

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. แลคติกแอซิดแบคทีเรีย

ในอดีตแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic Acid Bacteria ; LAB) หมายถึงกลุ่มแบคทีเรียที่ทำให้น้ำนมเปรี้ยวจากการผลิตกรด รวมถึงแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มโคลิฟอร์มด้วย (Stiles and Holzapfel, 1997) ปัจจุบันแม้ไม่มีนิยามที่ชัดเจนและเป็นเอกฉันท์ แต่ลักษณะพื้นฐานที่ยอมรับทั่วไปคือ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ยกเว้น *Sporolactobacillus* รูปร่างกลม แท่งหรือกิ่ง แท่ง กิ่งทรงกลม ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ทนต่อสภาวะที่มีอากาศ (aerotolerant) ทนต่อความเป็นกรด ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญเติบโต ผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักน้ำตาล (Axelsson, 1998) แบ่งตามลักษณะการเฟอร์เมนต์น้ำตาล hexose เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ homofermentative สามารถสร้างกรดแลคติกได้ในปริมาณสูงหรือได้แลกเตทเป็นผลิตภัณฑ์หลักและ heterofermentative สร้างกรดแลคติกหรือ lactate ผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เช่น อะซิเตท เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ ฟอรัมเมทหรือซัคซินเนท (Wood and Holzapfel, 1995)

แลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นเชื้อกลุ่มใหญ่ที่พบในธรรมชาติโดยเฉพาะอาหารหมักดองจากพืชและสัตว์ เช่น ผักดอง ผลไม้ดอง หน้าหมัก แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ผลิตภัณฑ์นม นมเปรี้ยว และ โยเกิร์ต (วิเชียร, 2534) นอกจากนี้ยังพบในอาหารเน่าเสีย อวัยวะสืบพันธุ์ ลำไส้เล็กและทางเดินหายใจของคนและสัตว์ (Wood and Holzapfel, 1995) แลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียและก่อโรคได้ เช่น *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* (Schillinger and Lucke, 1989, Larsen et al, 1993)

Wood and Holzapfel (1995) แบ่งแลคติกแอซิดแบคทีเรียออกเป็นชนิดต่าง ๆ ได้แก่

1.1 *Streptococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาด 0.8-1.2 μm เรียงตัวเป็นสายโซ่หรือเป็นคู่ จากการหมักกลูโคสจัดเป็นพวก homofermentative ได้กรดแลคติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้น ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-41°C บางสปีชีส์ทำให้เกิดโรคในคนหรือสัตว์

1.2 *Lactococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาด 0.5-1 μm เรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ต่อกันเป็นสายโซ่สั้น ๆ มักใช้เป็นก๊อแลเชื้อ (starter culture) ในผลิตภัณฑ์นม สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10°C แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45°C

1.3 *Enterococcus* เซลล์เป็นรูปไข่ เรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยว ๆ หรือเป็นสายโซ่สั้น ๆ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-45°C เป็น facultative anaerobe ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ บางสปีชีส์ทำให้เกิดโรค

1.4 *Pediococcus* เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาด 0.36-1.43 μm การเรียงตัวมีลักษณะเฉพาะโดยเรียงกัน 4 เซลล์ติดกันคล้ายจตุรัส (tetrad formation) ผลิตกรดแลกติกชนิด DL และ L(+) จากการหมักกลูโคสในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

1.5 *Leuconostoc* รูปร่างของเซลล์ขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ในอาหารที่มีกลูโคส เซลล์มีลักษณะยืดยาวคล้ายกลุ่ม *Lactobacilli* แต่ในน้ำนมเซลล์จะมีรูปร่างกลม การเรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยวอยู่เป็นคู่หรือเป็นสายโซ่สั้น ๆ จากการหมักกลูโคสจัดเป็นพวก heterofermentative เนื่องจากผลิตกรดแลกติกและสารอื่น ๆ เช่น เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์และสารหอมระเหย จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง

1.6 *Lactobacillus* เซลล์รูปแท่งอาจเรียงเป็นสายสั้น ๆ ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เป็น Facultative anaerobe และอาจเป็น Microaerophilic ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-40°C เป็นแลคติกแอซิดแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ สมบัติทางชีวเคมีและสรีร Stiles and Holzapfel (1997) แบ่ง *Lactobacillus* ออกเป็น 3 กลุ่มได้แก่ กลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli มากกว่า 85% หมักน้ำตาลแลคโทสเป็นกรดแลกติก กลุ่ม Facultatively heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโทสเป็นกรดแลกติก กลุ่ม Obligately heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโทสเป็นแอลกอฮอล์ เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์

1.7 *Bifidobacterium* เซลล์รูปแท่งค่อนข้างโค้งงอและแตกสาขา เป็นพวก anaerobe หมักน้ำตาลให้กรดไม่เกิดก๊าซ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37-41°C

1.8 *Carnobacterium* เซลล์เป็นท่อนตรงขนาดสั้นถึงปานกลาง เรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยวหรือคู่ จัดเป็นพวก heterofermentative

1.9 *Bacillus* เซลล์รูปแท่งตรงเรียงตัวเป็นคู่หรือสาย สร้าง endospore เป็นพวก aerobe หรือ facultative anaerobe เป็นจีสเดียวที่ catalase test ให้ผลบวก

1.10 *Sporolactobacillus* เซลล์เป็นรูปแท่งตรง เรียงตัวเป็นคู่หรือสาย สร้าง endospore เป็นพวก facultative anaerobe

ปัจจุบัน Stiles and Holzapfel (1997) และ Axelsson (1998) ได้แบ่งแลคติกแอซิดแบคทีเรียออกเป็น 12 จีส (วิเชียร, 2542) ได้แก่ *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* (แยกมาจาก *Leuconostoc*), *Pediococcus*, *Tetragenococcus* (แยกมาจาก *Pediococcus*), *Sterptococcus*, *Vagococcus* (แยกมาจาก *Streptococcus*) และ *Weissella* (ตาราง 1)

ตาราง 1 ลักษณะสำคัญของแบคทีเรียสกุลต่าง ๆ (Axelsson, 1998)

ลักษณะ	รูปร่างท่อน				รูปร่างกลม					
	Carnob.	Lactob.	Aeroc.	Enteroc.	Lactoc.	Leucon.	Pedioc.	Streptoc.	Tetragenoc.	Weissella ^a
เซลล์ต่อกันเป็น 4 เซลล์	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
ผลิต CO ₂ จากกลูโคส	-	±	-	-	-	+	-	-	-	+
เจริญที่ 10 °C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
เจริญที่ 45 °C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
เจริญที่ NaCl 6.5%	ND ^f	±	+	+	-	±	±	-	+	±
เจริญที่ NaCl 18%	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
เจริญที่ pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
เจริญที่ pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
ชนิดของการเคลื่อนที่ ^j	L	D, L, DL ^e	L	L	L	D	D, DL ^e	L	L	D, DL ^e

หมายเหตุ

^a +, ใช่ ; -, ไม่ใช่; ±, ผลขึ้นกับสปีชีส์;

^b Weissella บางสายพันธุ์มีรูปร่างเป็นท่อน;

^d ชนิดของการเคลื่อนที่คิดจากกรหมักกลูโคส;

^f ไม่มีการระบุถึงการเจริญในอาหารที่มี NaCl 8%;

ND, ไม่ระบุ

^e +, homofermentative; -, heterofermentative

^c อาจผลิต CO₂ ปริมาณเล็กน้อย ขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ

^e ชนิดของการเคลื่อนที่แตกต่างกันตามสปีชีส์

2. สารเมตาบอไลต์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (LAB) (Holzapfel *et al.*, 1995)

แลคติกแอซิดแบคทีเรียมีส่วนร่วมในขบวนการหมักของอาหารหมักดอง ซึ่งจะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของ กลิ่น รส เนื้อสัมผัส ทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองที่ได้มีรสชาติและลักษณะทางกายภาพที่แปลกไปจากเดิม และยังช่วยถนอมอาหารให้เก็บไว้ได้นานขึ้น เนื่องจากขบวนการหมักนั้นแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอมให้กลายเป็นกรดแลคติกและสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะเซทิล แบคทีเรียโอซิน รูทีริน ซึ่งสารเหล่านี้มีส่วนช่วยในการถนอมอาหารและมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ทำให้อาหารเน่าเสียหรือจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษดังแสดงในตาราง 2 (อ้างโดยอรวิทย์, 2532) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติของสารเมตาบอไลต์ต่าง ๆ ที่ผลิตโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

ตาราง 2 สารเมตาบอไลต์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ (Holzapfel *et al.*, 1995) (อ้าง โดยอรวิทย์, 2532)

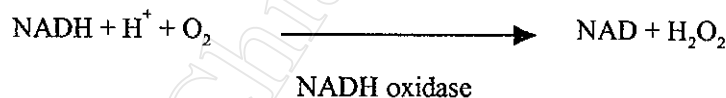
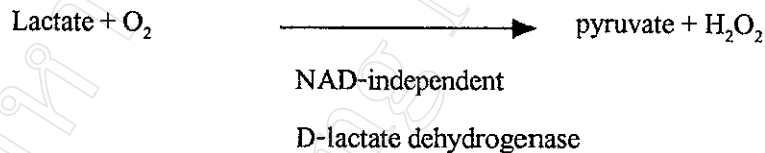
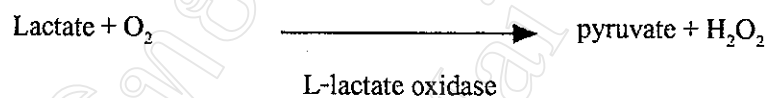
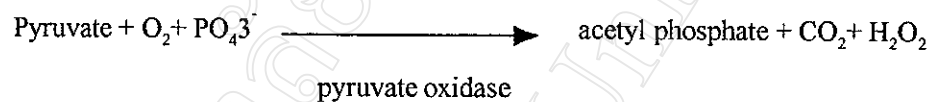
Product	Main target organisms
Organic acids	
- lactic acid	Putrefactive and Gram-negative bacteria, some fungi
- acetic acid	Putrefactive bacteria, clostridia, some yeasts and fungi
Hydrogen peroxide	Pathogens and spoilage organisms, especially in protein rich foods.
Enzyme	
-lactoperoxidase system with H ₂ O ₂	Pathogens and spoilage bacteria (milk and dairy products)
-lysozyme (by recomb. DNA-technology)	Undesired Gram-positive bacteria
Low-molecular metabolites	
-reuterin (3-OH-propionaldehyde)	Wide spectrum of bacteria, moulds and yeasts
-diacetyl	Gram-negative bacteria
-fatty acids	Different bacteria
Bacteriocins	
-nisin	Some LAB and Gram-positive bacteria, notably endospore-formers
-other	Gram-positive bacteria, inhibitory spectrum according to producer strain and bacteriocin type

