลบ เคลื่อนที่ได้ เจริญได้ในที่มีอากาศ (Obligate aerobes) บางชนิดสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ดำรงชีวิตอย่างอิสระอยู่ในที่ชื้น บางชนิดเป็นเชื้อก่อโรคกับพืช แมลง และสัตว์ มีเพียงไม่กี่ชนิดที่ก่อโรคกับคน *Pseudomonas* มักเป็นเชื้อฉวยโอกาส (Opportunist) ที่ทำให้เกิดโรคในคนไข้ที่ภูมิคุ้มกันผิดปกติ และเกิดอาการรุนแรงในคนไข้ที่มีแผลไฟไหม้ และคนไข้ที่สวนท่อนปัสสาวะโรคที่เกิดขึ้นในคนพบว่าเกิดจาก *P.*

*cepacia*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. pseudomallei*, *P. stutzeri* และ *P. maltophilia* แต่เชื่อที่พบว่าให้เกิดโรคกับคนมากที่สุดคือ *P. aeruginosa* (นุรีชา ทะละ, 2549)

*P. fluorescens* แยกได้จาก specimens จากระบบทางเดินหายใจ ปัสสาวะ ผลิตภัณฑ์จากธนาคารเลือด เครื่องมือของโรงพยาบาล เครื่องสำอาง (สุชาติ พันจะสี, 2546)



ที่มา: <http://www.nmpdr.org/FIG/wiki/view.cgi/Main/WebHome>

#### ภาพประกอบ 2.4 *Pseudomonas fluorescens* ติดสีแดงของซาฟานินโอ

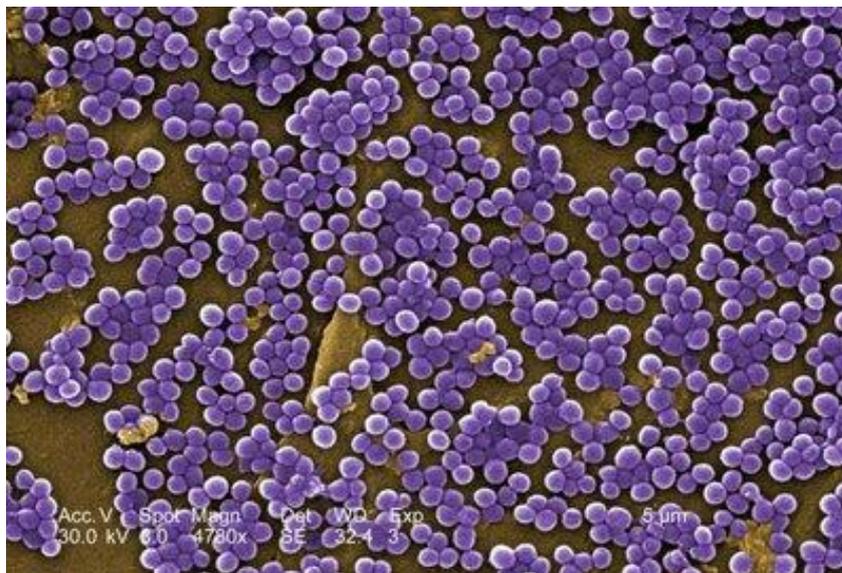
การทำให้เกิดโรค *P. fluorescens* ไม่ค่อยทำให้เกิดโรคในคนที่มีสุขภาพดี แต่จะเป็นเชื้อฉวยโอกาสทำให้เกิดโรคได้ในคนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำหรืออ่อนแอ หรือเมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายในบริเวณที่ไม่มีความต้านทานตามปกติ เช่น เยื่อเมือกและผิวหนังที่ถลอก ในคนไข้ในโรงพยาบาลจะมีการติดเชื้อ *Pseudomonas* ได้ง่ายและรุนแรง โดยที่เชื้อเพิ่มจำนวนอยู่ในน้ำหรือที่มีความชื้นตามเครื่องมือหรือเครื่องช่วยหายใจ การติดเชื้อจะเกิดขึ้นเมื่อมีการใช้เครื่องมือทางการแพทย์เพื่อตรวจหรือรักษา เช่น การใช้เครื่องมือในหลอดเลือดหรือหลอดปัสสาวะ คนที่มีแผลเปื่อยอักเสบ แผลไฟไหม้ การติดเชื้อที่ตา คนไข้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำเนื่องจากสูงอายุ โรคที่ภูมิคุ้มกันถูกกด เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว และคนที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันมักเกิดการติดเชื้อ *Pseudomonas* ได้ง่าย ทำให้เชื้อเข้าสู่ร่างกายและปอดบวมตามมา การทำให้เกิดโรคของเชื้อก็โดยอาศัยปัจจัยต่าง ๆ (นุรีชา ทะละ, 2549)

