

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียโพรไบโอติก

แบคทีเรียโพรไบโอติก (Probiotic) หมายถึงแบคทีเรียที่ดีมีประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดสารพิษ หรือสร้างสารพิษต่อร่างกาย สามารถเกาะกับผนังลำไส้ และทนอยู่ในกระเพาะอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทำให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์หรือสัตว์ ส่งผลให้เกิดการต้านทานของจุลินทรีย์ก่อโรครภายในลำไส้ แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกได้แก่แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้ หรืออาจเรียกว่าแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น เชื้อ *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis*, *S. thermophilus* และ *Bifidobacterium bifidum* ซึ่งแบคทีเรียดีมีประโยชน์เหล่านี้จะอาศัยอยู่ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ตั้งแต่เป็นทารก ทำหน้าที่ในการช่วยย่อยอาหาร และผลิตสารที่ดีมีประโยชน์ ซึ่งได้แก่ กรดอะมิโน กรดแลคติก พลังงาน วิตามินเค วิตามินบี และสารปฏิชีวนะธรรมชาติหลายชนิด (ธารารัตน์ สุภศิริ, 2542) ในปี ค.ศ. 1990 คำว่าโพรไบโอติก ถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรกในรายงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของ Lilly และ Stillwell (1965) ได้กล่าวถึงสารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งขับออกมาและช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่ตรงข้ามกับการทำงานของยาปฏิชีวนะที่จะทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด และในปี ค.ศ. 1989 Fuller ได้ให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกว่าเป็นอาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต สามารถปรับสมดุลจุลินทรีย์ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่

2.1.1 คุณสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติก

2.1.1.1 การปรับตัวต่อสถานะเครียดของแบคทีเรียโพรไบโอติก

แบคทีเรียที่สามารถปรับตัวต่อสถานะเครียดได้เกิดจากแบคทีเรียสามารถต้านทานต่อสถานะเครียดที่เป็นชนิดเดียวกัน (homologous) หรือต่างชนิดกัน (heterologous) ทำให้แบคทีเรียสามารถรอดชีวิตในสถานะเป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ เช่น เมื่อให้ความร้อนที่พอเหมาะกับแบคทีเรียอย่างฉับพลันพบว่าเซลล์ของแบคทีเรียจะเกิดการตอบสนองให้ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูงได้มากขึ้น (Bunning และคณะ, 1990)

2.1.1.2 การทนต่อกรด

เมื่อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้อาหารเน่าเสียเผชิญกับสภาพที่มีกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ในอาหารหรือในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ จะเกิดการตอบสนองต่อการทนกรด

(Acid Tolerance Response, ATR) ในหลายทาง ได้แก่การเปลี่ยนส่วนประกอบภายในเซลล์ โดยการเพิ่ม การไหลออกของโปรตอน การเพิ่มการสลายกรดอะมิโน และการเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเอนไซม์ที่มี หน้าที่ซ่อมแซม DNA จากการศึกษาในแบคทีเรียส่วนใหญ่พบว่า การตอบสนองการทนต่อกรดจะดี ยิ่งขึ้นเมื่อมีสภาวะเป็นกรดที่เหมาะสม ซึ่งจะชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนที่ส่งเสริมให้แบคทีเรียมี ชีวิตรอดในสภาวะเป็นกรดมากๆได้ การตอบสนองการทนต่อกรดของเซลล์จะแตกต่างกันในระยะ exponential และระยะ stationary phase โดยการตอบสนองนี้จะแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ของ แบคทีเรีย (Yousef และ Courtney, 2003)

แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในกระเพาะอาหารจะต้องมีความสามารถในการทนต่อกรด โดยกรดไฮโดรคลอริกที่ถูกขับออกมาจากกระเพาะอาหารจะมีค่าพีเอชเท่ากับ 0.9 แต่เมื่อมีอาหารใน กระเพาะผสมรวมกับกรดภายในกระเพาะอาหารจะทำให้ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 3.0 (Ekkila และ Petaja, 2000)

2.1.1.3 การทนต่อน้ำดี

หลังจากอาหารเข้าสู่ร่างกายในกระเพาะอาหาร 2-4 ชั่วโมง ที่บริเวณส่วนต้นของ ลำไส้เล็กจะถูกกระตุ้นให้หลั่งน้ำดี และจะหลั่งออกมาสู่ลำไส้เล็กมากขึ้นหลังจากมีการดูดซึมไขมันและ แป้ง ซึ่งน้ำดีในส่วนนี้มีหน้าที่เป็นสารทำความสะอาดโดยจะทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ น้ำดีจึง เป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ อย่างไรก็ตามมีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถลดผลกระทบจาก น้ำดีได้ โดยการผลิตด้วย เอนไซม์ bile salt hydrolase (BSH) ที่สามารถ ไฮโดรไลซ์เกลือน้ำดีจึงทำให้ ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำดีลดลง (Ekkila และ Petaja, 2000) ทำให้แบคทีเรียสามารถทนต่อฤทธิ์ ของเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหารได้ กิจกรรม BSH พบได้ในแบคทีเรียกรดแลคติกหลายสายพันธุ์ เช่น *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* และ *Propionibacterium* เป็นต้น (Gilland และ Speck, 1977) โดยพบว่าจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถทนต่อสภาวะภายในระบบ ทางเดินอาหารในขณะที่มีการย่อยอาหารที่ชั่วโมงแรกจะมีความเข้มข้นของน้ำดีร้อยละ 1.5-2.0 น้ำหนัก ต่อปริมาตร และหลังจากนั้นระดับความเข้มข้นจะลดจนถึงร้อยละ 0.3 น้ำหนักต่อปริมาตร (Davenport, 1977) ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของน้ำดีในระบบทางเดินอาหารจะแตกต่างกัน แต่ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ น้ำดีในลำไส้ที่ใช้สำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติก เชื่อว่ามีความเข้มข้นอยู่ที่ร้อยละ 0.3 น้ำหนักต่อปริมาตร (Gilland และคณะ, 1984)

2.1.1.4. การทนต่อเกลือ

ในบางครั้งแบคทีเรียต้องเผชิญกับสภาพที่มีความดันออสโมติกสูง เช่น ในอาหารที่มี เกลือหรือน้ำตาลความเข้มข้นสูงหรือในเซลล์ที่ถูกทำให้แห้ง ภายใต้สภาวะดังกล่าวโดยธรรมชาติของ เซลล์จะรักษาสภาพภายในเซลล์ให้สามารถทนต่อความดันออสโมติกและการเกิดปฏิกิริยา hydration ในสภาพที่มีความดันออสโมติกสูง เซลล์ของแบคทีเรียจะมีกลไกการตอบสนองต่อความดันออสโมติก

โดยการสะสมตัวถูกละลายที่มีขั้วภายในเซลล์หลายชนิดรวมกัน (Compatible solute) ซึ่งได้แก่ ไกลซีน บีเทน (Glycine betaine) โพรลีน (proline) แอคโนอิน (ectoine) คาร์นิทีน (carnitine) และทรีฮาโลส (trehalose) ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียสามารถต้านแรงดันออสโมติกที่เกิดขึ้น (Bremer และ Krämer, 2000)

2.1.2 ประโยชน์ของแบคทีเรียโพรไบโอติก

แบคทีเรียโพรไบโอติกมีหน้าที่และประโยชน์ต่อร่างกายดังนี้

1. กรดแลคติกที่แบคทีเรียโพรไบโอติกผลิตออกมาจะทำให้สภาวะภายในลำไส้มีความเป็นกรดมากพอที่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค
2. ทำให้ระบบขับถ่ายดีไม่เกิดการสะสมของเสียในร่างกายเป็นการลดอัตราเสี่ยงของการเกิดมะเร็งโดยเฉพาะอย่างยิ่งมะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งตับ
3. วิตามินบีที่ได้อาจทำให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและยังทำให้มีการผลิตเม็ดเลือดแดงดีขึ้นด้วย
4. ช่วยยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและกำจัดสารก่อมะเร็งบางชนิด
5. ลดระดับน้ำตาลและโคเลสเตอรอลในเลือด
6. ผลิตเอนไซม์แลคเตส ซึ่งช่วยย่อยน้ำตาลในนมทำให้ไม่มีอาการท้องอืดจากการดื่มนม และช่วยการดูดแคลเซียมให้ดีขึ้น (ธารารัตน์ ศุภศิริ, 2542)

2.1.3 การคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติก

การคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกความสามารถในการอยู่รอดได้ดีและกิจกรรมของแบคทีเรียโพรไบโอติกเป็นสิ่งที่ต้องพิจารณาถึงก่อนนำโพรไบโอติกมาใช้เพื่อให้โพรไบโอติกที่ทำงานได้อย่างเหมาะสม ได้มีรายงานผลการศึกษาพบว่าโพรไบโอติกที่ไม่มีชีวิตสามารถส่งผลที่เป็นประโยชน์ซึ่งได้แก่ ช่วยควบคุมระบบภูมิคุ้มกันและช่วยให้มีการจับของสารก่อมะเร็งในร่างกาย ดังนั้นในกรณีของเชื้อโพรไบโอติกบางสายพันธุ์นั้นอาจเพียงพอที่จะเจริญได้เป็นอย่างดีในระหว่างขั้นตอนแรกของการผลิต (เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ในปริมาณมากพอในผลิตภัณฑ์) แต่เชื้อโพรไบโอติกไม่จำเป็นต้องอยู่รอดได้ดีในระหว่างเก็บรักษา ซึ่งการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะต้องพิจารณาถึงลักษณะต่างๆ ดังนี้

1. การทนต่อกรดและความสามารถในการทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหารของมนุษย์
2. การทนต่อน้ำดีซึ่งสำคัญต่อการอยู่รอดในลำไส้เล็ก
3. ความสามารถในการยึดติดกับผนังของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์
4. การกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคแต่ไม่ส่งผลให้เกิดการอักเสบ
5. ต่อด้านจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคได้แก่ *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp.,

L. monocytogenes และ *Clostridium difficile*

ในการคัดเลือกกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างกรด เป็นหนึ่งในลักษณะที่มีความสำคัญมากที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกจะต้องคำนึงถึงหลักการที่เกี่ยวข้องกับการส่งผลทำให้มนุษย์มีสุขภาพที่ดีขึ้น ในขณะที่สภาพแวดล้อมภายในระบบทางเดินอาหารและในอาหารอาจค่อนข้างแตกต่างกันมาก ซึ่งบ่อยครั้งพบว่าโพรไบโอติกไม่เหมาะที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับอาหารหมัก (Oberman และ Libudzisz. 1998 ; German และคณะ. 1999) ซึ่งอัตราการเจริญของเชื้ออาจช้าและอาจส่งผลให้เกิดรสชาติและกลิ่นผิดปกติ (off-flavours) (Svensson. 1999) การปรับปรุงอาหารเพื่อให้มีความเหมาะสมสำหรับเป็นสับสเตรทของโพรไบโอติกอาจเติมแหล่งพลังงาน (ตัวอย่างเช่น กลูโคส) ปัจจัยที่ทำให้เชื้อเจริญเติบโตซึ่งได้แก่ ยีสต์สกัด และไฮโดรไลซ์โปรตีน หรือสารต้านออกซิเดชัน กลีโกลิแอ หรือ ไวตามิน เพิ่มลงในอาหาร (Kurmann. 1988 ; Ishibashi และ Shimamura. 1993 ; Dave และ Shah. 1998 ; Gomes และคณะ. 1998) ซึ่งข้อควรพิจารณาหลายประการในการคัดเลือกโพรไบโอติกมีดังนี้