2.1 กรดแลคติก (Lactic acid)

กรดแลคติกสามารถยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียหรือแบคทีเรียก่อโรค โดยการทำ pH ลดลงจึงมีสภาพเป็นกรดมากเกินไป ทำให้ pH ไม่เหมาะกับการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น Holzapfel *et al.* (1995) พบว่า กรดแลคติกที่ได้จากการหมักจะทำให้จำนวนของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย เช่น *clostridia* และ *pseudomonads* แบคทีเรียก่อโรค เช่น *Salmonellae* และ *Listeria spp.* แบคทีเรียที่สร้าง toxin เช่น *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ *Clostridium botulinum* ลดจำนวนลงได้โดยการยับยั้งหรือทำลายเชื้อเหล่านั้น

2.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂)

เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย พวก *Lactobacillus* อาจเกิดขึ้นได้ดังปฏิกิริยา



รูป 1 สมการการผลิต H₂O₂ โดยแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Daeschel, 1989)

H₂O₂ สามารถทำปฏิกิริยากับไธโอไซยาเนต (thiocyanate) โดยมีเอนไซม์ lactoperoxidase เป็นตัวเร่งได้เป็น hypothiocyanate ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นซึ่งสามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบได้ (Daeschel, 1989)

2.3 Low-molecular weight metabolites (Daeschel, 1989 อ้างโดย อัจฉรา, 2541)

2.3.1 ไดอะเซทิล (diacetyl)

ไดอะเซทิลเป็นผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์ไพรูเวท (pyruvate) ของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย เช่น *Lactococcus*, *Leuconostoc* และ *Pediococcus* spp. สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบได้ด้วยความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมล.

2.3.2 คาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide)

คาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากการหมักน้ำตาล hexose ของ heterofermentative สามารถลดค่า redox potential (E_h) และเป็นพิษโดยตรงกับ aerobic bacteria ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียได้

2.3.2 รูทีริน (reuterin)

รูทีรินหรือ 3-hydroxypropionaldehyde เป็นผลผลิตจากการใช้ glycerol ที่มีวิตามิน B_{12} เป็นโคเอนไซม์ (coenzyme) โดย *Lactobacillus reuteri* ซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้อย่างกว้างขวาง ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ยีสต์ รา โปรโตซัว และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค เช่น *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Candida* และ *Trypanosoma* โดยหยุดการทำงานของ ribonucleotide reductase มีการใช้รูทีรินในการป้องกันการเน่าเสียของอาหารประเภทปลาและเนื้อ

3. แบคทีริโอซิน (Bacteriocin) จากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

Tagg *et al.* (1976) ได้ให้คำจำกัดความของแบคทีริโอซินว่า เป็นสารประกอบโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่น ซึ่งมีลักษณะดังนี้

ออกฤทธิ์จำเพาะเฉพาะแบคทีเรียสปีชีส์เดียวกันหรือสปีชีส์ใกล้เคียง ผลของการออกฤทธิ์ทำให้แบคทีเรียที่ต้องการยับยั้งตาย มีตำแหน่งการยึดจับกับเซลล์ที่ถูกทำลายอย่างจำเพาะ การผลิตและการต้านทานต่อเซลล์อื่นของแบคทีริโอซินจะถูกควบคุมโดยพลาสมิด กระบวนการสังเคราะห์มีผลให้เซลล์ที่ผลิตตาย (lethal biosynthesis)

ต่อมา Montville and Kaiser (1993) ได้นิยามแบคทีริโอซินว่า เป็นสารประกอบโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่น แต่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต

เมื่อพิจารณาคุณสมบัติอื่น ๆ ของแบคทีริโอซินได้แก่ โครงสร้างปฐมภูมิ มวลโมเลกุล และการเสถียรต่อความร้อน สามารถแบ่งแบคทีริโอซินจากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ (Dykes, 1995 และ Ouwehand, 1998)

3.1 Lantibiotics เป็นเปปไทด์ขนาดเล็ก ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิด dehydrothioether lanthionine หรือ β -methylanthionine

3.2 แบคทีเรียโอซินที่เป็นเปปไทด์ขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดาลตัน ทนอุณหภูมิตั้งแต่ 100-121°C แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มย่อยได้แก่ (Nes *et al.*, 1996)

กลุ่มย่อย a เป็นแบคทีเรียโอซินซึ่งยับยั้งการเจริญของ *Listeria* ได้ดี พบในแลคติกแอซิดแบคทีเรีย หลายชนิดเช่น *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*

กลุ่มย่อย b เป็นแบคทีเรียโอซินที่ต้องอาศัยโปรตีนเป็นองค์ประกอบร่วมในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น

กลุ่มย่อย c เป็นแบคทีเรียโอซินที่ต้องอาศัยหมู่ไทออล (thiol activated bacteriocin) เป็นองค์ประกอบร่วมในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น

3.3 แบคทีเรียโอซินที่เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ รวมทั้งเอนไซม์ เช่น haemolysine และ muramirase แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้ไม่ทนความร้อนแยกได้จากสกุล *Lactobacillus* เท่านั้น เช่น casticin 80 ที่แยกได้จาก *L. casei* 80, lacticin A แยกได้จาก *L. delbrueckii*

3.4 แบคทีเรียโอซินที่มีคาร์โบไฮเดรตและ/หรือ ไขมันเป็นองค์ประกอบร่วมในการออกฤทธิ์ (complex bacteriocins)

ปัจจุบันแบคทีเรียโอซินจาก แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ได้รับความสนใจอย่างสูงทั้งในด้านการใช้เป็นสารกันเสียโดยตรง ใช้ร่วมกับกระบวนการแปรรูปอาหาร ปรับปรุงกลิ่นรสอาหารหมักดอง ป้องกันโรคด้านนมอักเสบในวัวเป็นต้น (อ้างโดย ชลัท, 2542)

4. กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียโอซินแต่ละกลุ่มมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อเซลล์เป้าหมายแตกต่างกัน แต่ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนที่เหมือนกันคือ การยึดเกาะกับผิวเซลล์และการสร้างโพรง (pore) ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งแบคทีเรียโอซินแต่ละชนิดจะมีผลต่อแบคทีเรียที่แตกต่างกัน (Jack *et al.*, 1995) เช่น

4.1 Lantibiotic แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้ไม่ต้องการตำแหน่งจำเพาะสำหรับการดูดซับที่ผิวเซลล์ การออกฤทธิ์ต้องอาศัยพลังงานจากเยื่อหุ้มของเซลล์เป้าหมาย เพื่อทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดโพรงและสูญเสียแรงเคลื่อนของโปรตอน (proton motive force) ดังนั้นเมื่อเกิดโพรงที่เยื่อหุ้มเซลล์จะมีการเคลื่อนย้ายไอออนอย่างอิสระ ทำให้ความต่างศักย์ลดลง ไม่มีการสร้างพลังงานขึ้น เซลล์ไม่สามารถนำสารอาหารขนาดใหญ่เข้าสู่เซลล์ได้ แต่น้ำสามารถไหลเข้าในขณะที่สารโมเลกุลขนาดเล็กไหลออก ทำให้เซลล์แตกเนื่องจากแรงดันออสโมติก (Sahl *et al.*, 1995)

4.2 กลุ่มแบคทีเรียโอซินขนาดเล็กที่ทนความร้อน กลุ่มนี้ต้องการตำแหน่งที่จำเพาะสำหรับการดูดซับ (absorption) ที่ผิวเซลล์และการออกฤทธิ์ไม่จำเป็นต้องใช้พลังงาน มีผลต่อเซลล์คือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการผ่านเข้าออกของสาร เกิดการสูญเสียแรงเคลื่อนโปรตอน และเกิดการหยุดสังเคราะห์ DNA, RNA และ โปรตีน (อ้างโดย ชลัท, 2542)

5. การแยกและการคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน

ประเทศไทยมีอาหารหมักดองหลายชนิดโดยแบ่งเป็นอาหารประจำภาคต่าง ๆ เช่น ภาคเหนือมีแหนม ไบเมียง ปลาต้ม ผักผลไม้ดองชนิดต่าง ๆ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีปลาร้า ปลาเจ๋ว ไส้กรอกอีสาน ภาคกลางมีน้ำปลา ซิอิ้ว นมเปรี้ยว โยเกิร์ต ภาคใต้มีน้ำบูดูและปลาแก้มแดง เป็นต้น จากการศึกษาโดย Tanasupawat and Komagata (1995) ในการแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมักดองของไทย สามารถแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากแหนมได้ 7 ชนิด ไบเมียง ผักกาดดองและไส้กรอกเปรี้ยวได้อย่างละ 5 ชนิด ปลาต้ม ส้มผักและผักเสี้ยนดองได้อย่างละ 4 ชนิด จะเห็นได้ว่าอาหารหมักดองของไทยสามารถที่จะนำมาแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังมีการศึกษาและคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโอซินจากอาหารหมักดองพื้นบ้านเช่น ผักผลไม้ดอง แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว โยเกิร์ต นมเปรี้ยวและนมโคดิบ เป็นต้น ซึ่งการศึกษามีทั้งการคัดแยกสายพันธุ์ที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน รวมถึงการศึกษาสมบัติของแบคทีเรียโอซินคั่งเช่น อาภัสรา (2537) สามารถแยก *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL จากอาหารหมักดองของไทย พบว่าแบคทีเรียโอซินที่เชื้อผลิตได้เป็นไลโปโปรตีนขนาด 33,000 และ 43,000 คาลตัน จันทรวดี (2538) สามารถแยก *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD1 จากน้ำนมโคดิบ และพบว่าแบคทีเรียโอซินที่เชื้อผลิตได้เป็นไลโปโปรตีนขนาด 1,100 คาลตัน สิรินาถ (2539) แยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโอซินได้ 5 สายพันธุ์ คือ *L. casei* sp. *rhamnosus* สายพันธุ์ SN11 *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ SN61 และ *L. Lactis* สายพันธุ์ SN33, SN 48 และ 62 ชลัท (2542) แยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากน้ำนมโคดิบพบว่า สายพันธุ์ NSC1 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* สร้างสารยับยั้งที่เป็นแบคทีเรียโอซินที่มีความเสถียรต่อพีเอชตั้งแต่ 2-9 ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 15 นาทีโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงการออกฤทธิ์ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ และพบว่าเชื้อมียีนที่ควบคุมการผลิตไนซินแซค (nis z)

การคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโอซินสามารถทำได้ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว โดยในอาหารแข็งจะใช้วิธีทดสอบการยับยั้งเชื้อทดสอบ (test organism) โดยจะดูได้จากการเกิด clear zone ซึ่งเกิดจากการแพร่ของแบคทีเรียโอซินไปยับยั้งเชื้อทดสอบ ส่วนในอาหารเหลวจะตรวจสอบการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ โดยการวัดการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่ง Hoover and Harlander (1993) ได้สรุปเทคนิคการคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโอซินได้ดังนี้

5.1 การคัดเลือกด้วยอาหารแข็งหรือกึ่งแข็ง

5.1.1 วิธีที่เชื้อเจริญพร้อมกัน (simultaneous methods) เป็นวิธีที่สะดวกและใช้เวลาสั้น เนื่องจากเชื้อที่ผลิตแบคทีเรียโอซินเจริญพร้อมกับเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะเดียวกัน ซึ่งเหมาะกับเชื้อที่ผลิตแบคทีเรียโอซินในช่วงต้นของการเจริญ และเชื้อทดสอบสามารถเจริญได้รวดเร็วหรือเข้าสู่ระยะเจริญขั้น log phase ได้ก่อนที่แบคทีเรียโอซินจะแพร่และออกฤทธิ์ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธีเช่น

Paper disc diffusion method (วิธีการแพร่จากแผ่นกระดาษกลม)

วิธีนี้จะใช้แผ่นกระดาษกลม ขนาด 6.5-7.0 มม. ที่มีความสามารถในการดูดซับได้ดี ชุบน้ำเลี้ยงที่มีเชื้อเจริญอยู่ แล้วนำไปวางบนอาหารที่ป้ายเชื้อทดสอบ (swab) ไว้ โดยใช้อาหารตามความเหมาะสมของเชื้อทดสอบ เช่น *Bacillus cereus* ใช้ nutrient agar ยีสต์ ใช้ malt extract yeast extract glucose agar เป็นต้น วิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถทำได้ง่าย สะดวก การปนเปื้อนเกิดขึ้นได้น้อย วงใส clear zone อยู่ได้นาน สามารถทำได้ 5-6 ตัวอย่างต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

Agar well diffusion method (วิธีการเจาะหลุม)

วิธีนี้จะผสมเชื้อทดสอบกับอาหารแล้วนำไป pour plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่รองกัน plate ไว้ (base layer) ซึ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จะมีลักษณะของอาหารเป็น 2 ชั้นเพื่อป้องกันสารละลายซึมเข้าหากัน จากนั้นจะใช้ cork borer เจาะให้เป็นหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มม. เจาะหลุมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อชั้นแรก วิธีนี้เหมาะสำหรับการทดสอบหาสารที่ต้องการที่มีปริมาณความเข้มข้นต่ำ ๆ เนื่องจากสามารถบรรจุสารในหลุมได้ในปริมาณมาก แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือสารที่ซึมผ่านอาจไม่สม่ำเสมอ หรือมีการรั่วซึมออกมาทำให้วงใสเลอะเลือน เกิดการปนเปื้อนได้ง่าย เวลาเมื่อผลต่อขนาดของวงใสใช้เวลาในการทำงาน ทำให้ไม่เป็นที่นิยม

Cylinder cup method (วิธีใช้ถ้วยทรงกระบอก)

ใช้ถ้วยสแตนเลสรูปทรงกระบอกที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางด้านนอก 8 มม. เส้นผ่าศูนย์กลางด้านใน 6 มม. และสูง 10 มม. ด้านหัวท้ายเปิดและผิวหน้าต้องเรียบ นำไปวางบนอาหารที่ผสมเชื้อทดสอบแล้ว pour plate ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว ในการวางถ้วยลงบนอาหารอุ่นควรจะลงไฟก่อน เพราะจะทำให้ถ้วยเกาะติดบนอาหารได้ดี แล้วจึงใช้ปากก๊อบกดบนถ้วยเบา ๆ แล้วจึงหยดสารที่ต้องการทดสอบลงให้เต็มถ้วย หรือสามารถกำหนดปริมาณสารที่ใส่ได้

5.1.2 วิธีที่เชื้อเจริญไม่พร้อมกัน (deferred method) วิธีนี้เชื้อที่ผลิตแบคทีเรียโอซินจะเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จากนั้นจึงเททับด้วยอาหารอุ่นหลอมซึ่งเดิมเชื้อทดสอบ แล้วจึงนำไปบ่มอีกครั้งภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อทดสอบ

5.2 การคัดเลือกด้วยอาหารเหลว วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมมากนักเนื่องจากมีขั้นตอนที่ค่อนข้างยุ่งยาก แต่มีข้อดีในการตรวจสอบผลของแบคทีเรียโอซินได้ชัดเจน เนื่องจากสามารถกำจัดปัจจัยอื่น ๆ ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ เช่น การปรับ pH ให้เป็นกลาง เพื่อลดผลของกรด การเติมเอนไซม์อะไมเลสเพื่อลดผลจาก H_2O_2 การคัดเลือกด้วยวิธีนี้ เช่น การใช้สารละลายที่ผ่านการเตรียมเพื่อใช้ทดสอบการยับยั้งเติมในอาหารเหลวซึ่งมีเชื้อทดสอบและติดตามการยับยั้งโดยการวัดการเจริญด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์หรือนับจำนวนโคโลนี

จะเห็นได้ว่ามีวิธีการทดสอบและการคัดเลือกอยู่หลายวิธี ดังนั้นในการปฏิบัติจะต้องเลือกใช้วิธีการใดวิธีการหนึ่งที่มีความเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ที่จะนำไปใช้และเหมาะสมกับสภาวะแวดล้อม จึงต้องมีการศึกษาถึงวิธีการทดสอบต่าง ๆ เพื่อให้ทราบถึงวิธีการปฏิบัติตลอดจนข้อดีข้อเสียของแต่ละวิธีเพื่อที่จะนำไปใช้ได้ถูกต้องและเหมาะสม

6. การเก็บรักษาเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

การเก็บเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียไว้เป็น stock culture มักประสบปัญหาเชื้อตายง่ายหรือลดประสิทธิภาพของเชื้อบางอย่าง (ลด activity) เนื่องจากกรดที่เชื้อผลิตขึ้นสามารถทำลายหรือฆ่าตัวมันเองได้ อีกทั้งการเก็บโดยวิธีมาตรฐานหรือการเก็บแบบแห้ง ภายใต้สูญญากาศ (freeze-drying) หรือเก็บแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196°C ในถังไนโตรเจนเหลว ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ยอมรับกันแพร่หลาย แต่ก็มีข้อจำกัดคือ อุปกรณ์มีราคาแพงต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเนื่องจากมีขั้นตอนยุ่งยาก จึงทำให้เกิดอุปสรรคในด้านการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ การเก็บแลคติกแอซิดแบคทีเรียก็ประสบปัญหาและอุปสรรคนี้เช่นกัน ดังนั้นจึงมีผู้ศึกษาค้นคว้าการเก็บด้วยเทคนิคง่าย ๆ และประหยัด ดังเช่น การเคลือบเซลล์ *Lactobacilli* บนผิวเม็ดแก้วแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -60°C ถึง -80°C (Jones et al., 1984) วันเจริญและคณะ (2537) ได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเก็บรักษาแลคติกแอซิดแบคทีเรียโดยวิธีเก็บบนกระดาษกรอง เก็บในเจลาติน เก็บในเม็ดแก้ว เปรียบเทียบกับการเก็บด้วยวิธีมาตรฐานแบบถาวร (lyophilization) พบว่าจากผลการตรวจนับเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากเก็บไว้ 12 เดือน ทั้ง 3 วิธีจะเหลือเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่ระหว่าง 10^3 - 10^6 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เก็บโดยวิธีมาตรฐานจะเหลือเซลล์รอดชีวิต 10^6 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งการเก็บรักษาแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 3 วิธีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่ในจำนวนที่กำหนดไว้เป็นที่ยอมรับของสากลคือไม่ต่ำกว่า 10^3 หน่วยโคโลนีต่อมล. ศิริพรรณ (2535) ได้เสนอการเก็บเชื้อแบคทีเรียทั่วไปใน 20% glycerol broth ไว้ในตู้แช่แข็ง -20°C หรือเก็บในช่องทำน้ำแข็งของผู้เย็นธรรมชาติ ซึ่งสามารถเก็บรักษาเชื้อไว้ใช้ได้ทั้งในระยะสั้นหรือระยะยาวนานหลาย ๆ ปีได้ ซึ่งสอดคล้องกับการเก็บเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียของ ชลัท (2542) ที่เก็บเชื้อไว้ในอาหารเหลว M17 หรือ MRS ที่เติม glycerol 15% และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