#### 2.7.4. *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะกลม เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น ๆ ไม่เคลื่อนที่ โคโลนิที่มีสีเหลืองหรือสีทองเจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 35-40 องศาเซลเซียส ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ที่ 7-7.5 สำหรับการเจริญในสภาพมีออกซิเจนประมาณ 0.86 สภาพไม่มีออกซิเจน 0.90

*S. aureus* จะมีชีวิตอยู่ได้ในอากาศ ฝุ่นละออง ขยะมูลฝอย น้ำ อาหารและนม หรืออาหารบรรจุเสร็จ สภาวะแวดล้อมภายนอกมนุษย์และสัตว์ ลักษณะอาการที่บ่งบอกว่าติดเชื้อ *S. aureus* เชื้อ Staphylococci จะอยู่ตามผิวหนัง จมูก มือและส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย สามารถสร้าง

สารพิษเรียกว่า ท็อกซิน ทำให้เกิดอาการท้องเสีย และอาเจียนภายในเวลาอันรวดเร็ว (2-3 ชั่วโมง) พบเชื้อเจริญผ่านอาหารที่สัมผัสด้วยมือและทิ้งไว้นอกตู้เย็นเป็นเวลานาน ได้แก่ เนื้อสัตว์ และพวกครีมต่าง ๆ เชื้อนี้ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ในเวลา 15 นาที (กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข. 2541)



ที่มา: <http://prep4md.blogspot.com/2008/06/staphylococcus-aureus-and food.html>

ภาพประกอบ 2.5 *Staphylococcus aureus* ติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเล็ต

## 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.8.1. งานวิจัยในประเทศ

กรรณิกา นະฉิตรี และคณะ (2548) ได้ศึกษาแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรีย แลคติก M3 เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40 กิโลดาลตัน และสามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ได้โดยไม่ไปทำให้รูปร่างของ *L. monocytogenes* เปลี่ยนแปลงไป จากการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน พบว่าแบคทีเรียแลคติก M3 สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 ถึง 24 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มี yeast extract เข้มข้น 1.6 เปอร์เซ็นต์ และ Tween 80 เข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป

วันดี เกตุแก้ว และคณะ (2548) ได้ศึกษาความสามารถของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 170 ไอโซเลท ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ รวม 33 ตัวอย่าง ที่ผลิตสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบ 22 ชนิดได้แก่ กลุ่มของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย และกลุ่มของแบคทีเรียก่อโรคทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยทดสอบโดยวิธี Well diffusion assay พบว่ามีเพียง ไอโซเลทเดียวเท่านั้นคือไอโซเลท HF84 ที่แสดงผลการยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบคือ *Enterococcus durans* JCM 8725 ซึ่งเมื่อนำไปจำแนกด้วยวิธีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอบนยีนส่วน 16S rRNA

พบว่า เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* HF84 แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ มีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ *E. durans* JCM 8725 สูงสุดอยู่ในช่วงปลาย log phase ของการเจริญ มีความเสถียรต่อความเป็นกรดต่างในช่วงกว้าง คือที่ pH 3-10 และทนอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส ได้ แต่ไม่สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และ 121 องศาเซลเซียส ได้

นิภาภรณ์ แสนคุณท้าว และคณะ (2548) นำแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Streptococcus* รหัส SK 5.1 มาทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบหลายชนิด โดยวิธี swab-paper disc พบว่าแบคทีเรียโอซินดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของ *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi* และ *Proteus vulgaris* นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ระยะเวลาการบ่มเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคทีเรียโอซินโดย *Streptococcus* รหัส SK 5.1 พบว่าระยะเวลาการบ่มเชื้อที่เหมาะสมคือ 8 ชั่วโมง และให้ค่า bacteriocin activity สูงสุดเท่ากับ 2560 AU/ml

สมใจ ศิริโชค และคณะ (2550) ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 พบว่าสามารถทนความร้อน 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 10 นาที มีความคงตัวดีในช่วง pH 4-7 มี antibacterial spectrum ค่อนข้างกว้าง เพราะนอกจากจะยับยั้ง *S. aureus* ซึ่งเป็นเชื้อโรคอาหารเป็นพิษได้ดีแล้ว ยังสามารถยับยั้ง *Lactobacillus sakei*, *Lb. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus salivarius*, *Lactococcus cremoris*, *Bacillus cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans* และ *Listeria monocytogenes* ได้อีกด้วย และเมื่อเปรียบเทียบกับ antibacterial activity กับโนซิน พบว่าสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ ของ commercial nisin ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