1. คุณสมบัติที่ดีทางประสาทสัมผัส
2. การต่อต้านฟาจ (phage)
3. ความสามารถในการอยู่รอดได้ในระหว่างกระบวนการแปรรูป
4. ความคงตัวในผลิตภัณฑ์และในระหว่างการเก็บรักษา

ปัจจุบันผู้นำในทางด้านการผลิตกล้าเชื้อส่วนใหญ่ใช้แบคทีเรียกรดแลคติกร่วมกับ bifidobacteria มาใช้ผลิตกล้าเชื้อเพื่อการค้า (Mogensen และ Friis. 1979) เชื้อโพรไบโอติกทางการค้าที่หาได้อาจประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียวหรือเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดผสมกัน โดยส่วนใหญ่คุณสมบัติของโพรไบโอติกได้รับผลกระทบในระหว่างขั้นตอนต่างๆ ของการผลิต (German และคณะ. 1999) ดังนั้นผู้ผลิตควรทราบข้อมูลเฉพาะด้านคุณสมบัติของจุลินทรีย์สายพันธุ์นั้นๆ เพื่อนำมาใช้ในการปรับกระบวนการให้เหมาะสม เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกอาจจะผสมในสูตรอาหารพิเศษที่มีลักษณะเป็นแคปซูลหรือเม็ดหรืออาจถูกนำมาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมักมากมายหลายประเภท ในบางกรณีอาจนำเชื้อโพรไบโอติกมาเติมลงในอาหารเพื่อช่วยให้อาหารมีคุณสมบัติของโพรไบโอติกหรือมีการทำหน้าที่ของโพรไบโอติกได้อย่างเหมาะสม ซึ่งการที่แบคทีเรียกรดแลคติกมีประโยชน์มากจึงได้รับความสนใจมากในการนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาผลิตเป็นกล้าเชื้อ probiotic lactic acid bacteria ที่มีความคงทน ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ที่มีชีวิตและไม่บาดเจ็บจำนวนมาก ในสมัยก่อนที่จะมีการใช้กล้าเชื้อการเก็บรักษาเชื้อในรูปของของเหลวและในรูปแช่แข็งกันมาก แต่การเตรียมเชื้อในรูปของกล้าเชื้อผงที่ผ่านการแช่แข็งแห้ง (freeze-dried) และสเปรย์คราย (spray-dried) จะช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายได้อย่างมาก (Champagne และคณะ. 1991 ; Gölker. 1993) ถึงแม้ว่าการผลิตในรูปสเปรย์ครายจะประหยัดกว่าการแช่แข็งแห้งโดยเฉพาะเมื่อผลิตเป็นจำนวนมาก (Gölker. 1993 ; Johnson และ Etzel. 1993) แต่แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนมากไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิที่ค่อนข้างจะสูงที่ใช้ในระหว่างการทำสเปรย์ครายได้ (Porubcan และ Sellars. 1979) ด้วยเหตุนี้การแช่แข็งแห้งจึงเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด

แม้ว่าการแช่แข็งแห้งเป็นอันตรายกับเชื้อน้อยกว่าการสเปรย์คราย (Porubcan และ Sellars, 1979) แต่อาจเพิ่มการป้องกันเซลล์ได้โดยเติมสารที่ช่วยป้องกันเซลล์ (protectants) จากการบาดเจ็บในระหว่างที่เซลล์ถูกทำให้แห้งและการเก็บรักษา (Champagne และคณะ, 1991 ; Souzu, 1992) สารป้องกันที่ถูกนำมาใช้ได้แก่ แลคโตส ซูโครส โมโนโซเดียมกลูตาเมต (monosodium glutamate, MSG) และ แอสคอร์เบต (ascorbate) ในนมหรือน้ำ (Mäyrä-Mäkinen และ Bigret, 1998)

ถ้าเชื้อโพรไบโอติกทางการค้าส่วนมากจะเตรียมในรูปที่มีความเข้มข้นสูงและส่วนใหญ่ผลิตขึ้นเพื่อนำมาใช้ได้โดยตรง (direct vat set, DVS) (Honer, 1995) การใช้เชื้อที่มีความเข้มข้นสูง (highly concentrated DVS cultures) เป็นวิธีที่นิยมมากเนื่องจากสะดวกกว่าการเลี้ยงเชื้อเองซึ่งจะทำให้ค่อนข้างยาก นอกจากนี้เชื้อ DVS culture มีทั้งในรูปเชื้อเข้มข้นที่ผ่านการแช่แข็งหรือในรูปแช่แข็งแห้งโดยทั่วไปแล้วเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (deep-frozen) จะมีจำนวนเซลล์มากกว่า 10^{10} โคโลนีต่อกรัม ขณะที่เชื้อที่อยู่ในรูปแช่แข็งแห้งมีจำนวนเชื้อมากกว่า 10^{11} โคโลนีต่อกรัม (Oberman และ Libudzisz, 1998) ซึ่งความเข้มข้นของเซลล์ต่อกรัมของผลิตภัณฑ์จะแปรผันขึ้นกับเชื้อจุลินทรีย์และชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้

2.2 วิธีการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกมีประวัติมานานนับศตวรรษและเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่พบในธรรมชาติ แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถพบในนมและทำให้นมเปรี้ยวแต่ก็ยังสามารถพบแบคทีเรียชนิดนี้ในแหล่งอื่นๆ อีกมากมาย โดยพบว่าย้อมติดแกรมบวก ไม่มีสปอร์ และเจริญได้ดีในสภาวะไร้อากาศ การศึกษาลักษณะและการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทำได้ดังนี้ (Orla-Jensen, 1919)

2.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

การจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทำได้โดยศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ ได้แก่ รูปร่างกลมหรือแท่ง ต่อมาได้มีผู้ค้นพบแบคทีเรียกลุ่มนี้และได้จัดจำแนกเชื้อรูปร่างแท่งไว้หลายสกุล ได้แก่ *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* และ *Carnobacterium* เชื้อรูปร่างกลมซึ่งแบ่งเซลล์ 2 ระบายเป็นสี่เซลล์ ได้แก่ *Aerococcus*, *Pediococcus* และ *Tetragenococcus* และเชื้อรูปร่างกลมเรียงตัวเป็นคู่หรือสายโซ่ ได้แก่ *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* และ *Leuconostoc* ปัจจุบันมีการเสนอสกุลใหม่เพิ่มเติมจากเดิม ได้แก่ *Weissella*, *Alloliococcus*, *Atopobium*, *Oenococcus*, *Lactosphaera* และ *Paralactobacillus* (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

2.2.2 การศึกษารูปแบบการหมักสารประเภทคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate fermentation)

การศึกษารูปแบบการหมักสารประเภทคาร์โบไฮเดรต เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้จำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตแตกต่างกันมาก ดังนั้นจึง

เป็นวิธีที่ใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียได้เป็นสายพันธุ์ต่างๆ โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในอาหารที่ใส่ธาตุอาหารบางอย่างลงไปแล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น การเกิดกรด การเกิดแก๊ส การเกิดสารบางชนิด เป็นต้น (Bridge และ Sneath. 1982)

2.2.3 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียโพรไบโอติกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA เป็นวิธีที่ใช้เครื่องมือในการติดตามความสัมพันธ์ของสายพันธุ์แบคทีเรียและจำแนกชนิดของแบคทีเรียจากแหล่งกำเนิดที่หลากหลาย ได้แก่ จากสภาพแวดล้อม หรือโรงพยาบาล เช่น ในตัวอย่าง เลือด หรือ ปัสสาวะ การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ปัจจุบันได้ถูกนำมาใช้ในห้องทดลองเพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติหรือแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ยากต่างจากแบคทีเรียทั่วไป นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกแบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงกันได้โดยใช้วิธีที่มีระเบียบแบบแผน การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA พื้นฐานได้รับความสนใจเนื่องจากไรโบโซม SSU ที่มีอยู่ทั่วไปในแบคทีเรียและเป็นบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงจำเพาะของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ โดยลักษณะของบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงจำเพาะนี้ทำให้สามารถจำแนกชนิดหรือในระดับสายพันธุ์ของแบคทีเรียโดยการเปรียบเทียบข้อมูลจาก public domain (Vandamme และคณะ. 1996)

อย่างไรก็ตามการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีนี้ในบางกรณีอาจไม่ได้ผลเนื่องจากการจำแนกในระดับสายพันธุ์พบว่ามีส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกันทุกประการทำให้ไม่สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ ซึ่งได้แก่เชื้อ *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* และ *Streptococcus pneumoniae* นอกจากนี้ลักษณะที่ดีของลำดับนิวคลีโอไทด์ควรได้รับการตรวจทานและแก้ไขให้ถูกต้อง เช่น การตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์โดยโครมาโตแกรม (chromatogram) ในจุดสูงสุดที่เกิดการซ้อนทับกันทำให้ได้หลายลำดับนิวคลีโอไทด์ส่งผลให้ฐานข้อมูลที่ได้มาไม่ถูกต้อง และพบว่าถ้าเกิดความไม่แน่ชัดของตำแหน่งมากกว่าร้อยละ 1 จะทำให้เกิดความขัดแย้งกันในการตีความหมายลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการซ้อนทับกันของโครมาโตแกรมนี้อาจเกิดจากการปนกันของเชื้อทำให้องค์ประกอบโมเลกุลของเชื้อที่ได้ไม่ถูกต้องและทำให้ข้อมูลของตะกอนโมเลกุลที่ได้ผิดพลาดส่งผลให้ไม่พบสายพันธุ์ของแบคทีเรียจากฐานข้อมูล ด้วยเหตุนี้การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อก่อนทำการวิเคราะห์จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย (Mignard และ Flandrois. 2006) วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA นี้มีการใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบันเพราะช่วยเพิ่มปริมาณ DNA ที่มีอยู่อย่างจำกัดให้มีปริมาณมากขึ้นรวมถึงสารพันธุกรรมชนิดอื่นๆ ด้วย และได้มีการดัดแปลงพัฒนาวิธีการ พีซีอาร์ (PCR) ให้มีความหลากหลายและใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสมยิ่งขึ้น เช่น การใช้ enzyme reverse transcription เพื่อเปลี่ยน RNA ให้เป็น DNA ก่อนแล้วจึงเข้าสู่ขั้นตอนพีซีอาร์

2.2.3.1 ปฏิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase chain reaction, PCR)

ปฏิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase chain reaction) หรือพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกับดีเอ็นเออื่น โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน สามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจได้โดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปโคลน การทำพีซีอาร์คือการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์สซ้ำกันหลายๆรอบ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้จำเป็นต้องมีไพรเมอร์ด้วย ดังนั้นจึงใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่มีคู่เบสคู่สมกับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายและมีปลาย 3' ในทิศทางเข้าหากัน (รูปที่ 2.1) ดังนั้นข้อกำหนดในการทำพีซีอาร์คือต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจทราบลำดับเบสทั้งหมดหรือเฉพาะส่วนปลายก็ได้ เพื่อการออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์มาใช้ในปฏิริยาต่อไป บริเวณหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้นจะมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลาย 5' ของไพรเมอร์หนึ่งถึงปลาย 5' ของไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่ง

ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ความยาวประมาณ 20-35 เบส วิธีทำคือสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์นำมาใส่รวมกับไพรเมอร์ บัฟเฟอร์ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้ความร้อนและลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วเพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายและมีปริมาณมากกว่าชิ้นดีเอ็นเออื่นๆ มากมายเข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ (annealing) ขั้นสุดท้ายจึงเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์สพร้อมทั้งใส่เอนไซม์ลงในปฏิริยา เอนไซม์จะทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิริยาดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เช่น จากเดิมมี 1 โมเลกุลจะเพิ่มเป็น 2 โมเลกุล ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิริยาซ้ำกัน (denaturation-annealing-extension) หลายๆรอบ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นจาก 1 เป็น 2, 4, 8 เท่า ไปเรื่อยๆ จนถึง 2^n เท่า เมื่อปฏิริยาผ่านไป n รอบ