วิธีการเก็บเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (วันเจริญ และคณะ, 2537)

6.1 การเก็บบนกระดาษกรอง นำกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 มาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1 ซม. x 1 ซม. ห่อด้วยกระดาษฟอยล์นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C 15 นาที นำแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงไว้นานเจ็ดวันที่ ผสมกับ 10% skim milk ที่ฆ่าเชื้อแล้วเรียงแผ่นกระดาษกรองบนจานอาหารเพาะเชื้อ (Petridish) ใช้ micropipette ดูดเชื้อแล้วนำมาหยดลงบนแผ่นกระดาษกรอง ปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปใส่ในโถดูดความชื้น ดูดอากาศออกโดยให้อยู่ในสภาพสูญญากาศนาน 3-4 อาทิตย์ จนกระดาษซับเชื้อแห้งสนิท เก็บเชื้อไว้ในหลอดฝาเกลียวที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปิดฝาให้สนิทเพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป

6.2 การเก็บในเจลาติน นำแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงไว้นานเจ็ดวันที่มาผสมกับ nutrient gelatin 3 มล. ในหลอดทดลองที่ฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบนจานพลาสติก (plastic petridish) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปใส่ในตู้แช่แข็ง -20°C ถึง -40°C เพื่อให้เจลาตินแข็งตัว แล้วนำมาใส่ freeze dryer เพื่อดูดน้ำออกจากเจลาตินจนกระทั่งแห้งสนิท จะได้เม็ดเจลาตินที่มีเชื้ออยู่ และเก็บไว้ในหลอดแก้วฆ่าเชื้อปิดฝาให้สนิทเพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป

6.3 การเก็บในเม็ดแก้ว ใช้ MRS broth + 15% (v/v) glycerol 1 มล. ผสมกับเชื้อที่ต้องการเก็บ นำเม็ดแก้วปลอดเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ไปในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ให้เซลล์แบคทีเรียเคลือบผิวเม็ดแก้ว ดูดสารละลายที่เหลือออกนำหลอดเม็ดแก้วเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -70°C ถึง -80°C

6.4 การเก็บเชื้อใน 20% glycerol tryptose broth (ศิริพรรณและวนิดา, 2535)

เตรียม broth สำหรับเก็บเชื้อดังนี้

Tryptose broth 2%	80	มล.
Glycerol A.R.	20	มล.

ผสมให้เข้ากันดีแล้วบรรจุในหลอด ๆ ละ 2 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ 15 นาที

เจียโคโลนีเชื้อประมาณ 1 หลวงถ่ายเชื้อ คนให้เชื้อกระจายตัวไม่จับกันเป็นก้อนใน glycerol broth ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-10 นาที นำเข้าตู้แช่แข็ง -20°C หรือช่องทำน้ำแข็งของตู้เย็นธรรมดาเวลาต้องการนำเชื้อกลับมาใช้ ให้เตรียมอาหารในลักษณะอาหารเหลวที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ นำหลอดเก็บเชื้อออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนละลายแล้วจึงถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาตามความเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ แล้วจึงนำไปถ่ายเชื้อลงบนจานอาหารแข็ง ซึ่งวิธีการเก็บเชื้อแบบนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการเก็บแบคทีเรียทั่วไปได้

7. การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์บางส่วน (Partial purification of protein)

เอนไซม์หรือแบคทีเรียโอซินต่างก็มีโครงสร้างเป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง (Hoover and Steenson, 1993) ดังนั้นการที่จะศึกษาถึงคุณสมบัติของเอนไซม์หรือแบคทีเรียโอซินจะต้องอาศัยเทคนิคและวิธีการสำหรับแยกและการทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้หลักการเช่นเดียวกับการแยกและการทำให้โปรตีนให้บริสุทธิ์ ซึ่งมีอยู่หลายวิธี เช่น เทคนิคอุลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration technique) การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (protein precipitation by ammonium sulfate) การระเหยแห้ง (Freeze-drying) เทคนิคไดอะไลซิส (dialysis technique) โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange chromatography) เจลฟิลเตรชัน (gel filtration) อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นต้น การทำให้โปรตีนให้บริสุทธิ์ไม่สามารถทำได้โดยเลือกใช้วิธีการใดวิธีการหนึ่งเพียงอย่างเดียว แต่จำเป็นต้องอาศัยหลักการหลายๆ วิธีที่เกี่ยวข้องมาประยุกต์ใช้ร่วมกัน การเลือกวิธีการที่เหมาะสมควรทราบถึงคุณสมบัติของโปรตีนและสภาวะที่ใช้ จะทำให้ง่ายต่อการทำให้โปรตีนให้บริสุทธิ์ (Janson and Ryden, 1989)

7.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

การที่โปรตีนจะตกตะกอนได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความสามารถในการเกาะกันระหว่างน้ำกับโปรตีน เนื่องจากโปรตีนในสารละลายมีน้ำอยู่ด้วยทำให้โมเลกุลของโปรตีนจะจับกับโมเลกุลของน้ำได้ดีกว่าการจับกับโมเลกุลของโปรตีนเอง หรือโปรตีนเป็นสารประกอบที่มีหมู่โพลาร์ (Polar group) จำนวนมากเช่น $-NH^+$, $-COO^-$, $-OH$ หมู่โพลาร์เหล่านี้จะจับกับน้ำได้ดี ดังนั้นถ้าทำให้โปรตีนจับกับน้ำได้น้อยลง จะทำให้โปรตีนตกตะกอนได้ การตกตะกอนโดยการเติมเกลือ (neutral salts) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นวิธีการที่นิยมใช้กันมาก สำหรับการตกตะกอนโปรตีนเบื้องต้น เช่น การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นสูง ๆ (ammonium sulfate, $(NH_4)_2SO_4$) ซึ่งสามารถตกตะกอนโปรตีนได้เรียกว่าการเกิด salting out effect เกิดจากไอออนของเกลือดึงโมเลกุลของน้ำออกจากโมเลกุลของโปรตีน ทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีโอกาสจับกันเองมากขึ้น จึงตกตะกอนลงมา โปรตีนแต่ละชนิดมีประจุแตกต่างกันนั่นคือการแยกโปรตีนแต่ละชนิดออกจากกันสามารถทำได้โดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ในขั้นแรกจะตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ก่อน และจะค่อย ๆ เพิ่มความเข้มข้นไปเรื่อย ๆ เรียกกระบวนการนี้ว่า fractionated precipitation โปรตีนชนิดต่าง ๆ จะถูกแยกออกไปได้ตามความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต สารละลายที่มีความเข้มข้นของโปรตีนต่ำจะต้องใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นสูง ๆ ในการตกตะกอน ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถรักษาเสถียรภาพและแอคติวิตีของโปรตีนได้ดี และยังช่วยลดการปนเปื้อนของเบคทีเรียได้ แต่ควรทำการตกตะกอนโปรตีนที่อุณหภูมิ $4^\circ C$ เพื่อเป็นการรักษาเสถียรภาพของโปรตีนได้อีกทางหนึ่ง (Harris and Angal, 1989)

7.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยผงถ่าน (activated charcoal)

ถ่าน (charcoal) คือส่วนที่เหลืออยู่ของไม้ที่ถูกเผาไหม้บางส่วน มักใช้กันแพร่หลายในรูปของเชื้อเพลิงชนิดหนึ่งที่มีประสิทธิภาพให้อุณหภูมิสูงและเผาไหม้โดยไม่มีควัน ส่วนผงถ่าน (activated charcoal) คือถ่านที่เผาไล่อากาศออกไปแล้ว โครงสร้างของผงถ่านประกอบด้วยกลุ่มก้อนของผลึกเล็ก ๆ จำพวกแกรไฟท์และผลึกเหล่านี้จะรวมกลุ่มกันในลักษณะแบบสุ่ม (random) เกิดเป็นที่ว่างระหว่างผลึกซึ่งมีลักษณะเป็นรูพรุนเล็ก ๆ พื้นผิวของผงถ่านเป็นแบบไม่มีขั้ว แต่อาจจะมีบางส่วนที่มีขั้วเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยา oxidation ทำให้ผงถ่านเป็นตัวดูดซับที่มีแนวโน้มจะเป็น hydrophobic และ organophilic ดังนั้นจึงมีการนำผงถ่านมาใช้อย่างกว้างขวางในการดูดซับสารอินทรีย์ การทำให้น้ำบริสุทธิ์ การดูดก๊าซ และการกำจัดสิ่งเจือปนในของเหลว โปรตีนเป็นสารอินทรีย์ชนิดหนึ่งดังนั้นจึงใช้ผงถ่านเป็นตัวดูดซับได้ แต่ไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากอาจมีการรบกวนของผงถ่านซึ่งไม่สามารถละลายในสารละลายได้ และจะต้องมีวิธีการละลายเอาโปรตีนที่ผงถ่านดูดซับออกมาซึ่งเป็นวิธีการที่ยุ่งยาก นอกจากนี้ยังต้องศึกษาความเหมาะสมของความเข้มข้นและเวลาที่ใช้ในการตกตะกอนด้วย มักจะนิยมใช้ในการดูดซับสีและกลิ่นเป็นส่วนใหญ่ (Ruthven, 1984)