## 2.8.2 งานวิจัยต่างประเทศ

Al-Allaf *et al.* (2009) ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ST8KF โดยการใช้เทคนิค agar well diffusion บนอาหาร MRS พบว่าเชื้อ *Lactobacillus* sp. มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ต่างกัน จากการทดสอบพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* ได้สูงสุด ที่ 2.8 มิลลิเมตร และยับยั้งเชื้อ *Corynebacterium* spp. ได้น้อยสุดที่ 0.6 มิลลิเมตร โดยตรวจสอบจากบริเวณการยับยั้งด้วยการวัดรอบโซนใส

De Kwaadsteniet *et al.* (2005) ได้ศึกษาคูณสมบัติของ cell free supernatant ของเชื้อ *Enterococcus mundtii* ST15 พบว่า ความสามารถในการทนต่อความร้อนของ cell free supernatant ของเชื้อ *E. mundtii* ส. ST15 สามารถทนอุณหภูมิได้ทุกอุณหภูมิ ยกเว้นที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที ซึ่งมีผลเป็นลบสำหรับความสามารถในการทนต่อพีเอช ของ cell free supernatant ของเชื้อ *E. mundtii* ST15 พบว่า ช่วงของพีเอช ที่แบคทีเรียโอซินมีกิจกรรมการยับยั้งได้อยู่ในช่วง pH 2.0 ถึง 12.0 ซึ่งผลจากการทดลองพบว่า มีผลเป็นบวก และแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *E. mundtii* มีน้ำหนักโมเลกุล 2.5 กิโลดาลตัน

Hemalatha และ Shanthi (2010) ได้ศึกษาลักษณะของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่เลี้ยงในนม แล้วนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้วิธี SDS-PAG พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 62 กิโลดาลตัน

Karthikeyan และ Santhosh (2009) ได้ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 10 สปีชีส์ของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. acidophilus* สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ 9 สปีชีส์ คือ *Lactobacillus bulgaricus*, *Samonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Samonella typhimurium*, *Samonella paratyphi B*, *Serratia marsecence*, *Pseudomonas aeruginosa* และได้ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคทีเรียโอซิน โดยใช้วิธี SDS-PAG พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. acidophilus* มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 2.5 กิโลดาลตัน

Powell *et al.* (2007) ได้ทดสอบคุณสมบัติของสารละลายส่วนใส (Cell free supernatant) ของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ST8KS ที่แยกได้จากเชื้อคีเฟอร์แล้วพบว่าความสามารถในการทนต่อความร้อนของ cell free supernatant ของเชื้อแบคทีเรียแลคติก สามารถทนต่อความร้อนเริ่มต้นที่ 30 องศาเซลเซียส และสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ความสามารถในการทนต่อพีเอช ของ cell free supernatant ของเชื้อแบคทีเรียแลคติก พบว่า ช่วงของพีเอช ที่แบคทีเรียโอซินมีกิจกรรมการยับยั้งได้อยู่ในช่วง pH 2.0 ถึง 10 ซึ่งมีผลเป็นบวก และความสามารถในการทนต่อเอนไซม์ พบว่าแบคทีเรียโอซินสามารถทนต่อเอนไซม์  $\alpha$ -amylase แต่ไม่สามารถทนต่อเอนไซม์ Proteinase K และ Pronase และได้ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคทีเรียโอซิน โดยใช้วิธี SDS-PAG พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ST8KS มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3.5 กิโลดาลตัน

Rajaram *et al.* (2010) ได้ศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบของ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus lactis* มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella shiga* และ *Shigella boydii* และกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* และ *Pseudomonas aeruginosa* และ กิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Shigella boydii* และศึกษาคุณสมบัติบางประการของ แบคทีเรียโอซิน และศึกษาเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. lactis* พบว่า แบคทีเรียโอซิน มีการผลิตมากที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ pH 6.0 และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 94 กิโลดาลตัน

Yang (1997) ได้ศึกษาเชื้อแบคทีเรียแลคติก พบว่า *Lactobacillus* 13 สายพันธุ์ และ *Pediococcus* 5 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารยับยั้ง เป็น 2-pyrrodone-5-carboxylic acid (PCA) ซึ่ง PCA จะสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิด เช่น *Enterobacter cloacae* 1575, *Pseudomonas fluorescens* KJLG. และ *P. putida* 1560-2 ผลการยับยั้งของ PCA ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับอุณหภูมิขึ้น แต่จะถูกทำลายเมื่อเติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ และ PCA จะมีผลการยับยั้ง น้อยลงกว่ากรดแลคติกเล็กน้อย