เนื่องจากเทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ไวมากสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นล้านๆ เท่าได้อย่างรวดเร็วใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียงเล็กน้อยก็สามารถตรวจสอบได้ ดังนั้นจึงต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากภายนอก เช่น จากอากาศ ผิวหนัง ผสม เป็นต้น เพื่อป้องกันปัญหาดังกล่าวจึงควรทำพีซีอาร์ในบริเวณที่สะอาดไม่ปะปนกับการทดลองอื่น อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ควรสะอาดมีคุณภาพสูง แยกเด็ดขาดจากการทดลองอื่น สวมถุงมือในการปฏิบัติงาน และมีหลอดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ (negative control) ในการทดลองทุกครั้ง การปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากภายนอกนี้เป็นปัญหาที่สำคัญมากในการทดลองเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยๆ เช่น ตรวจดีเอ็นเอของแบคทีเรียจาก

อาหาร ดีเอ็นเอของแบคทีเรียหรือไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในคนเป็นต้น ในการทำพีซีอาร์ต้องใช้สารเคมีต่างๆ ดังนี้

1. บัฟเฟอร์สำหรับทำปฏิกิริยา ซึ่งมักจะมาพร้อมกับเอนไซม์ Tag polymerase โดยมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของที่จะใช้จริง (10x buffer) ซึ่งจะใส่ปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมของปฏิกิริยา

2. dNTP ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิโมลาร์ โดยอาจซื้อสำเร็จหรือซื้อมาแต่ละชนิดแล้วจึงนำมารวมกันให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ ในปฏิกิริยาจะใส่ในปริมาตร 1 ใน 10 ของปริมาตรรวม เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์

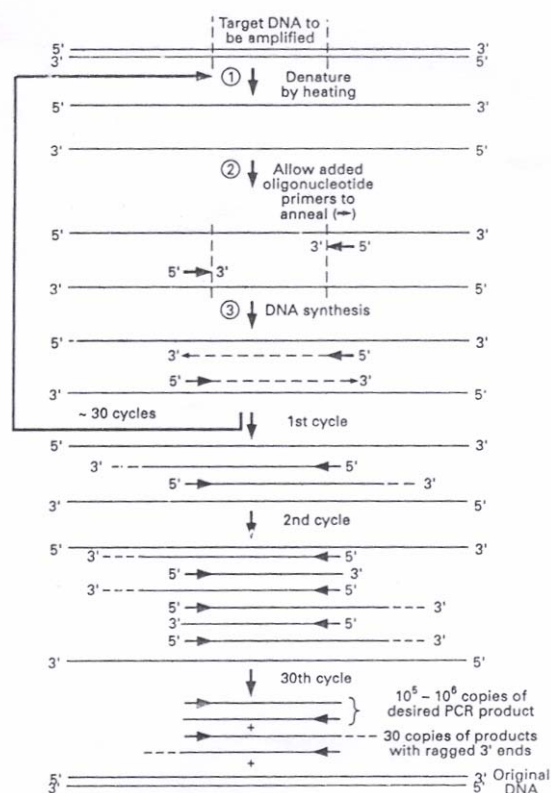
3. ไพรมเมอร์ ที่นิยมใช้คือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 20-24 นิวคลีโอไทด์ มีองค์ประกอบของเบส G และ C อยู่ระหว่างร้อยละ 40-60 โดยไพรมเมอร์ทั้งสองชนิดที่ใช้คู่กันควรมีส่วนประกอบของเบส G+C เท่ากัน เพื่อให้ค่า Tm (melting temperature) เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน และไม่ควรใช้ไพรมเมอร์ที่มีลักษณะปลาย 2 ข้างเป็นคู่สมกัน (palindrome sequence) ทั้งภายในไพรมเมอร์เดียวกันและระหว่างไพรมเมอร์ทั้ง 2 ชนิดที่ใช้คู่กัน แต่ในบางกรณีก็พบว่าอาจจะใช้ไพรมเมอร์ที่มีลักษณะไม่เหมาะสมดังกล่าวได้บ้าง การออกแบบไพรมเมอร์อาจทำได้จากลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณโดยตรงหรือใช้โปรแกรมสำเร็จรูปก็ได้ เมื่อสังเคราะห์ไพรมเมอร์เรียบร้อยแล้วจึงนำมาละลายในน้ำหรือ TE buffer ที่มีความเข้มข้น 5 พิโคโมลต่อลิตร (หรือ 5 ไมโครโมลาร์) ปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยาคือให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1-2.0 ไมโครโมลาร์

4. ดีเอ็นเอเป้าหมาย ใช้ได้ทั้งดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและดีเอ็นเอที่มีคุณภาพไม่ดีนัก เช่น ดีเอ็นเอจากหยดเลือด เนื้อเยื่อที่เก็บในพาราฟินเป็นต้น แต่ถ้าใช้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีจะได้ผลผลิตมากกว่า ปริมาณดีเอ็นเอใช้ได้ตั้งแต่ 5-500 นาโนกรัม โดยทั่วไปนิยมใช้ในช่วง 10-50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา

5. แมกนีเซียมคลอไรด์ ซึ่งอาจรวมอยู่ในบัฟเฟอร์ก็ได้ แต่ส่วนใหญ่จะแยกต่างหาก เพื่อให้ปรับใช้ได้ ปริมาณที่เหมาะสมกับดีเอ็นเอแต่ละชนิด เนื่องจากแมกนีเซียมไอออนเป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์พอลิเมอร์เรส และมีรายงานว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนมีผลต่อปฏิกิริยามาก ดังนั้นในการทดลองกับตัวอย่างชนิดใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน จึงควรทดลองปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ก่อนเพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด ความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ใช้ในปฏิกิริยา คือ 1.5-10 มิลลิโมลาร์

6. เอนไซม์ เนื่องจากขั้นตอนในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ต้องมีการทำให้ดีเอ็นเอเสถียรด้วยความร้อน เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสที่ใช้จึงเลือกใช้เอนไซม์ที่ทนความร้อนได้ (thermostable DNA polymerase) เอนไซม์ชนิดแรกแยกได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* YT1 ทำงานได้ที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมได้สูงสุดที่พีเอช 7.3-8.9 ชนิดที่ 2 แยกได้จาก

แบคทีเรียเดียวกันเป็นชนิดที่คนใช้กันมากรู้จักกันในชื่อ Taq polymerase ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส และต่อมาสามารถแยกเอนไซม์ได้อีกหลายชนิดจากแบคทีเรียต่างๆ โดยทุกชนิดที่แยกได้ประกอบด้วยโพลีเพปไทด์เพียงสายเดียว (monomer) ขนาดอยู่ระหว่าง 61-100 กิโลดาลตัน ความแตกต่างของเอนไซม์แต่ละชนิดคือการมีคุณสมบัติตัดดีเอ็นเอจากปลาย (exonuclease activity) เพราะเอนไซม์ที่สามารถตัดดีเอ็นเอจากปลาย 3' (3'→5' exonuclease) จะสามารถกำจัดนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ผิดพลาดได้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)



รูปที่ 2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์

ที่มา : Strachan. 1992

2.3 การตอบสนองต่อสภาพเครียดจากความดันออสโมติก

โดยทั่วไปเซลล์แบคทีเรียและเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นมีผนังเซลล์ที่สามารถรักษาความเข้มข้นของน้ำภายในเซลล์ให้อยู่ที่ระดับหนึ่งซึ่งต่ำกว่าภายนอกเซลล์เพื่อให้มีกิจกรรมภายในเซลล์ที่เหมาะสมเมื่อมีความแตกต่างของปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ (a_w) ทำให้มีแนวโน้มที่น้ำจะไหลเข้าไปในเซลล์ส่งผลให้เกิดแรงดันอุทกสถิตศาสตร์ (hydrostatic pressure) ซึ่งแรงดันนี้เมื่อเกิดขึ้นภายในเยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) และกระทำต่อผนังเซลล์จะเรียกว่าแรงดันเต่ง (Turgor pressure) หรือการบวม (turgor) เมื่อแรงดันเต่งเพิ่มขึ้นเยื่อหุ้มเซลล์จะดันผนังเซลล์ปริมาตรน้ำของเซลล์เพิ่มขึ้นทำให้เซลล์ขยายออก ในทางกลับกันถ้าแรงดันเต่งลดลงจะทำให้ปริมาตรของเซลล์ลดลงเช่นกัน จึงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงขนาดของเซลล์ แรงดึงผิว และความเข้มข้นของตัวถูกละลายภายใน cytoplasm (Csonka. 1989)

2.3.1 ความดันออสโมติก (Osmotic pressure)

ความดันออสโมติกหมายถึง ความดันอุทกสถิต (hydrostatic pressure) ที่เกิดขึ้นในเซลล์ สมมติว่ามีช่องที่ถูกแบ่งออกเป็นสองส่วนเหมือนกันซึ่งเปิดสู่สภาพบรรยากาศและถูกแยกแต่ละช่องด้วยเยื่อหุ้มที่ยอมให้สารบางชนิดผ่านได้ตามแนวขวาง โดยถ้าช่องที่ 1 เติมน้ำบริสุทธิ์ และช่องที่ 2 เติมน้ำและตัวถูกละลายที่ไม่สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มได้ในปริมาณเท่ากัน เพราะฉะนั้นความเข้มข้นของน้ำในช่องที่ 2 น้อยกว่าน้ำบริสุทธิ์ในช่องที่ 1 ทำให้โมเลกุลของน้ำจะแพร่ผ่านเยื่อจากช่องที่ 1 ไปยังช่องที่ 2 ทำให้น้ำในช่องที่ 1 ลดลง ซึ่งการเคลื่อนย้ายของน้ำนี้เป็นสาเหตุทำให้ระดับน้ำของช่องที่ 1 ลดลง และช่องที่ 2 มีน้ำเพิ่มมากขึ้นเกิดความดันอุทกสถิต การแพร่ของน้ำจากช่อง 1 ไปยังช่องที่ 2 นี้จะดำเนินไปอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งเกิดความสมดุลของน้ำ (Csonka. 1989)

จากตัวอย่างข้างต้นถ้าสารละลายที่บรรจุในช่องที่ 2 สามารถแพร่สู่อีกช่องหนึ่งได้อย่างอิสระและเยื่อหุ้มที่กั้นระหว่าง 2 ช่องนั้นไม่สามารถยึดหยุ่นได้ทำให้ปริมาตรของสารละลายในช่องที่ 2 ไม่สามารถขยายได้ทำให้เกิดความดันในช่องที่ 2 เพิ่มขึ้น โดยถ้าเป็นเซลล์ของแบคทีเรียและพืชซึ่งมีผนังเซลล์ที่แข็งอยู่รอบๆ เยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) เมื่อน้ำแพร่เข้าสู่เซลล์จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สามารถขยายได้เพียงพื้นที่ด้านในของผนังเซลล์เท่านั้น และเมื่อน้ำแพร่เข้าสู่เซลล์มากขึ้นจะทำให้เกิดแรงดันของเยื่อหุ้มเซลล์ดันไปที่ผนังเซลล์ ซึ่งแรงดันนี้เรียกว่าแรงดันเต่ง (turgor pressure) (Csonka. 1989)