7.3 ไคอะไลซิส (dialysis)

เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลขนาดต่างกันที่ละลายอยู่ในสารละลาย โดยใช้เมมเบรนที่มีรูพรุน มักใช้แยกเกลือและสารโมเลกุลเล็กออกจากสารที่มีโมเลกุลใหญ่ วิธีนี้จะอาศัยการแพร่ (diffusion) ของสารที่มีโมเลกุลเล็ก ๆ ผ่านรูของไคอะไลซิสเมมเบรนที่ทำเป็นถุงบรรจุสารตัวอย่างไว้ภายในถุงและมัดหัวท้ายให้แน่น แล้วนำไปแช่ในภาชนะที่บรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความแรงของไอออน (ionic strength) ต่ำกว่าสารละลายภายในถุง รูของเมมเบรนจะเล็กเกินกว่าที่สารโมเลกุลใหญ่ ๆ เช่น โปรตีนแพร่ผ่านได้ แต่สารโมเลกุลที่เล็กกว่าจะแพร่ผ่านออกนอกถุงเมมเบรนได้อย่างอิสระ การแพร่ของสารโมเลกุลเล็กนี้จะหยุดเมื่อความเข้มข้นของสารโมเลกุลเล็กภายในถุงไคอะไลซิสเท่ากับสารละลายบัฟเฟอร์ในภาชนะ ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 4-6 ชั่วโมง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ในภาชนะบ่อย ๆ เพื่อให้สารโมเลกุลเล็กแพร่ออกจากถุงได้หมดหรือมีความเข้มข้นลดลงเรื่อย ๆ วัสดุที่ใช้ทำถุงไคอะไลซิสเมมเบรนมีหลายชนิด เช่น colloidion, cellophane และ cellulose ส่วนขนาดรูพรุนจะมีให้เลือกใช้ได้ในช่วง 1,000-50,000 และขนาดของถุงจะมีให้เลือกใช้ตามปริมาณของสาร ถุงไคอะไลซิสในทางการค้ามักจะมีสารเจือปนอยู่มากเช่น glycerol ไอออนของโลหะหนัก บางครั้งอาจมี hydrolytic enzyme (proteinases, nucleases) ดังนั้นก่อนใช้จะต้องกำจัดสิ่งเจือปนเหล่านี้ก่อน โดยการตัดถุงเมมเบรนตามขนาดที่ต้องการใช้ แล้วนำไปทำความสะอาดโดยการผ่านน้ำไหลอย่างน้อย 5 นาที แล้วนำมาล้างน้ำกลั่นสะอาดอย่างน้อย 5 ครั้ง หรือทำความสะอาดตามคำแนะนำของบริษัท ถุงไคอะไลซิสเมมเบรนที่ผ่านการทำความสะอาด

แล้วสามารถเก็บไว้ที่ 4°C ในน้ำกลั่นที่มี sodium azide หรือ chloroform 3-4 หยด หรือ 20% เอธานอล เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การทำไคอะไลซิสควรทำที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรักษาสภาพของโปรตีนและควรรวกละลายในภาชนะเบา ๆ ตลอดเวลา เพื่อช่วยให้สารโมเลกุลเล็กเกิดการกระจายออกจากถุงเมมเบรนได้เร็วขึ้น ไม่ควรใช้สารละลายจนเต็มถุงเกินไป ไม่ควรจับถุงไคอะไลซิสหลังจากทำความสะอาดแล้ว เทคนิคการทำไคอะไลซิสมักจะทำหลังจากการทำ freeze-dry หรือการตกตะกอนด้วยเกลือ เพื่อกำจัดเอาเกลือที่มากเกินไปออกจากสารละลาย (Mc Phie, 1971)

7.4 อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis)

อิเล็กโตรโฟรีซิส เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารที่มีประจุบนโมเลกุลโดยอาศัยการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไปยังขั้วไฟฟ้า (electrode) ด้วยอัตราเร็วไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับประจุ ขนาดและรูปร่างของโมเลกุลนั้น ๆ ประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปตามทิศทางของสนามไฟฟ้าวิ่งเข้าหาขั้วลบ และประจุลบจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก ดังนั้นชีวโมเลกุลที่มีประจุต่างกันย่อมมีแรงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกัน โปรตีนมีประจุได้เนื่องจากการแตกตัวของหมู่เอมิโน หมู่คาร์บอกซิล และหมู่อื่น ๆ ใน side chain ซึ่งจะแสดงประจุบวกหรือลบจำนวนเท่าใดขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนและ pH ของบัฟเฟอร์ โดยที่ค่า pH หนึ่ง ๆ ของสารละลายโปรตีนแต่ละชนิดจะมีปริมาณของประจุสุทธิแตกต่างกันออกไป ซึ่งหากจะเป็นบวกก็จะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบ (cathode) ประจุสุทธิเป็นลบก็จะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก (anode) หรือมีประจุสุทธิเป็นกลางหรือเท่ากับ 0 สารนั้นก็จะไม่เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า ดังนั้นประจุสุทธิบนโมเลกุลของโปรตีน จะขึ้นอยู่กับ pH ของบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย และอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของสารในสนามไฟฟ้า ก็จะขึ้นอยู่กับปริมาณของประจุบนโมเลกุลนั้น ๆ และก็ยังขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของโมเลกุลอีกด้วย

อิเล็กโตรโฟรีซิสมีหลายชนิดซึ่งจำแนกออกตามชนิดของตัวกลางที่สารเคลื่อนที่ผ่าน ซึ่งตัวกลางนั้นต้องมีความสมบัติเหนียวเช่น starch gel, polyacrylamide, agar, agarose เป็นต้น ตัวกลางที่สารเคลื่อนที่ผ่านทุกชนิดจะต้องแช่อยู่ในบัฟเฟอร์ เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าสารที่ต้องการแยกจะแยกออกเป็นแถบตามประจุสุทธิตามลักษณะรูปร่างและขนาดของสาร ซึ่งจะสามารถตรวจหาตำแหน่งของสารนั้นได้โดยวิธีการย้อมสีซึ่งสีที่นิยมใช้ย้อมได้แก่ cromassie brilliant blue R-250 หรือ Silver stain (Cooper, 1977)

ปัจจุบันวิธีการอิเล็กโตรโฟรีซิสเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการบ่งชี้ บอกขนาดของสารโมเลกุลใหญ่ ๆ ตลอดจนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารนั้นด้วย Gel-electrophoresis ที่มีตัวกลางเป็น agarose หรือ Polyacrylamide เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการแยกและวิเคราะห์สาร

ละลายของโปรตีนได้อย่างถูกต้องและรวดเร็วสำหรับในที่นี่จะกล่าวถึงเฉพาะ SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เป็นเทคนิคทาง electrophoresis วิธีหนึ่งที่ใช้แยกโปรตีนตามขนาดของโมเลกุล จึงมีประโยชน์ในการหามวลโมเลกุลของโปรตีน เนื่องจาก SDS (sodium dodecyl-sulphate) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างคือ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}-\text{O}-\text{SO}_3^- \text{Na}^+$ ซึ่งมีทั้งส่วนที่เป็น hydrophobic และ hydrophilic หรือส่วนที่เป็น polar และ nonpolar อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน ซึ่งจะทำให้เกิดการทำลายพันธะต่าง ๆ ของโมเลกุลโปรตีน ทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ แต่พันธะโควาเลนต์ในโมเลกุลของโปรตีนจะไม่ถูกทำลาย ทำให้ประจุสุทธิต่อมวลเท่ากันหมด ดังนั้นจึงใช้หามวลโมเลกุลของโปรตีนได้ โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล เนื่องจากการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลแตกต่างกันจะได้ระยะทางการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันด้วย จึงสามารถวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ปรากฏและความยาวของเจลนำไปคำนวณหาค่า relative mobility (R_m) นำค่า R_m ของโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองไปพล็อตกราฟระหว่าง log มวลโมเลกุลกับค่า R_m จะได้กราฟเส้นตรงซึ่งสามารถหามวลโมเลกุลของสารตัวอย่างได้จากการลากเส้นบนแกน R_m ไปตัดเส้นกราฟมาตรฐานแล้วอ่านค่า log มวลโมเลกุลได้จากกราฟ (Pharmacia, 1982)

8. จุลินทรีย์ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

จุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเป็นพิษแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม (Eley, 1996) ได้แก่

1. **Infective bacterial food poisoning** ได้แก่ *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, other *Vibrio* spp., *Yersinia enterocolitica* และ *Campylobacter* sp.
2. **Toxic bacterial food poisoning** ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Cl. Perfringens*, *Bacillus cereus* (emetic), *B. cereus* (diarrhoea) และ *Escherichia coli*
3. **แบคทีเรียก่อโรคอื่น ๆ** ได้แก่ *Listeria monocytogenes*, *Shigella* sp., *Aeromonas* sp., *Plesiomonas shigelloides*, *Streptococcus pyogenes* และ *Enterococcus faecalis*
4. **Mycotoxic fungi** ได้แก่ *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. และ *Fusarium* spp.
5. **ฟังไจ ไวรัสและโปรโตซัว** ได้แก่ *Cryptosporidium parvum*, SRSV group, Rotaviruses, Astroviruses และ *Giardia lamblia*

ในการแบ่งกลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าว นักจุลชีววิทยาทางอาหารหรือประวัติของจุลินทรีย์ในอาหาร จะกล่าวถึงจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Jay, 1986) เช่น *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae* และ *V. parahaemolyticus* นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารเช่น ยีสต์และรา

เป็นต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้เลือกจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารมาเป็นเชื้อทดสอบ (test organism) ได้แก่