ในขณะที่เซลล์ของแบคทีเรียซึ่งมีเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นเยื่อเลือกผ่านซึ่งมีลักษณะยอมให้น้ำสามารถผ่านเข้าไปได้ แต่ไม่ยอมให้ตัวถูกละลายที่มีอยู่ในอาหารและสารเมตาโบไลต์ที่มีอยู่ใน cytoplasm ผ่านได้ เมื่อภายนอกเซลล์มีน้ำที่เซลล์สามารถนำไปใช้ได้ต่ำ (สภาวะที่มีความดันออสโมติกสูง) ส่งผลให้เกิดการไหลออกของน้ำอย่างรวดเร็วและสูญเสียแรงดันเต่งทำให้เซลล์อาจสูญเสียน้ำได้มากที่สุดและทำให้เกิดการหดกลับของเยื่อหุ้มเซลล์จากผนังเซลล์ (Csonka. 1989)

2.3.2 สภาพเครียดต่อความดันออสโมติก (Osmotic stress)

สภาพเครียดต่อความดันออสโมติกหมายถึงสภาพเครียดของการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อมที่มีความดันออสโมติกสูง (high osmolality) สภาพเครียดต่อความดันออสโมติกมีผลต่อการเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรียซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับค่า a_w ภายนอกเซลล์ ค่า $a_w = P/P_o = n_1/(n_1+n_2)$ เมื่อ P คือความดันไอของสารละลาย P_o ความดันไอของตัวทำละลาย (น้ำบริสุทธิ์) n_1 คือจำนวนโมลของตัวทำละลาย และ n_2 คือจำนวนโมลของตัวถูกละลายในอุดมคติ การลดต่ำลงของความดันไอเป็นคุณสมบัติหนึ่งของสารละลายเช่นเดียวกับการลดต่ำลงของจุดเยือกแข็ง การเพิ่มขึ้นของจุดเดือด และการเพิ่มขึ้นของความดันออสโมติก ความดันออสโมติกก็คืออุทกสถิตศาสตร์ (hydrostatic pressure, มีหน่วยเป็นเมกกาปาสกาล) ความเข้มข้นตัวถูกละลายที่แท้จริง (actual solute) แสดงในรูปของตัวถูกละลายในอุดมคติ (ideal solute) ที่ให้ค่า a_w ระดับเดียวกันและมีหน่วยเป็น osmolal (OSM) ความสัมพันธ์ระหว่าง a_w และความดันออสโมติกแสดงได้ดังสมการดังนี้คือ $a_w = x/(x+c)$ ซึ่ง c หมายถึงความเข้มข้นของตัวถูกละลายมีหน่วยเป็น OSM และ x คือจำนวนโมลของน้ำต่อลิตร ซึ่งมีจำนวนโมลประมาณ 55.6 (Ingraham และ Marr, 1996)

2.3.3 กลไกการควบคุมความดันออสโมติก (Osmoregulatory mechanism)

กลไกการควบคุมความดันออสโมติก เป็นกลไกที่ช่วยรักษาความดันเต่งภายในเซลล์ให้อยู่ในระดับที่เซลล์สามารถทนได้ โดยทั่วไปพบว่าเมื่อเซลล์เผชิญกับความดันออสโมติกสูงภายนอกเซลล์หรือสภาพที่มีตัวถูกละลายภายนอกเซลล์สูงหรือปริมาณน้ำภายนอกเซลล์ต่ำกว่าภายในเซลล์ (hyperosmotic condition) เป็นผลให้เกิดการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ทำให้เกิดการลดลงของแรงดันเต่งและเกิดการลดลงของปริมาตรไซโตพลาสซึม (cytoplasmic volume) เป็นผลให้ความเข้มข้นของสารเมตาโบไลต์ทั้งหมดภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้ค่า a_w ภายในเซลล์ลดลง ถ้าภายในเซลล์ไม่มีการปรับตัวต่อสภาพความดันออสโมติกสูงเซลล์จะเหี่ยวจนกระทั่งค่า a_w ภายในเซลล์เท่ากับค่า a_w ภายนอกเซลล์ ความเข้มข้นที่สูงขึ้นของโมเลกุลต่างๆ ภายในเซลล์อาจทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ ตัวอย่างเช่น ตัวยับยั้งเอนไซม์จำเพาะอาจมีความเข้มข้นสูงขึ้นจนเป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ (Atkinson, 1969) หรือความเข้มข้นของไอออนที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นพิษต่อเซลล์ได้ (Walderhaug และคณะ, 1987)

ในทางตรงกันข้ามถ้าหากมีตัวถูกละลายอยู่น้อยหรือมีปริมาณน้ำมาก (hypothesis) น้ำภายนอกเซลล์จะเข้าสู่เซลล์ทำให้ความดันเต่งเพิ่มขึ้นเป็นผลให้เซลล์ขยายปริมาตรขึ้นดังนั้นการที่แบคทีเรียจะสามารถอยู่รอดในสภาพเครียดจากความดันออสโมติกได้นั้น เซลล์ของแบคทีเรียจำเป็นต้องปรับตัวโดยการสะสมตัวถูกละลายโดยเฉพาะภายใต้สภาวะที่มีความดันออสโมติกสูง (hyperosmotic) และปลดปล่อยภายใต้สภาวะความดันออสโมติกต่ำ (hyposmotic) ตัวถูกละลายนี้เรียกว่า compatible solute ซึ่งก็คือสารประกอบที่เซลล์สามารถสะสมได้ในความเข้มข้นสูงมากๆ เพียงพอที่จะรักษาสมดุล

ของความดันเต่งเมื่อภายนอกเซลล์มีความดันออสโมติกสูงโดยที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ ตัวอย่างของตัวถูกละลายนี้ได้แก่โพแทสเซียมไอออน (K^+) กรดอะมิโน กลูตาเมต (glutamate) กลูตามีน (glutamine) โพรลีน (proline) แกรมมาอะมิโนบิวไทเรต (γ -aminobutyrate) อะลานีน (alanine) ไกลซีนบีเทน (glycinebetaine) กรดอะมิโน N-methylated ซูโครส(sucrose) ทรีฮาโลส (trehalose) กลูโคซิลกลีเซอรอล (glucosylglycerol) (Csonka. 1989 ; Galinski และ Trüper. 1994) โดยตัวถูกละลายเหล่านี้สามารถสะสมให้เพิ่มมากขึ้นภายในเซลล์จากการสังเคราะห์ขึ้นเองหรือจากการรับจากสิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์ โดยไม่มีผลในการขัดขวางกระบวนการสำคัญภายในเซลล์ และยังมีผลในทางป้องกันเซลล์ โดย compatible solute หลายชนิดได้ถูกพิสูจน์ว่ามีผลทำให้เอนไซม์ภายในเซลล์มีความเสถียร และยังมีผลในทางป้องกันเซลล์ไม่เพียงแต่ป้องกันเซลล์ต่อสภาพที่มีเกลือสูงเท่านั้นยังป้องกันเซลล์ต่อสภาพที่มีอุณหภูมิที่สูง สภาพในการแช่แข็งและทำให้ละลาย และสภาพในการทำแห้งได้อีกด้วย (Yancey และคณะ. 1982)

2.3.4 Compatible solute

ความดันออสโมติกของไซโตพลาสซึม (cytoplasmic osmolality) เกิดขึ้นภายในเซลล์เนื่องจากสารที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมจำนวนมากที่มีความเข้มข้นไม่แตกต่างกับภายนอกเซลล์กับตัวถูกละลายที่มีปริมาณน้อยภายในเซลล์ ซึ่งความเข้มข้นของตัวถูกละลายนี้จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นภายนอกเซลล์ โดยตัวถูกละลายที่จะเป็นตัวกำหนดความดันออสโมติกภายในเซลล์นี้ถูกเรียกว่า compatible solute เนื่องจากส่วนใหญ่จะไม่ขัดขวางกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์แม้แต่ที่ความเข้มข้นสูง (Brown. 1990) compatible solute สามารถที่จะสะสมในเซลล์ของแบคทีเรียโดยการสังเคราะห์หรือโดยรับสารจากอาหารเลี้ยงเชื้อภายนอกเข้าสู่เซลล์ ซึ่ง compatible solute แต่ละชนิดมีผลต่อการทนต่อสภาพเครียดจากความดันออสโมติกของเซลล์ได้แตกต่างกันและแบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถสะสมตัวถูกละลายต่างชนิดกัน (ตารางที่ 2.1) เช่น โพแทสเซียมไอออน (K^+) กลูตาเมต (glutamate) และไอออนชนิดอื่นๆ ที่มีความเข้มข้นสูงก็สามารถยับยั้งเอนไซม์หลายชนิดได้ (Richey และคณะ. 1987) แต่ในสภาพที่มีความดันออสโมติกที่ต่ำกว่า 0.25 OSM โพแทสเซียมไอออน (K^+) และกลูตาเมต (glutamate) จะเป็นตัวควบคุมความดันออสโมติกภายในเซลล์แต่ที่ความดันออสโมติกสูงเซลล์ชอบที่จะสะสม compatible solute ที่ไม่มีประจุ (neutral compatible solute)

ตารางที่ 2.1 การสะสมสาร Compatible solute ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

ชนิดของจุลินทรีย์	การควบคุมสภาพเครียดจากความดันออสโมติก		เอกสารอ้างอิง
	Compatible solute	สังเคราะห์/รับเข้า	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO 3532	Glycine betaine	รับเข้า	Hutkins และคณะ. 1987
<i>L. plantarum</i> ATCC 14971	Glycine betaine	รับเข้า	Glaasker และคณะ. 1996
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG 1363	Glycine betaine	รับเข้า	van der Heide และ Poolman. 2000
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL 1403	Glycine betaine	รับเข้า	van der Heide และ Poolman. 2000
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ML3	Glycine betaine Proline	รับเข้า	van der Heide และ Poolman. 2000
<i>Staphylococcus aureus</i>	Proline	รับเข้า	Csonka. 1989
<i>Escherichia coli</i>	Proline	รับเข้า	Csonka. 1989
<i>Salmonella typhimurium</i>	Proline	รับเข้า	Csonka. 1989
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Proline	รับเข้า	Csonka. 1989

โดย neutral compatible solute ชนิดสำคัญที่สะสมในเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอริก (enteric bacteria) ได้แก่ ทรีฮาโลส โพรลีน และบีเทน สาร compatible solute ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ เช่น ในอาหารเลี้ยงเชื้อ defined minimal medium ทรีฮาโลสจะถูกสะสมขึ้นภายในเซลล์จากการสังเคราะห์แต่เซลล์ก็ไม่สามารถรับทรีฮาโลสเข้าสู่เซลล์เพื่อนำไปใช้เป็นสาร compatible solute ได้แม้ว่าภายนอกเซลล์จะมีทรีฮาโลสก็ตาม สำหรับโพรลีนและบีเทนจะถูกสะสมภายในเซลล์ก็ต่อเมื่อมีสารทั้งสองชนิดนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น ซึ่งการสะสม compatible solute โดยการรับเข้าจากอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นนี้สามารถพบได้ในแบคทีเรียบางชนิด เช่น เชื้อ *E. coli* สามารถสร้างบีเทนได้จากโคลีน choline ที่รับมาจากภายนอกเซลล์ (Csonka และ Epstein. 1996)

2.4 การตอบสนองต่อสภาพเครียดจากความเย็น

เมื่อเซลล์ของจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำจะส่งผลให้ความเสถียรของโปรตีนภายในเซลล์ลดน้อยลง อันเนื่องมาจากขบวนการต่างๆซึ่งได้แก่ อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์และการนำสับสเตรทเข้าสู่เซลล์ลดลง การคงรูปของเยื่อหุ้มเซลล์ลดน้อยลง การเกิดกิจกรรมของ RNA polymerase ต่ำลง และความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์สูงขึ้น ซึ่งส่งผลให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บจากความดันออสโมติกที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้ นอกจากนี้การตายของเซลล์จุลินทรีย์ที่เกิด

จากการแข่งขันและการละลายโดยส่วนมากมักเกิดจากความเสียหายและการเสียสภาพของ DNA ซึ่งการที่แบคทีเรียจะสามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิต่ำได้นั้น แบคทีเรียจะทำการปรับตัวต่ออุณหภูมิที่ต่ำด้วยกระบวนการเพิ่มกรดไขมันอิ่มตัว และการสังเคราะห์โพลีเพปไทด์ (Panoff และคณะ. 1998)

โดยทั่วไปเซลล์ของแบคทีเรียจะไวต่อการแช่แข็งซึ่งทำให้เซลล์มีอัตราการตายอย่างช้าๆ ซึ่งการแช่แข็งและละลายบ่อยครั้งได้ถูกศึกษาซึ่งพบว่าเยื่อหุ้มเซลล์เกิดความเสียหายและเกิดการเสียสภาพของ DNA ที่เป็นเหตุให้เซลล์ตายหลังจากการแช่แข็งและละลาย ขณะที่โปรตีนถูกทำลายเนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามจากการศึกษาการตอบสนองต่อการแช่แข็งและละลายของแบคทีเรียในระยะ exponential พบว่าหลังจากย้ายเซลล์ของแบคทีเรียจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตไปยังอุณหภูมิที่ต่ำกว่า (สูงกว่า 0 องศาเซลเซียส) แบคทีเรียบางชนิดจะเพิ่มความสามารถอยู่รอดที่อุณหภูมิต่ำได้ดียิ่งขึ้นโดยการเพิ่มความต้านทานต่อความเย็น ซึ่งการปรับตัวต่อการแช่แข็งและละลายนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มซึ่งจะต้องเหมาะสมกับความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย (Panoff และคณะ. 1998)

2.4.1 ความซับซ้อนของกระบวนการปรับตัวของเซลล์ (The complexity of the cellular adaptation process)

อุณหภูมิของสภาพแวดล้อมมีผลกระทบอย่างมากต่อสภาวะทางสรีรวิทยาของเซลล์จุลินทรีย์ เนื่องจากอุณหภูมิมิมีผลกระทบต่อปฏิกิริยาเคมีในเซลล์เกือบทั้งหมด ในจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิห้องประกอบทั้งหมดของเซลล์จำเป็นต้องสามารถทำหน้าที่ได้ ดังนั้นการปรับตัวให้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำจึงเป็นปรากฏการณ์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการรักษาสภาพโครงสร้างของโมเลกุลใหญ่ภายในเซลล์และการรวมกลุ่มของโมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งได้แก่ โปรตีน ไรโบโซม และเยื่อหุ้มเซลล์ รวมทั้งรักษาสภาพและควบคุมระบบการสังเคราะห์โปรตีนและรับสารอาหารเข้าสู่เซลล์ ความซับซ้อนที่เกิดขึ้นนี้สะท้อนให้เห็นถึงความล้มเหลวหลายๆครั้งในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ฝ่าเหล่าที่ขอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลางที่ผ่านการปรับตัวต่อความเย็น (Russell. 1990)

2.4.2 การปรับตัวต่ออุณหภูมิของของเหลวที่เป็นไขมันที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Thermal adaptation of membrane lipid fluidity)

เมื่อเกิดการปรับตัวต่อความเย็นจุลินทรีย์จะทำการปรับส่วนประกอบของกรดไขมันของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ ในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่เชื้อเจริญเติบโตโดยการปรับสัดส่วนของเซลล์ตามปกติต้องการสภาพเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีลักษณะเป็นเยื่อหุ้ม 2 ชั้น (membrane lipid bilayer) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นของเหลว เมื่อลดอุณหภูมิลงสายของกรดไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสภาพของเหลวหรือสภาพที่มีลักษณะเหมือนของเหลวไปเป็นสภาพที่มีการจัดตัวในรูปของผลึกไขมันมากขึ้น การเปลี่ยนแปลงในขั้นนี้เรียกว่า lipid phase transition หรือ order-disorder transition และจุดกึ่งกลางของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมินี้เรียกว่า Transition temperature

(De Mendoza และ Cronan, 1983) จุลินทรีย์จะตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงนี้เมื่ออุณหภูมิลดลงโดยเกิดกรดไขมันที่มีจุดหลอมเหลวต่ำจำนวนมากที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ยังคงทำงานได้ต่อไป (Cronan และ Rock, 1987 ; De Mendoza และ Cronan, 1983) กลไกที่ควบคุมอุณหภูมิแบบนี้ได้ทดสอบในเชื้อ *E. coli* (Cronan และ Rock, 1987) แบคทีเรียชนิดนี้จะสะสม cis-vaccenic acid ($C_{18} : 1$) ให้เพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่ออุณหภูมิในการเจริญลดลง ซึ่งการตอบสนองนี้ไม่ต้องการการชักนำการสร้างโปรตีนแต่มีการนำโปรตีนบางชนิดมาแทรกจึงจะทำงาน (active) ได้ดีเฉพาะที่อุณหภูมิต่ำ

แบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียโพรไบโอติกบ่อยครั้งที่เผชิญกับสภาพเครียดในระหว่างกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมและกระบวนการถนอมอาหาร ในสภาพนี้เป็นอันตรายต่อสภาวะทางสรีรวิทยาของจุลินทรีย์เหล่านี้และทำให้กลไกที่ผลิตได้ไม่มีคุณภาพ (Hubálek, 2003) เช่น แบคทีเรียที่เผชิญต่อความสภาพเครียดจะทำให้จุลินทรีย์เกิดการตอบสนองทางสรีรวิทยาโดยเกิดการปรับตัว การเปลี่ยนแปลงซึ่งได้เคยมีการศึกษาพบในแบคทีเรียโพรไบโอติกและแบคทีเรียกรดแลคติกแบ่งได้เป็นขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 การตอบสนองโดยการปรับตัวทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของส่วนประกอบของกรดไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งช่วยควบคุมการยอมรับให้สารผ่านเข้าออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane permeability) และการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวทำให้อุณหภูมิของการเปลี่ยนแปลงจากของแข็งเป็นของเหลวลดลง ซึ่งจะช่วยรักษาสภาพของเหลวที่เยื่อหุ้มเซลล์ในระหว่างเกิดสภาพเครียดจากความเย็น (Russell, 1997) กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เพิ่มสูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการทนต่อความเย็นได้ดีขึ้นในเชื้อ *S. thermophilus* (Béal และคณะ, 2001) นอกจากนี้การสังเคราะห์กรดไขมันเฉพาะมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อสภาพเครียด ความเข้มข้นของกรดไขมัน $C_{16} : 0$ ถูกพบว่าช่วยการตอบสนองต่ออุณหภูมิที่ต่ำในเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* (Fernandez Murga และคณะ, 2000 ; Wang และคณะ, 2005) ขณะที่กรดไขมัน $C_{18} : 0$ เพิ่มขึ้นในระหว่างที่เชื้อ *L. plantarum* เกิดการปรับตัวต่อความเย็น (Russell และคณะ, 1995) และ $cycC_{19} : 0$ ที่มีความเข้มข้นสูงพบว่าจะช่วยในการป้องกันเซลล์จากความเย็นให้กับเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* (Smittle และคณะ, 1974), *Lactobacillus helveticus* และ *Lactobacillus acidophilus* (Zavaglia และคณะ, 2000) โดยเชื้อเหล่านี้มีการสังเคราะห์กรดไขมัน $cycC_{19} : 0$ สูงขึ้นทำให้ของเหลวที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ถูกรักษาไว้

การสังเคราะห์โปรตีนที่ตอบสนองต่อความเย็นอย่างฉับพลัน (cold shock proteins) เป็นการตอบสนองความเย็นขั้นที่ 2 โปรตีนชนิดนี้สามารถเข้าจับกับ RNA และบางครั้งทำหน้าที่ในฐานะของ RNA chaperones ดังนั้นจึงทำให้กระบวนการแปลรหัส (translation) ภายใต้อุณหภูมิที่ต่ำง่ายขึ้น (Graumann และคณะ, 1997) โปรตีนนี้ยังทำหน้าที่ขจัดความอึดตัวของกรดไขมันที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* มีโปรตีน 12 ชนิดที่ถูกสังเคราะห์เพิ่มขึ้นเป็น 3 เท่าที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Panoff และคณะ, 2000) ในเชื้อ *S. thermophilus* จะมีโปรตีน (non-constitutive proteins) 4 ชนิด ถูกชักนำที่อุณหภูมิ 15

องศาเซลเซียส และโปรตีน 6 ชนิด ถูกสังเคราะห์มากที่สุดหลังจากเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 20 องศาเซลเซียส (Wouters และคณะ. 1999) กลุ่มของ cold shock protein (CspA-CspE) ซึ่งแบ่งลักษณะได้โดยใช้น้ำหนักโมเลกุลที่ประมาณ 7 กิโลดาลตัน ซึ่งได้เคยมีการจำแนกและค้นพบในบรรดาโปรตีนเหล่านี้ การสังเคราะห์โปรตีน CspB และ CspE มากเกินมีผลทำให้เชื้อ *L. lactis* ที่ผ่านการแช่แข็งมีการอยู่รอดเพิ่มขึ้น (Wouters และคณะ. 2000) และการสังเคราะห์โปรตีน CspP ที่มากเกินไปในเชื้อ *L. plantarum* ช่วยให้การอยู่รอดของเชื้อหลังจากถูกแช่แข็งเพิ่มขึ้น (Derzelle และคณะ. 2003)

ประการสุดท้ายโปรตีนที่ทำให้เกิดการปรับตัวให้เข้ากับสภาพความเย็น 10 ชนิด จะถูกสร้างขึ้นในเชื้อ *Enterococcus faecalis* ระหว่างที่เชื้อเจริญที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส (Panoff และคณะ. 1997) ซึ่งโปรตีน 5 ชนิดของโปรตีนทั้งหมดพบว่าเป็น cold shock protein

การปรับตัวทางสรีรวิทยาหลังการเผชิญสภาวะเครียดจากความเย็นทั้ง 2 ประเภทนี้อาจถูกชักนำให้เกิดขึ้นในระหว่างการผลิตกล้าเชื้อแบบแช่แข็งเพื่อให้เชื้อสามารถทนต่อความเย็นได้ดียิ่งขึ้น ตัวอย่างเช่น เมื่อนำแบคทีเรียที่เจริญแล้วมาบ่มที่อุณหภูมิต่ำหรือฟิเอชด่าจะช่วยเพิ่มความต้านทานต่อการแช่แข็งและเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง (Béal และคณะ. 2001 ; Fernandez Murga และคณะ. 2000 ; Wang และคณะ. 2005) อย่างไรก็ตามวิธีนี้นำไปสู่ความเข้มข้นเซลล์ที่น้อยลงในช่วงสุดท้ายของการหมัก ซึ่งทำให้การผลิตของกล้าเชื้อวิธีนี้ไม่ได้รับความสนใจ