8.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

E. coli เป็น gram negative aerobe และ facultatively anaerobic rod สามารถใช้น้ำกลูโคส และให้กรดและยังสามารถใช้น้ำตาลตัวอื่น ๆ ได้ด้วย ส่วนใหญ่ต้องการ oxygen ในการเจริญ สร้าง antigen ได้ 3 แบบคือ Somatic antigen group (O antigen), Capsular antigen group (K antigen) และ Flagella antigen group (H antigen)

E. coli พบได้ในลำไส้ใหญ่และอุจจาระของคนและสัตว์เลือดอุ่น ในปี ค.ศ. 1887 Escherich ได้ตรวจพบ *E. coli* ในอุจจาระของคนปกติ ต่อมาปี ค.ศ. 1892 Sherdinger ได้สรุปว่า *E. coli* สามารถใช้เป็นดัชนีที่ชี้ว่ามีการปนเปื้อนของอุจจาระของคนและสัตว์เลือดอุ่น สามารถก่อโรคในระบบต่าง ๆ ของร่างกายได้หลายระบบได้แก่ โรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ เช่น กระเพาะปัสสาวะอักเสบ (cystitis) กรวยไตอักเสบ (pyelitis) กรวยไตและไตอักเสบ (pyelonephritis) นอกจากนี้ยังสามารถก่อโรคอื่น ๆ ได้อีก เช่น ติดเชื้อในแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก แผลผ่าตัด ท่อน้ำดีอักเสบเฉียบพลัน (acute cholangitis) ฝีในตับ ปอดบวม และ septicemia (Buckle *et al.*, 1989)

การทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร แบ่งได้ 5 กลุ่มคือ

1. **Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)** เชื้อกลุ่มนี้จะสร้างสารพิษที่มีลักษณะคล้ายกับสารพิษจากเชื้ออหิวาตกโรค หรือ cholera toxin-like enterotoxins ในลักษณะที่เป็น heat-stable enterotoxins (ST) และ heat-labile enterotoxins (LT) ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ ปวดท้องอย่างรุนแรง มีไข้ต่ำ ๆ และเป็นตะคริว เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในเด็กเล็กและกลุ่มนักท่องเที่ยว อาการถึงแม้จะรุนแรงแต่ไม่เป็นสาเหตุการตายมากนัก

2. **Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)** เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงอย่างเฉียบพลันในเด็กเล็ก โดยเฉพาะในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 2 ขวบ อาการที่สำคัญคือ มีไข้ อาเจียน อุจจาระเป็นน้ำ มีมูกปนแต่ไม่มีเลือด serotypes ที่สำคัญของ EPEC คือ 0-55 และ 0-111

3. **Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)** เป็นเชื้อที่เข้าทำลายเนื้อเยื่อผิวของลำไส้ (intestinal epithelium) อาการของโรคนี้จะมีลักษณะเช่นเดียวกับอาหารของโรคบิดที่เกิดจากเชื้อในกลุ่ม *Shigella* sp. คือถ่ายอุจจาระเป็นน้ำมีมูกเลือดปน มีไข้ ปวดท้องอย่างรุนแรงและเป็นตะคริว

4. **Enteraggative *E. coli* (EAggEC)** เชื้อกลุ่มนี้เกาะติดกับผนังลำไส้โดยไม่สร้างสารพิษทั้ง LT หรือ ST และไม่ทำลายเนื้อเยื่อเซลล์ แต่จะทำให้เกิดอุจจาระร่วงเรื้อรัง ถ่ายเป็นน้ำ อาเจียน ขาดน้ำ บางครั้งมีอาการปวดท้อง มีไข้ และถ่ายอุจจาระมีเลือดปน

5. **Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)** เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคของระบบทางเดินอาหาร ซึ่งสามารถติดต่อผ่านได้ทั้งทางน้ำและอาหาร โดยการกิน (oral-fecal-route) เชื้อชนิดนี้สร้างสารพิษที่มีลักษณะคล้ายกับสารพิษที่สร้างจากเชื้อ *Shigella* 2 ชนิดคือ

Shiga-like-toxins I (SLT-I) หรือ verotoxin I (VT-I) และ Shiga-like-toxins II (SLT-II) หรือ verotoxin II (VT-II)

ซึ่ง toxin ทั้ง 2 ชนิดทำให้เกิด hemolytic uremic syndrome (HUS) และ hemorrhagic colitis ในคน สามารถติดต่อผ่านจากสัตว์สู่สัตว์ สัตว์สู่คนและคนสู่คนได้โดยทางอาหารและน้ำ หรือการสัมผัสกันอย่างใกล้ชิด สายพันธุ์ *E. coli* ที่สำคัญของกลุ่มนี้คือ “*Escherichia coli* 0157:H7”

อาการของโรค มีอาการปวดท้อง ท้องเป็นตะคริว อุจจาระร่วงเป็นครั้งคราวและมีเลือดปน (Blood diarrhea) อาการแทรกซ้อนที่สำคัญคืออาการ Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) ซึ่งเป็นสาเหตุนำไปสู่ภาวะไตวาย สมองอักเสบ เส้นเลือดในสมองแตก ซึ่งอาการแทรกซ้อนดังกล่าวเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของผู้ป่วย ระยะฟักตัว 3-8 วัน (ลัดดา, 2539)

8.2 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม การเรียงตัวคล้ายพวงองุ่น ไม่สร้างสปอร์ โคโลนิมีสีเหลืองทอง เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35-37°C และภาวะที่มีเกลือเข้มข้น เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาเกือบทุกชนิดที่ pH 4.8-7.4 สร้างรงควัตถุได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 20°C ในบรรยากาศที่มี CO₂ สูงกว่าปกติ สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาทีและทนความเย็นที่ 4°C ได้นานหลายเดือน พวกที่ก่อโรคจะสร้างเอนไซม์ coagulase ที่ทำให้พลาสมาแข็งตัวได้ เชื้อนี้มักอาศัยอยู่ตามผิวหนังหรือเยื่อเมือกในร่างกายของคนและสัตว์ *S. aureus* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งสายพันธุ์ที่ก่อโรคจะสร้างสารพิษเอนเทอโรท็อกซิน (enterotoxin) โดยปกติแล้วเชื้อจะถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน และสารที่ใช้ฆ่าเชื้อทั่วไป แต่ enterotoxin สามารถทนความร้อน 100°C นานกว่า 30 นาทีได้ ถ้าร่างกายได้รับเชื้อในปริมาณมากกว่า 10⁷ ต่อกรัมหรือได้รับ enterotoxin ในปริมาณ 1 µg จะทำให้เกิดอาการโรคอาหารเป็นพิษได้ ดังนั้นอาหารที่ปรุงสุกแล้วถึงแม้จะตรวจไม่พบเชื้อ แต่ก็ยังไม่ปลอดภัยจากโรคอาหารเป็นพิษ เนื่องจาก enterotoxin สามารถทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ซึ่ง enterotoxin นี้จะไม่ทำให้ สี กลิ่นหรือรสชาติของอาหารผิดไปจากเดิม จึงยากแก่การสังเกต การตรวจพบ *S. aureus* ในอาหารเป็นดัชนีบ่งชี้ถึงสุขลักษณะส่วนบุคคลที่ไม่ดี โดยเชื้ออาจปนเปื้อนมาจากผู้ประกอบการอาหารที่เป็นโรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ หรือผิวหนังที่มีบาดแผล เป็นฝั หนอง อาหารที่เกิดโรคอาหารเป็นพิษ จะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียนรุนแรง ปวดท้อง อุจจาระร่วง

ถ่ายเหลวจนถึงถ่ายเป็นน้ำ อาการเกิดขึ้นหลังจากรับประทานอาหารภายใน 1-6 ชั่วโมง (Buckle *et al.*, 1989)

8.3 *Vibrio parahaemolyticus*

เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นแท่งโค้ง (curved rod) หรือเป็นแท่งตรง คัดสีแกรมลบ ขนาด 1.5-2.0x0.3-0.4 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างแคปซูล เคลื่อนไหวได้รวดเร็วด้วย Polar flagellum ซึ่งมีอยู่ 1 เส้นที่ปลายด้านใดด้านหนึ่ง เจริญเติบโตได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ 1-3% แต่ถ้ามากกว่า 10% เชื้อจะตาย selective media ที่มี bile salt, bismuth sulfite หรือ tellurite เช่น thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS agar) จะให้ลักษณะโคโลนีกลมขอบเรียบ สีเขียว แหล่งที่พบเชื้อพบว่าสัตว์ทะเลหรืออาหารทะเลจะมีโอกาสที่เชื้อนี้จะปนเปื้อนอยู่มาก เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษหรือกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ เกิดจากการกินอาหารทะเลที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนอยู่ โดยเฉพาะพวก ปู ปลา กุ้ง หอย ที่นำมาปรุงสุก ๆ ดิบ ๆ โดยปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดอาการภาวะอาหารเป็นพิษประมาณ 10^5 - 10^9 เซลล์ต่อกรัม อาการมักจะปรากฏหลังจากรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ประมาณ 10 ถึง 20 ชั่วโมง บางรายอาจแสดงอาการภายใน 2 ถึง 48 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นในลำไส้และสร้างสารพิษขึ้น ทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการปวดท้อง ท้องเดิน มักมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ อาจมีไข้ต่ำ ๆ บางรายอาจมีอาการคล้ายเป็นบิด มีไข้ ถ่ายอุจจาระเป็นมูกเลือด อาการจะหายไปภายใน 2 ถึง 5 วัน เชื้อจะถูกทำลายได้ง่ายที่อุณหภูมิ 60°C 15 นาที ไม่ทนต่อสภาวะที่เป็นกรด pH 4.4 เชื้อจะตายภายใน 30 วินาที ดังนั้นการป้องกันโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* ควรบริโภคอาหารทะเลที่สดและปรุงสุกจะปลอดภัยจากเชื้อนี้ได้ (Robert *et al.*, 1984)