การปรับตัวอื่นๆ อาจเกิดขึ้นภายหลังขั้นตอนการหมักเช่น การบ่มเชื้อ *L. lactis* ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากการเพาะเลี้ยงให้เจริญจะช่วยให้เชื้อมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตเพิ่มขึ้น (ร้อยละ 95) (Panoff และคณะ. 1994) ในกรณีของเชื้อ *L. bulgaricus* การนำเชื้อมาไว้ที่อุณหภูมิต่ำลงคืออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะทำให้เชื้อมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตร้อยละ 80 (De Urraza และ De Antoni. 1997) ส่วนเซลล์ของเชื้อ *L. lactis* มีความต้านทานต่อการแช่แข็งเพิ่มมากขึ้นหลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Kim และคณะ. 1999) หรือ 2 ชั่วโมง (Broadbent และ Lin. 1999) และเมื่อนำการปรับตัวต่อความเย็นอย่างฉับพลันที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง มาประยุกต์ให้กับเชื้อ *S. thermophilus* มีผลทำให้อัตราการอยู่รอดของเชื้อหลังการแช่แข็งเพิ่มขึ้น 10^3 เท่า (Wouters และคณะ. 1999) ประการสุดท้ายการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ในระหว่างขั้นตอนการป้องกันความเย็นจะช่วยให้อัตราการรอดของเชื้อ *L. bulgaricus* และ *S. thermophilus* ที่ผ่านการแช่แข็งดีขึ้น (Fonseca และคณะ. 2001) อย่างไรก็ตามการปรับตัวที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิต่ำสุดสำหรับการเจริญคือ 15 องศาเซลเซียส ไม่มีผลทำให้เชื้อ *S. thermophilus* เกิดการปรับตัวต่อความเย็นได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Wouters และคณะ. 1999)

2.5 เทคโนโลยีการผลิตกล้าเชื้อ

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตกล้าเชื้อสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์อาหาร ชนิดของเชื้อที่นิยมใช้ในการผลิตกล้าเชื้อได้แก่ *Lactobacillus*, *Streptococcus* และ *Bifidobacterium* หรือการผสมแบคทีเรียตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป (mixed culture) โดยการผสมกล้าเชื้อให้เหมาะสมกับอาหารหมักแต่ละชนิดจะทำให้ได้ประโยชน์ทั้งในความสะดวกในการควบคุมการผลิต การปรับปรุงคุณภาพรสชาติ และความปลอดภัยของผู้บริโภค ซึ่งนอกจากอาหารจะปลอดภัยแล้วการบริโภคอาหารที่มีแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคโดยที่แบคทีเรียกรดแลคติกยังมีชีวิตอยู่ยังช่วยให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้และมีผลในการป้องกันการเกิดโรคท้องร่วงจากเชื้อโรคหลายชนิดซึ่งเรียกแบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านั้นว่า “โพรไบโอติก” (probiotic) โดยปัจจุบันการผลิตจุลินทรีย์เพื่อเป็นโพรไบโอติกสำหรับอาหารเสริมของมนุษย์และสัตว์เป็นอุตสาหกรรมการผลิตเชื้ออีกแขนงหนึ่ง (Conway และคณะ. 1987 ; Fuller. 1989)

มนุษย์รู้จักการถนอมหรือแปรรูปอาหารด้วยวิธีการหมักโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกมาเป็นเวลานานไม่น้อยกว่าการหมักที่เกิดจากการใช้เชื้อราและยีสต์ แต่ในประเทศตะวันตกและประเทศตะวันตกต่างไม่มีเทคโนโลยีการผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียแบบพื้นบ้าน โดยเฉพาะกล้าเชื้อที่ไม่ได้อยู่ในรูปเชื้อผสมกับยีสต์ ในยุคก่อนที่จะมีการพัฒนาการผลิตกล้าเชื้อบริสุทธิ์ การหมักอาหารจึงอาศัยเชื้อจากธรรมชาติที่ติดมากับวัตถุดิบ โดยควบคุมสภาวะการหมักให้เหมาะสมเพื่อให้แบคทีเรียชนิดที่ต้องการเจริญได้ดี ซึ่งปัจจุบันยังพบได้ในการผลิตอาหารหมักบางชนิดเช่น การดองผักและการหมักผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ส่วนผลิตภัณฑ์นมหมักที่ผลิตแต่เดิมนั้นใช้วิธีเก็บอาหารหมักบางส่วนจากการหมักในรุ่นก่อนไว้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการหมักรุ่นต่อไป จนประมาณ ค.ศ. 1880 ได้มีการใช้เชื้อบริสุทธิ์ผลิตเนยแข็งเป็นครั้งแรกในประเทศเคนมาร์ค (Fleming และคณะ. 1985 ; Tanaka และคณะ. 1980) และได้มีการพัฒนาวิธีการผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมประเภทนี้มาอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน ซึ่งกล้าเชื้อที่จะผลิตขายเป็นอุตสาหกรรมได้จะต้องมีอายุการเก็บรักษานานและไม่สูญเสียคุณสมบัติระหว่างการขนส่งและเก็บรักษา ซึ่งการแช่แข็งแห้ง (freeze drying) เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการผลิตกล้าเชื้อในระดับอุตสาหกรรม (นภา โล่ห์ทอง. 2534)

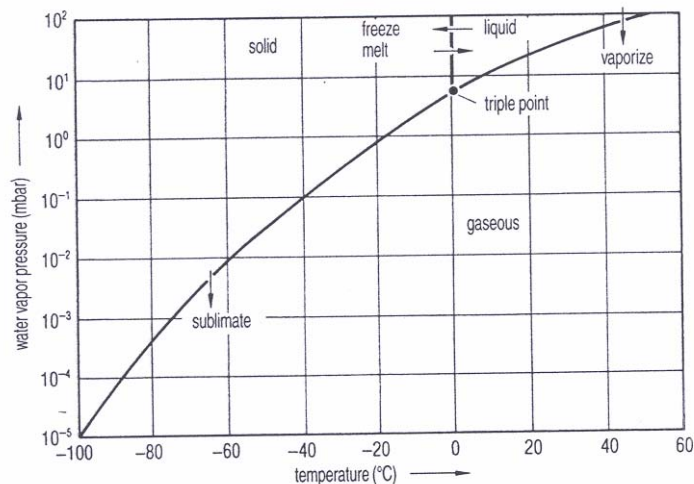
การผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธีการแช่แข็งแห้งเป็นอีกวิธีที่นิยมใช้กันในอุตสาหกรรม กล้าเชื้อในรูปแบบนี้ได้เปรียบในเรื่องความสะดวกในการขนส่งและการเก็บรักษา แต่การแช่แข็งแห้งมีผลทำให้เชื้อมีประสิทธิภาพลดจำนวนลงค่อนข้างมาก ส่วนใหญ่เชื้อที่ผลิตเป็นกล้าในรูปแบบนี้ได้แก่ *Streptococcus* ซึ่งโดยทั่วไปเซลล์ที่รอดชีวิตจะลดจำนวนถึงร้อยละ 50-80 ในระหว่างการทำแห้ง (Gilland. 1985 ; Peppler และ Perlman. 1979) และในระหว่างการเก็บรักษาเชื้อจะลดปริมาณลงอีกตามระยะเวลาที่เก็บ

การควบคุมความชื้นที่เหมาะสมเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ทำให้ปริมาณการอยู่รอดของเชื้อระหว่างการเก็บรักษาสูงขึ้น ตัวอย่างเช่นเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ในสภาพแช่แข็งแห้งที่มีความชื้นร้อยละ 3.8-5.7 จะมีปริมาณเชื้ออยู่รอดมากกว่าเชื้อ *L. plantarum* ที่มีความชื้นร้อยละ 0.7-2.3 (Denilova และคณะ. 1981)

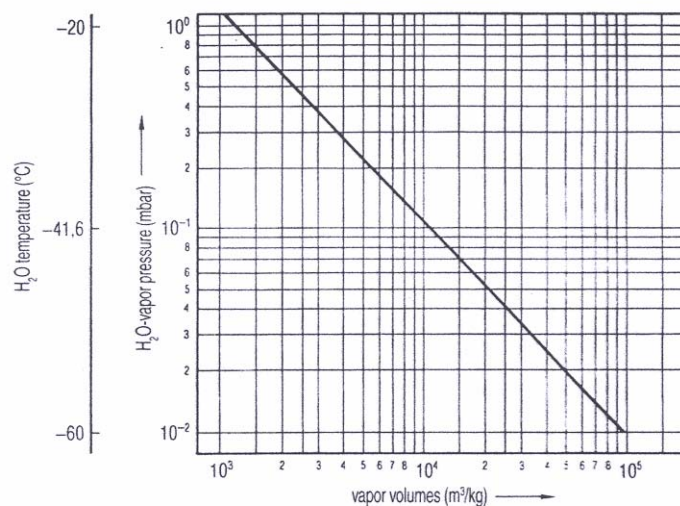
นอกจากนี้อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อมีผลทำให้เชื้ออยู่รอดได้มากขึ้น เช่นการเติมยีสต์สกัดและวิตามินซีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ปริมาณ *L. bulgaricus* อยู่รอดได้มากขึ้น (Naghmoush และคณะ. 1979) นอกจากนี้ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อแล้วยังสามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดของกล้าเชื้อได้โดยการเติมสารต่างๆ ขณะแช่แข็งแห้ง เช่น เติมนิโโคตินามิกกลูตาเมต ประมาณร้อยละ 5 หรือ แลคโตสร้อยละ 7 (Gilland. 1985 ; Kilara และคณะ. 1977) และในระดับการทดลองได้มีการผลิตกล้าเชื้อโดยการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจินเตแล้วนำไปไลโอฟิลไลส์พบว่าเชื้อ *L. plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* ที่ผลิตเป็นกล้าเชื้อในรูปแบบนี้สามารถใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ได้ผลเป็นอย่างดี (Kilara และคณะ. 1977)

2.6 การแช่แข็งแห้ง (Freeze Drying)

การแช่แข็งแห้งเป็นกระบวนการทำแห้งซึ่งตัวทำละลาย (solvent) หรือสารแขวนลอย (suspension medium) จะถูกทำให้กลายเป็นผลึกที่อุณหภูมิต่ำและต่อมาก็จะถูกทำให้ระเหิดจากสถานะของของแข็งกลายเป็นสถานะของไอ (vapor phase) การแช่แข็งแห้งโดยส่วนใหญ่มักใช้กับตัวอย่างที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย รูปที่ 2.2 ได้แสดงแผนภาพสถานะของน้ำและบริเวณที่จะมีการเปลี่ยนสถานะจากของแข็งกลายเป็นไอซึ่งอาจเป็นไปได้ที่จะเกิดขึ้น ในขั้นตอนในแผนภาพนี้เป็นการเปลี่ยนสถานะของน้ำบริสุทธิ์ ถ้าผลิตภัณฑ์ประกอบด้วยองค์ประกอบ 2 ชนิดหรือมากกว่า 2 ชนิดและอยู่ในสภาพของสารละลายแท้ (true solution) หรือสารแขวนลอย (suspension) ขั้นตอนการเปลี่ยนสถานะของตัวทำละลายก็必将มีความซับซ้อนมากยิ่งขึ้น ความสลับซับซ้อนในระบบเช่นนี้เกิดขึ้นในสารชีวภาพ (biological substance) การทำแห้งเป็นการเปลี่ยนสภาพจากน้ำแข็งหรือน้ำในสถานะ อะมอร์ฟัส (amorphous phase) กลายเป็นสถานะไอ เนื่องจากน้ำแข็งมีความดันไอต่ำปริมาตรของไอจึงมาก (รูปที่ 2.3) ดังนั้นระหว่างขั้นที่ 2 ของการทำแห้งน้ำซึ่งถูกดูดซับอยู่บนของแข็งจะหลุดออก จุดมุ่งหมายของการแช่แข็งแห้งคือผลิตสารที่มีความคงตัวที่ดีในระหว่างการเก็บรักษาซึ่งจะไม่เกิดการเปลี่ยนสภาพหลังจากการคืนรูปด้วยน้ำ (Oetjen และ Haseley. 2004)



รูปที่ 2.2 แผนภาพของสถานะของน้ำและบริเวณที่จะมีการเปลี่ยนสถานะจากของแข็งกลายเป็นไอ
ที่มา : Oetjen และ Haseley. 2004



รูปที่ 2.3 การทำแห้งเป็นการเปลี่ยนสภาพจากน้ำแข็งหรือน้ำในสถานะอะมอร์ฟัส (amorphous phase)
กลายสถานะกลายเป็นไอ