8.4 *Salmonella enteritidis*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 35-37°C เคลื่อนที่ได้โดย peritrichous flagella เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ เชื้อจะสามารถสร้างเ็นโดท็อกซิน (endotoxin) เชื้อจะเข้าสู่ร่างกายจากการปนเปื้อนมากับอาหารและมาอาศัยอยู่บริเวณทางเดินอาหาร เพิ่มจำนวนเซลล์ในลำไส้และสร้างเ็นโดท็อกซินภายใน 6-12 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ และเชื้อสามารถอยู่ในลำไส้ได้นาน 10 วัน อาการของโรคจะมีอาการระว่งอย่างเฉียบพลัน และอาการเป็นตะคริวที่ท้อง มีไข้ อาเจียน มีอาการม้ามโตร่วมด้วย (Elliott *et al.*, 1988)

ปัจจุบัน *Salmonellae* มีทั้งหมดประมาณ 3,000 serovars ซึ่งทำให้เกิดโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ การเกิดโรคมียุค 3 แบบได้แก่

1. Enteric fever หมายถึงไข้ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์ สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อ *S. typhi* และ *S. paratyphi* A,B และ C

2. Food poisoning หลังจากที่ยกอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้ออยู่ เชื้อจะทำให้เกิดการอักเสบของลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ ระยะฟักตัวประมาณ 8-48 ชั่วโมง ผู้ป่วยมีอาการหนาวสั่น คลื่นไส้ อูจจาระร่วง ในรายที่เป็นโรคไม่รุนแรงจะหายได้เองภายใน 2-4 วัน แต่จะตรวจพบเชื้อได้ในอุจจาระนานถึง 3-4 สัปดาห์ หรือบางรายนานเป็นเดือน ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบบ่อยมากที่สุด

3. Septicemia หมายถึงการติดเชื้อในกระแสเลือดและอวัยวะอื่น ๆ ที่ไม่เกี่ยวกับท้อง มักมีอาการไข้ หนาวสั่น อ่อนเพลีย

โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดขึ้นจากเชื้อ *Salmonellae* นอกจากจะเกิดขึ้นเนื่องจากการรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนโดยตรงแล้วยังสามารถติดต่อผ่านพาหะของโรคโดยมีแมลงวัน แมลงสาบ หนู นกกระจอก นกพิราบ เป็นพาหะ จึงเป็นสาเหตุทำให้เกิดการระบาดของโรคได้อย่างกว้างขวาง

8.5 *Bacillus cereus*

เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม aerobic endospore forming gram positive rod ส่วนมากเซลล์มีขนาดใหญ่ $0.3-2.2 \times 1.2-7 \mu\text{m}$ มีรูปร่างเป็นแท่งตรง เรียงตัวต่อกันเป็นสายยาวหรืออยู่เดี่ยว ๆ มีสปอร์เป็นรูปไข่หรือรูปทรงกระบอก เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C จะเจริญได้ที่ $10-49^{\circ}\text{C}$ พบทั่วไปในดิน อากาศ น้ำและอาหารชนิดต่าง ๆ รวมทั้งอาหารดิบและอาหารที่ผ่านกระบวนการแล้ว สามารถทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษซึ่งแบ่งตามลักษณะอาการของโรคได้ 2 ลักษณะคือ เกิดอาการท้องเสีย (diarrheal type) สร้างสารพิษที่เรียกว่า diarrheagenic toxin ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้ ปวดท้อง ท้องเสีย จะปรากฏอาการหลังจากรับประทานอาหารไปแล้ว 8 ถึง 16 ชั่วโมง หรือมีอาการอาเจียน (emetic หรือ vomiting type) แบคทีเรียจะสร้างสารพิษที่เรียกว่า emetic toxin ผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ระยะฟักตัว 2-6 ชั่วโมง (Buckle *et al.*, 1989)

8.6 *Saccharomyces cerevisiae*

เป็นจุลินทรีย์พวกยีสต์ มีรูปร่างได้ทั้งแบบกลม รูปไข่หรือวงรี มีขนาดเซลล์โดยเฉลี่ยกว้าง $2.5-10.0 \mu\text{m}$ ยาว $4.5-21.0 \mu\text{m}$ โคโลนีสีครีม มีการสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ส่วนใหญ่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ เจริญเติบโตได้โดยไม่ต้องอาศัยออกซิเจน ซึ่งเรียกว่า สภาวะการหมัก (fermentation) ซึ่งสามารถหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ได้ และเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งเรียกว่า สภาวะการหายใจ (respiration) โดยน้ำตาลจะถูกย่อยสลายได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตได้ดีที่ 28°C (optimum temperature) สปอร์ของยีสต์ไม่ทนต่อความร้อนอุณหภูมิเพียง 70°C ก็สามารถทำลายสปอร์ของยีสต์ได้ 40°C เป็นจุดที่มีความสำคัญในด้านอุตสาหกรรมการหมักเบียร์ ไวน์หรือเครื่องดื่ม

อัลกอฮอล์อื่น ๆ บางครั้งพบว่าสามารถทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารได้ อาหารที่เกิดการเสียจากยีสต์มักมีกลิ่นหมัก มีเมือกและมักเกิดขึ้นบริเวณผิวหน้า สำหรับเครื่องดื่มจะขุ่นและมีฟองก๊าซเกิดขึ้น ยีสต์มีคุณสมบัติพิเศษคือ สามารถใช้เอนไซม์ย่อยกรดอินทรีย์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการถนอมอาหาร เช่น กรดแลคติก กรดซิตริก และกรดอะซิติกได้ เมื่อยีสต์ใช้กรดต่าง ๆ ดังกล่าวแล้ว กรดจะมีความเข้มข้นลดลง เป็นผลให้อาหารนั้นมีสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหารได้ (ปรียา, 2543)

8.7 *Aspergillus flavus*

เป็นเชื้อราที่มักปนเปื้อนในเมล็ดธัญพืช เช่น ถั่วลิสง ข้าวโพด ในภาวะที่เหมาะสมจะสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน (aflatoxins) เจริญได้รวดเร็วภายใน 1 สัปดาห์ โคลิโคนแบนราบ เนื้อเป็นนูนกุ่มหยาบ เมื่อเริ่มงอกจะเป็นสีขาว พอแก่ขึ้นเปลี่ยนเป็นสีเขียวแกมเหลือง มีรอยย่นเป็นแนวออกจากศูนย์กลางโคโลนี เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบ scleroia สีน้ำตาลปนแดงขนาด 400-700 μm กระเปาะรูปกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10-65 ไมครอน มีติ่งหุ้มอยู่โดยรอบ กระเปาะชั้นเดียวหรือ 2 ชั้น ตีงชั้นแรกขนาดยาวประมาณ 10 μm ตีงชั้นที่ 2 ขนาดยาวประมาณ 5 μm สปอร์รูปกลมผนังหยาบหรือเป็นหนาม เส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 μm ต่อกันเป็นสาย (เสาวรศ, 2528)

ในธรรมชาติมีเชื้อราหลายชนิดที่สามารถขึ้นในอาหารได้ถ้ามีสภาวะที่เหมาะสม ในขณะที่เจริญในอาหารจะสร้างสารพิษขึ้นมาและทิ้งไว้ในอาหาร สารพิษบางชนิดสามารถทนความร้อนสูง ๆ ได้ และเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็ง

อะฟลาท็อกซินที่สร้างขึ้นในกลุ่มของเชื้อราแอสเปอร์จิลลัสเป็นสารทนความร้อน การใช้ความร้อนไม่สามารถทำลายอะฟลาท็อกซินได้ ไม่ว่าจะเป็นการต้ม การคั่ว การทอด การนึ่ง เนื่องจากสารอะฟลาท็อกซินสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 250-260°C (ปรียา, 2543) อะฟลาท็อกซินที่สำคัญและมีฤทธิ์เป็นสารก่อมะเร็งได้แก่ อะฟลาท็อกซินบีหนึ่ง (AFB₁) อะฟลาท็อกซินบีสอง (AFB₂) อะฟลาท็อกซินจีหนึ่ง (AFG₁) และอะฟลาท็อกซินจีสอง (AFG₂) ทั้งหมดเป็นสารก่อมะเร็งในตับ โดยเฉพาะอะฟลาท็อกซินบีหนึ่งมีความเป็นพิษรุนแรงและสูงสุดในการก่อให้เกิดโรคมะเร็งแม้ได้รับในปริมาณที่ต่ำ (Buckle *et al.*, 1989) ในอาหารหลายชนิด เช่น ถั่วลิสง ข้าวโพด พริกป่น กระเทียม หัวหอมและถั่วต่าง ๆ ที่มีการจัดเก็บไม่ดี เช่น เก็บในที่ที่มีความชื้นสูง สามารถพบสารอะฟลาท็อกซินได้ ดังนั้นการเก็บรักษาควรทำให้แห้งและเก็บในภาชนะที่มิดชิดจะสามารถป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อราได้

9. การศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้งจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียและการทำให้บริสุทธิ์

Larsen *et al.* (1993) ได้ศึกษาลักษณะและการทำให้บริสุทธิ์ของ bavaricin A ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus bavaricus* M1401 ที่ยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ได้น่า

สารยับยั้งมาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulphate, ion exchange, hydrophobic interaction และ reverse-phase chromatography จากนั้นนำมาทำ SDS-PAGE ได้ bavaricin A ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 3.5-4.0 kDa สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต bavaricin A คืออุณหภูมิ 4-30°C และลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ส่วนไนโตรเจน 100 PPM. ไม่มีผลต่อการสร้าง bavaricin A