ที่มา : Oetjen และ Haseley. 2004

การแช่แข็งแห้งมีข้อได้เปรียบคือการทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยลดความเสียหายของผลิตภัณฑ์ที่ไวต่อความร้อน สามารถเติมของแห้งที่ได้จากกระบวนการแช่แข็งแห้งลงในผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวได้ในปริมาณที่ถูกต้อง ปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์ในขั้นสุดท้ายสามารถถูกควบคุมได้ ในระหว่างกระบวนการ สามารถทำให้ผลิตภัณฑ์แห้งมีลักษณะทางกายภาพที่น่าสนใจ และผลิตภัณฑ์ที่แห้งซึ่งมีพื้นที่ผิวมากจะคืนรูปเป็นของเหลวได้อย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามมีข้อเสียคือ ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูงในการลงทุนการปฏิบัติงานและบำรุงรักษาเครื่องมือ นอกจากนี้กระบวนการทำแห้งยังมี

ความซับซ้อนและต้องการผู้ที่มีความชำนาญในการใช้เครื่องมือ ซึ่งกระบวนการแช่แข็งแห้ง ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

2.6.1 การแช่แข็ง

ในการแช่แข็งสารจะต้องทำให้สารมีอุณหภูมิต่ำลงจนถึงอุณหภูมิที่ทำให้น้ำและของแข็งเกิดผลึกขึ้นอย่างเต็มที่หรือในบริเวณพื้นที่ของผลึกน้ำแข็งและในขอบเขตของแข็งและน้ำซึ่งเข้มข้นในสถานะอะมอร์ฟัส ซึ่งยังคงมีสถานะเป็นของแข็งในบริเวณที่มีการแช่แข็งผลึกน้ำแข็งจะเริ่มโตขึ้น ดังนั้นจึงทำให้สารละลายที่เหลืออยู่มีความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งสามารถทำให้ค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงในสารหลายชนิดสามารถวัดอุณหภูมิของจุดหลอมเหลวได้ แต่ในสารอื่นอีกหลายชนิดไม่สามารถทำการวัดค่าออกมาได้ การเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นอยู่กับการแช่แข็งด้วยปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อัตราการให้ความเย็น ความเข้มข้นเริ่มต้น อุณหภูมิสุดท้ายในการทำให้เย็น และระยะเวลาที่สารอยู่ที่อุณหภูมิสุดท้ายนี้ในผลิตภัณฑ์หลายๆ ชนิดไม่มีการเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นและผลิตภัณฑ์ยังคงอยู่ในสถานะอะมอร์ฟัส ซึ่งเป็นสถานะที่สารจะมีรูปร่างเหมือนแก้ว (glass-like) หรือมีสถานะผสมของ 2 สถานะ (Oetjen และ Haseley, 2004) ในการแช่แข็งอาหารและสารบางชนิดน้ำบางส่วนจะแข็งตัวเป็นผลึกน้ำแข็งขณะเดียวกันมีน้ำบางส่วนที่ไม่แข็งตัว (unfreezable water) (ตารางที่ 2.2 และ 2.3)

ตารางที่ 2.2 ปริมาณของน้ำที่แข็งตัวและไม่แข็งตัวในอาหารบางชนิดที่อุณหภูมิของการแช่แข็งระดับต่างๆ

ชนิดของผลิตภัณฑ์	ปริมาณของน้ำที่เกิดการแข็งตัว (ร้อยละของปริมาณน้ำทั้งหมด) ที่อุณหภูมิต่างๆ (องศาเซลเซียส)				ปริมาณของน้ำที่ไม่เกิดการแข็งตัว (ร้อยละของปริมาณน้ำทั้งหมด)
	-10	-15	-20	-30	
เนื้อที่มีไขมันต่ำ	82	85	87	88	12
ไส้กรอก	84	87	89	91	9
ไข่รวมเหลว	89	91	92	93	7
ไข่แดง	85	86	87	87	13
ไข่ขาว	91	93	94	-	6
ยีสต์	80	85	88	89	11
น้ำผลไม้	85	90	93	96	-
ถั่ว	80	86	89	92	-

ที่มา : Riedel, 1972

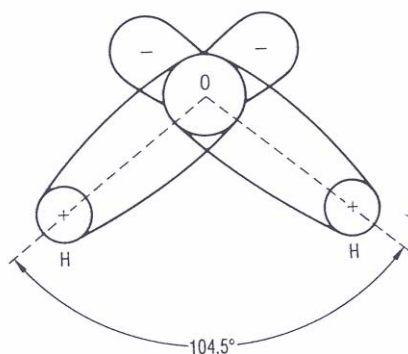
ตารางที่ 2.3 ปริมาณของน้ำที่ไม่กลายเป็นน้ำแข็งซึ่งไม่สามารถแข็งตัวได้โดยการลดอุณหภูมิให้ต่ำลง

ชนิดของสาร	ปริมาณของน้ำที่ไม่กลายเป็นน้ำแข็ง (ร้อยละ)
ทรีฮาโลส	16.7
ซอร์บิทอล	18.7
มอลโตส	20
กลีเซอริน	27
กลูโคส	29.1
ซูโครส	35.9
แลคโตส	40.8
กลีเซอรอล	45.9
ฟรุคโตส	49.0

ที่มา : Riedel, 1972

2.6.1.1 โครงสร้างของน้ำแข็งและสารละลาย

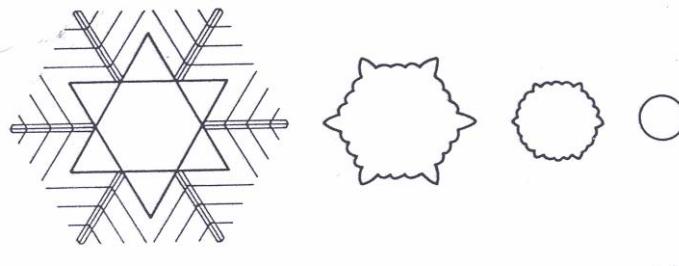
โมเลกุลของน้ำมีรูปร่างแสดงในรูป 2.4 ที่มี 2 ขั้วอย่างเห็นได้ชัดซึ่งทำให้เกิดลักษณะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงและโครงสร้างชั้นนอกของโมเลกุลเกาะกลุ่มกันในน้ำจะไม่มีไอออน ซึ่งกลุ่มที่เกาะกันนี้ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำ 10 โมเลกุลโดยประมาณ โดยมีรูปร่างเป็นสามเหลี่ยมที่มี 4 ด้านซึ่งถูกล้อมรอบด้วยกลุ่ม O-H-O กลุ่มของโมเลกุลน้ำจะไม่เสถียรเนื่องจากเป็นกลุ่มของโมเลกุลที่เหมือนกันและจะมีการแลกเปลี่ยนโมเลกุลกับสิ่งแวดล้อมเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอ โดยมีช่วงชีวิต (life time) เฉลี่ย 10^{10} ถึง 10^1 วินาที จำนวนของการเกาะกลุ่มจะลดลงเมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงจนกระทั่งเกิดการแข็งตัวของน้ำขึ้น (Oetjen และ Haseley, 2004)



รูปที่ 2.4 รูปร่างโมเลกุลของน้ำ

ที่มา : de Quervain, 1975

ในสภาพของน้ำที่ปราศจากสิ่งแปลกปลอมกลุ่มของน้ำจะเริ่มเป็นผลึกน้ำแข็งในน้ำที่มีอุณหภูมิลดลงถึง -39 องศาเซลเซียส การเกิดเช่นนี้เรียกว่า homogeneous nucleation สำหรับอนุภาคอื่นที่ไม่ละลายน้ำจะกระทำตัวเป็นจุดศูนย์กลาง (nuclei) สำหรับการเกิดผลึกน้ำแข็งซึ่งถูกเรียกว่า heterogeneous nucleation ในน้ำปกติแล้วจะมี nuclei อยู่ประมาณ 10^6 อนุภาคต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และ nuclei นี้จะกระทำตัวเป็นจุดศูนย์กลางของการเกิดผลึกน้ำแข็ง น้ำแข็งจะเพิ่มขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพถ้าโครงสร้างนั้นเหมือนกับโครงสร้างของน้ำ โดยถ้า nuclei มีการก่อตัวขึ้นและเกิดน้ำแข็งที่บริเวณภายนอกเร็วกว่าภายในจะเป็นการสร้างน้ำแข็งแบบไอซ์สตาร์ (ice star) ซึ่งการสร้างโครงสร้างเช่นนี้จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ลดลงและอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิ (รูปที่ 2.5) ขณะที่การแช่แข็งดำเนินต่อไปจะเกิดการโตขึ้นของผลึกน้ำแข็งที่แตกกิ่งก้านสาขาออกทำมุม 60° เป็นที่รู้จักกันดีในชื่อของดอกไม้ น้ำแข็ง (Frost flowers) สำหรับผลึกขนาด 1×10^9 ตารางมิลลิเมตร เกิดจากโมเลกุลของน้ำ 2×10^7 โมเลกุล จัดเรียงตัวในตำแหน่งต่างๆ ซึ่งยากที่จะเห็นได้ว่าผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นได้อย่างไรภายในเวลาเสี้ยววินาที แต่จะเห็นได้ชัดว่าการโตของผลึกน้ำแข็งนั้นได้รับอิทธิพลจากหลายๆ ปัจจัย (Oetjen และ Haseley, 2004)



รูปที่ 2.5 การโตขึ้นของผลึกน้ำแข็งของน้ำซึ่งเพิ่มขึ้น

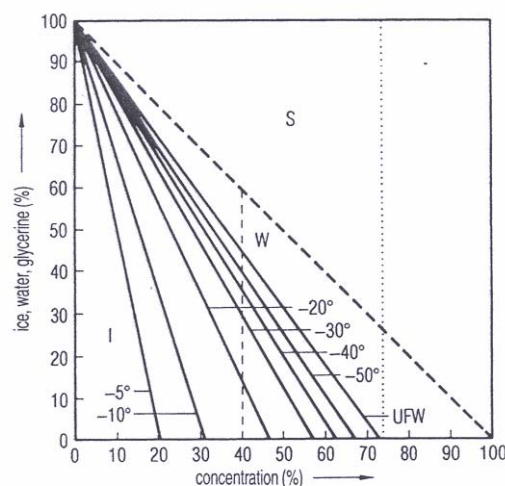
ที่มา : de Quervain, 1975

2.6.1.2 การแช่แข็งเพื่อให้เกิดผลึกขนาดใหญ่

การแช่แข็งเพื่อให้เกิดผลึกขนาดใหญ่ อัตราการเกิด nucleation ควรจะน้อย การแช่แข็งควรเกิดในสภาพ quasi-equilibrium ในสถานะระหว่างสารละลายและผลึกน้ำแข็งที่ใช้ในการแช่แข็ง ควรจะสูงมากเท่าที่จะทำได้ เนื่องจากการโตขึ้นของผลึกน้ำแข็งเป็นฟังก์ชันของ $e^{-1/T}$ และที่เวลาใช้สำหรับการเกิดผลึกน้ำแข็งจะต้องเพิ่มขึ้น ส่วนการแช่แข็งเพื่อให้เกิดผลึกน้ำแข็งน้อยมากหรือไม่เกิดผลึกการแช่แข็งควรเกิดขึ้นภายใต้ความดันสูงและอัตราการแช่แข็งควรสูงมากเท่าที่จะเป็นไปได้ (Oetjen และ Haseley, 2004)

สถานะที่ไม่สมดุล (non equilibrium status) สามารถพบได้ในระหว่างการให้สารละลายของกลีเซอรอลกับน้ำเย็นลงอย่างช้าๆ โดยเริ่มจากสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20