Samelis *et al.* (1994) แยก *Lactobacillus sake* จากไส้กรอกหมักแห้งของกรีก (Greek dry fermented sausage) และนำมาเลี้ยงใน MRS broth พบว่าสามารถผลิตสารยับยั้งได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และ sakecin B ซึ่ง sakecin B สร้างขึ้นในช่วง late log phase เสถียรที่ pH 2-9 ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 20 นาที นำมาทำให้บริสุทธิ์โดย SDS-PAGE ได้น้ำหนักโมเลกุล 6.3 kDa

Tahara *et al.* (1996) ได้ศึกษา acidocin J 1132 ที่ผลิตจาก *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132 โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS พบว่า acidocin J 1132 มีมากที่สุดเมื่ออาหารมี pH 5.0 ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate, sequential cation exchange และ reverse-phase chromatography การทำงานของ acidocin J 1132 เกิดจาก 2 components คือ α และ β ซึ่งมีผลต่อระบบ ATP-driven transport system ของเชื้อทดสอบโดยทำให้เกิดรูรั่วที่เยื่อหุ้มเซลล์

Bennik *et al.* (1999) ได้ศึกษา bacteriocin ที่แยกได้จาก *Pediococcus parvulus* และ *Enterococcus mundtii* ซึ่งแยกได้จากผักพร้อมบริโภคที่ผ่านการแปรรูปบางส่วน (minimally processed) แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการควบคุมการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในการเก็บรักษาดังอกในสภาพบรรยากาศดัดแปลง (modified atmosphere:MA) ที่เก็บในตู้เย็น พบว่ามีเพียง *E. mundtii* ที่สามารถสร้าง bacteriocin ได้ที่ 4-8°C ในสภาพบรรยากาศที่ประกอบด้วย O₂ 15%, CO₂ 20% และ N₂ 78.5% ที่ 8°C พบว่า *L. monocytogenes* ถูกยับยั้งโดย bacteriocin ของ *E. mundtii* ซึ่ง bacteriocin นี้คือ Mundticin ซึ่งต่อมาพบว่าสามารถใช้เป็น biopreservative สำหรับการเก็บถั่วถั่วงอกแบบ MA ได้

Lee *et al.* (1999) แยกและคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากกิมจิ (kimchi) พบว่า *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* H-559 สามารถผลิตสารยับยั้งที่แสดงการยับยั้งแลคติกแอซิดแบคทีเรียด้วยกัน เช่น *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. hilgaridi*, *Leuconostoc lactis* และยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* โดยวิธีเจาะหลุม (well-diffusion assay) สารยับยั้งที่เชื้อผลิตขึ้นมีความเสถียรที่ pH 2.0-11.0 และทนความร้อนได้ 100°C นานกว่า 10 นาที นำไปทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยการตกตะกอนด้วย 75% แอมโมเนียมซัลเฟต ไคอะไลซีสด้วย 10 mM phosphate buffer pH 6.0, lyophilized, ion-exchange chromatography และ reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) นำไปหา

มวลโมเลกุลด้วย SDS-PAGE มีน้ำหนักโมเลกุล 2,500 Da และยืนยันมวลโมเลกุลด้วยวิธี MALDI-mass spectrometry มีน้ำหนักโมเลกุล 3,343.7 Da แบคทีเรียโอซินที่ศึกษาในครั้งนี้มีมวลโมเลกุลและสายพันธุ์ของเชื้อที่สร้างใกล้เคียงกับแบคทีเรียโอซินชนิดโนซิน (Nisin) แต่แตกต่างกันที่ส่วนประกอบและการเรียงลำดับของกรดอะมิโน (Amino acid sequence) และการเสถียรต่อ pH

Ohmomo *et al.* (1999) ได้แยกและคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (Thermophilic Lactic Acid Bacteria) จากหญ้าหมัก ผักคอง เก็บตัวอย่างจากจังหวัดขอนแก่น กรุงเทพฯ และเชียงใหม่ พบว่ามีจำนวน แลคติกแอซิดแบคทีเรีย 50 สายพันธุ์ที่ให้ผลยับยั้งเชื้อทดสอบโดยวิธี Spot-on-lawn method ยืนยันผลการยับยั้งด้วยวิธี Paper disc method พบว่ามีเพียง 1 สายพันธุ์คือ K-4 ที่แยกได้จากหญ้าหมัก ให้ผลยับยั้งต่อ *Enterococcus faecium* และ *Ec. faecalis* ทั้ง 2 วิธี แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Escherichai* และ *Klebsiella* ได้ จัดจำแนกเชื้อ K-4 ได้เป็น *Enterococcus* sp. K-4 ผลิตสารยับยั้ง (BLA) ได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth ในชั่วโมงที่ 20 ที่ 42°-45°C และผลิตได้เป็น 2 เท่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°-38°C เมื่อนำไปศึกษาถึงคุณสมบัติของสารยับยั้งสามารถทนความร้อน 100°C 20 นาที เสถียรที่ pH 5.0-7.0 ถูกทำลายได้ด้วยทริปซิน (Trypsin) การทำให้สารยับยั้ง (BLA) บริสุทธิ์มากขึ้นโดยวิธี ultra-filtration, ตกตะกอนโปรตีนด้วย 75% ammonium sulfate, dialysis, freeze-drying ion exchange chromatography และนำไปหามวลโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE มีมวลโมเลกุลประมาณ 20,000 based ซึ่งสารยับยั้ง (BLA) น่าจะเป็นแบคทีเรียโอซินที่ให้ผลการยับยั้งต่อ *Ec. faecium* และ *Ec. faecalis* เพียงสายพันธุ์เดียว

Swetwathana *et al.* (1999) ได้ศึกษาการสร้างแบคทีเรียโอซินจากเชื้อแลคติกแอซิดที่แยกได้จากหมักจำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pediococcus* spp. 5 สายพันธุ์ (TISTR 417, 419, 530, 536, 537) และ *Lactobacillus* spp. 4 สายพันธุ์ (TISTR 539, 540, 541, 543) วิธีที่ใช้ทดสอบคือ agar spot method โดยใช้อาหาร BSM (bacteriocin-screening medium ซึ่งดัดแปลงมาจากอาหาร MRS) ภายใต้สภาวะที่มีการกำจัดผลของกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยเปรียบเทียบผลการยับยั้งเชื้อทดสอบกับแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซิน Sakacin A คือ *L. sakei* LTH 2342 เป็น positive control และ *L. sakei* (LAD) ซึ่งไม่สร้างแบคทีเรียโอซิน เป็น negative control พบว่า *Pediococcus* spp. (TISTR 419, 530, 536) สร้างสารประกอบที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *P. acidilactici*, *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. innocua*, *I. faecalis* ส่วน *Lactobacillus* spp. (TISTR 543) สร้างสารประกอบที่ยับยั้ง *P. pentosaceus* และ *P. acidilactici* แต่ทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ เมื่อนำ *Pediococcus* spp. (TISTR 419, 530, 536) ไปทดสอบการถูกทำลายคุณสมบัติของโปรตีนโดยใช้เอนไซม์โปรติเอส (Trypsin) พบว่าสารประกอบ

ที่เชื้อสร้างขึ้นถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์โปรติเอสได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งสารประกอบนี้มีลักษณะเป็นแบคทีเรียโอซิน

จารุวรรณ (2539) ได้คัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เจริญที่ 45°C ที่ยับยั้งการเจริญของ *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella enteritidis* โดยวิธีการกระจายกรอง พบว่าเชื้อไอโซเลทที่ 3 ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกอีสานให้ผลการยับยั้งต่อการเจริญของเชื้อ *B. cereus*, *E. coli* และ *S. enteritidis* ได้ดีที่สุด ส่วนไอโซเลทที่ 27 ซึ่งแยกได้จากแฮมสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด

อัจฉรา (2541) ได้คัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เจริญที่ 45°C ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* และ *Vibrio parahaemolyticus* โดยการทดสอบด้วย well diffusion method พบว่าไอโซเลท A7 สามารถยับยั้ง *B. cereus*, *S. aureus* และ *V. parahaemolyticus* ส่วนไอโซเลท A15/1 สามารถยับยั้ง *B. cereus*, *S. aureus* และ *S. enteritidis* ได้ การทดสอบด้วย cup diffusion method พบว่าไอโซเลท A7 ยับยั้ง *S. aureus* และ *S. enteritidis* ส่วนไอโซเลท A94/2 ยับยั้ง *B. cereus* และ *S. aureus* ได้ เมื่อนำ supernatant ของไอโซเลท A7 มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและให้ความร้อนที่ 100°C เป็นเวลา 10 นาที ยังสามารถยับยั้ง *B. cereus* และ *S. aureus* ได้

ชลัท (2542) ได้คัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตสารยับยั้งจากนํ้านมโคดิบในประเทศไทยด้วยวิธี Direct plating พบแบคทีเรีย 45 ไอโซเลทที่มีความเสถียรของการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ ในจำนวนนี้มีสายพันธุ์ NSC 1 สามารถผลิตสารนี้ในอาหารเหลว MRS ยับยั้ง *Lactobacillus curvatus* AYCC 25601 เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C จัดจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น *Lactococcus lactis* subs. *lactis* สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้เป็นแบคทีเรียโอซินเนื่องจากย่อยได้ด้วยเอนไซม์โปรติเอส เค แบคทีเรียโอซินนี้มีความเสถียรที่ pH ตั้งแต่ 2.0-9.0 ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 15 นาที โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงการออกฤทธิ์ แต่เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C หรือ 121°C เป็นเวลา 30 และ 20 นาที การออกฤทธิ์จะลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียโอซินนี้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค แบคทีเรียทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* และแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน เมื่อทำการเพิ่มขยายดี เอ็น เอ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าสายพันธุ์ NSC 1 นี้มียีนโครงสร้างของการผลิตไนซีแซค (nis. Z)