ผลึกน้ำแข็งบริสุทธิ์จะเริ่มเกิดขึ้นตั้งแต่แรกจนกระทั่งถึงอุณหภูมิ -46 องศาเซลเซียส ที่ทุกอุณหภูมิระดับนี้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลจะสูงถึงร้อยละ 66.7 และที่อุณหภูมิเดียวกันนี้สารผสมที่มีจุดหลอมเหลวต่ำจะกลายเป็นของแข็ง อย่างไรก็ตามอาจเป็นไปได้ที่จะลดอุณหภูมิลงจนถึง -58 องศาเซลเซียส ที่จุดนี้กลีเซอรอลจะมีความเข้มข้นสูงขึ้นเป็นร้อยละ 73 และเมื่อลดอุณหภูมิลงไปก็จะไม่ทำให้น้ำแข็งก่อตัวเป็นผลึกน้ำแข็งอีกเลย ขณะที่สารละลายที่มีความเข้มข้นและความหนืดสูงมากและการเคลื่อนที่ของโมเลกุลน้ำจะลดน้อยลงมากจนกระทั่งทำให้น้ำที่เหลืออยู่ไม่สามารถกลายเป็น้ำแข็งได้ (unfreezable, UFW) โดยจะอยู่สถานะอะมอฟัสของระหว่างกลีเซอรอลและโมเลกุลของน้ำแข็ง รูปที่ 2.6 แผนภาพแสดงความเข้มข้นเริ่มต้นของสารซึ่งมีบางส่วนของสารที่จะเป็นน้ำแข็ง เป็นน้ำ และกลีเซอรอลที่ไม่แข็งตัวที่อุณหภูมิแช่แข็งที่แท้จริงที่ใช้ภายใต้สภาวะที่สมดุล (Oetjen และ Haseley, 2004)



รูปที่ 2.6 อัตราการเกิดน้ำแข็ง น้ำ และสารที่ถูกละลายได้ในสภาวะสมดุลของสารละลายกลีเซอรอลและน้ำซึ่งเป็นฟังก์ชันของความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่อุณหภูมิของการแช่แข็งต่างกันระหว่าง -5 และ -50 องศาเซลเซียส

ที่มา : Luyet, 1969

จากภาพเมื่อนำสารละลายกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 40 มาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่สมดุลพบว่าจะมีน้ำแข็งร้อยละ 32 น้ำร้อยละ 30 กลีเซอรอลร้อยละ 38 เส้นกราฟของ UFW ได้แสดงถึงอุณหภูมิที่ทำให้กลีเซอรอลมีความเข้มข้นที่สูงขึ้นมากจนกระทั่งน้ำไม่สามารถกลายเป็น้ำแข็งได้อีกต่อไปเนื่องจากโมเลกุลของน้ำไม่สามารถเคลื่อนที่ได้

ขณะที่สารละลายของกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 เมื่อทำให้อุณหภูมิเย็นลงจนถึง -50 องศาเซลเซียส พบว่ามีน้ำแข็งร้อยละ 70 ส่วนของ UFW ร้อยละ 10 และกลีเซอรอลร้อยละ

20 ขณะที่อุณหภูมิ -58 องศาเซลเซียส กลีเซอรอลมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 72 และ UFW เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 27 (Oetjen และ Haseley, 2004)

ข้อเท็จจริงของการที่น้ำไม่สามารถแข็งตัวกลายเป็นผลึกน้ำแข็งในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงและข้อเท็จจริงที่โมเลกุลของน้ำไม่สามารถเคลื่อนที่ได้อีกในสภาพที่สารมีความเข้มข้นสูงมากนั้นมีความสำคัญในระหว่างการแช่แข็งของสารชีวภาพ (biological substances) ดังตารางที่ 2.3 และ 2.4 ได้แสดงการเกิดผลึกน้ำแข็งในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดและสารป้องกันความเย็น

จากความรู้ที่ประกอบกับผลที่ได้จากกระบวนการแช่แข็งอย่างรวดเร็วทำให้ได้ทฤษฎีที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งผลิตภัณฑ์ให้อยู่ในสถานะของแข็งในรูปของอะมอร์ฟัส (solid amorphous state) ถ้าความเร็วของการแช่แข็งน้อยกว่าความเร็วที่ต้องการสำหรับการเกิดเป็นผลึกน้ำแข็งในสภาพใสคล้ายแก้ว (vitrification) แต่ถ้าความเร็วในการแช่แข็งนี้สูงพอที่จะหลีกเลี่ยงการเกิดสภาพสมดุลของผสมของอะมอร์ฟัส (amorphous mixture) ซึ่งเป็นผลให้เกิดผลึกน้ำแข็งรูป 6 เหลี่ยม (hexagonal ice) ซึ่งเป็นส่วนผสมของของแข็งที่เข้มข้นกับน้ำที่ไม่แข็งตัว การเติมสารผสมมีอิทธิพลต่อการทำให้เย็นและการเกิดการแข็งตัวในกระบวนการเท่านั้นแต่ยังอาจจำเป็นต่อการที่จะได้มาซึ่งวัตถุประสงค์อื่นๆ ได้แก่ ทำให้เกิดโครงสร้างที่คงตัวถ้าปริมาณของของแข็งนั้นน้อยมาก เช่น ในสารละลายที่มีความเข้มข้นน้อยกว่าร้อยละ 3 ช่วยปรับค่าพีเอชให้เหมาะสม (มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์) เพื่อหลีกเลี่ยงหรือชักนำการเกิดผลึกน้ำแข็ง เพื่อป้องกันส่วนประกอบที่สำคัญของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการแช่แข็ง เช่น การใช้สารป้องกันความเย็น cryoprotectants และเพื่อลดการเปลี่ยนแปลงของส่วนประกอบที่สำคัญของผลิตภัณฑ์ในระหว่างเก็บรักษา เช่นการเกิด unfolding หรือ aggregation ของโปรตีน (Oetjen และ Haseley, 2004)

2.6.1.3 ผลของการแช่แข็งต่อเซลล์ของแบคทีเรีย

ผลของการแช่แข็งต่อเซลล์ของแบคทีเรีย ในปี ค.ศ. 1968 Meryman ได้เสนอความคิดเกี่ยวกับปริมาตรของเซลล์ที่น้อยที่สุดและสมมติฐานในระหว่างการแช่แข็งเซลล์ซึ่งทำให้เซลล์ได้รับอันตรายเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นแรกการที่น้ำแพร่จากเซลล์ออกสู่ภายนอก สารละลายภายในเซลล์จะมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามปริมาณของน้ำบางส่วนจะถูกดึงออกจากเซลล์จนกระทั่งปริมาตรของเซลล์ลดลงมากที่สุดจนเหลือปริมาตรเซลล์ต่ำสุดกระทั่งไม่มีการดึงน้ำออกจากโมเลกุลของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนที่มีความสำคัญของโครงสร้างเซลล์ การสูญเสียน้ำเช่นนี้นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้

De Antoni และคณะ (1989) แสดงให้เห็นว่าการเติมทรีฮาโลสระหว่างที่มีการแช่แข็งและทำให้ละลายในเชื้อ *L. bulgaricus* 2 สายพันธุ์ ช่วยปรับปรุงการอยู่รอดของเชื้อ โดยการทดลองนี้ได้แช่แข็งตัวอย่าง (1 มิลลิลิตร) โดยลดอุณหภูมิลงในอัตรา 18 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ -60 องศาเซลเซียส และถูกทำให้ละลายจนถึงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเพิ่มอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสต่อนาที สารละลายที่ใช้ประกอบด้วย น้ำกลั่น อาหารเลี้ยงเชื้อ และนมร้อยละ 10 ที่มี

ทรีฮาโลส และไม่มีทรีฮาโลส ผลจากการแช่แข็งและการละลาย 3 ครั้ง พบว่าในสารละลายที่ประกอบด้วยนมเพียงอย่างเดียวมีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 24 หรือ 65 ขณะที่สารละลายที่ประกอบด้วยนมและทรีฮาโลส เชื่อสามารถอยู่รอดได้สูงขึ้นถึงร้อยละ 32 และ 100 ตามลำดับ De Antoni และคณะได้กล่าวถึงประสิทธิภาพของนมว่ามีความเกี่ยวข้องกับปริมาณของ Ca^{2+} ที่มีอยู่ โดยที่ทรีฮาโลสสามารถแทนที่โมเลกุลของน้ำใน ฟอสโฟลิปิดของเยื่อหุ้มเซลล์ อย่างไรก็ตามยังไม่มีผลการกล่าวถึงโมเลกุลน้ำตาลในนมว่ามีผลหรือไม่

2.6.2 การระเหิด (Sublimation)

การระเหิด คือการกลายเป็นไอของน้ำแข็งโดยไม่ผ่านสภาวะของเหลว การระเหิดไม่เกี่ยวข้องกับน้ำที่ไม่แข็งตัว (unfrozen water) ที่ยึดติดกับของแข็ง ผลึกน้ำแข็งต้องการพลังงานคือความร้อนในการเปลี่ยนเป็นไอ ซึ่งไอน้ำจะถูกนำออกจากของแข็งโดยใช้ปั๊มดูดอากาศดูดออก โดยการระเหิดจะเกิดขึ้นที่ผิวของผลิตภัณฑ์ และเมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่งบางส่วนของผลิตภัณฑ์ที่ได้จะแห้ง (dry layer) และยังมีเหลือส่วนที่เยือกแข็ง (frozen layer) โดยระหว่างชั้นของทั้งสองนี้เรียกว่า interface (สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2544)

2.6.3 การคาย (Desorption)

การคายจะเกิดขึ้นหลังจากผลึกน้ำแข็งระเหิดออกจากผลิตภัณฑ์แล้ว ส่วนที่เหลือจะเป็นสารละลายเข้มข้นอยู่กับส่วน dry layer ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำอยู่ 25 ถึง 30 กรัมต่อ 100 กรัมของแข็ง โดยของแข็งจะยึดติดกันแน่นและไม่เยือกแข็งและน้ำที่ยึดติดแน่นกับผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า sorbed water ซึ่งน้ำในส่วนนี้จะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็นไอและถูกนำออกไปโดยการคาย ซึ่งเป็นส่วนสุดท้ายของการทำให้แห้ง โดยความคงที่ของโครงสร้างหรือเคมีของผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นจะขึ้นอยู่กับน้ำที่ยึดอยู่ (สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2544)

2.6.4 ผลของสารป้องกันเซลล์ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย

แบคทีเรียจะทนต่อความเย็นได้มากขึ้นเป็นพิเศษเมื่อใส่สารป้องกันเซลล์ลงในสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียที่จะทำการแช่แข็ง (Hubálek. 2003) โดยสารป้องกันเซลล์ที่นิยมใช้ในเชื้อแบคทีเรียได้แก่

2.6.4.1 แซคคาไรด์และโพลีแซคคาไรด์ (Saccharide and Polysaccharide)

แซคคาไรด์ โดยปกติจะใช้สำหรับป้องกันเซลล์ให้กับแบคทีเรียขณะแช่แข็ง การทำให้แห้งและการเก็บรักษา กลไกการป้องกันเซลล์โดยแซคคาไรด์ยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างแน่ชัดแต่ส่วนมากน่าจะเกิดจากปัจจัยร่วมต่างๆ (Crowe และคณะ. 1996) ดังนั้นได้มีการเสนอให้มีการใช้แซคคาไรด์เพื่อใช้ป้องกันทั้งเยื่อหุ้มเซลล์และโปรตีน cytosolic ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์ที่สำคัญที่มี phospholipids และป้องกันการเกิดผลึก และสภาวะการเปลี่ยนแปลงขณะสูญเสียน้ำ (dehydration) จากอุณหภูมิที่ค่อยๆ

ลดต่ำลง (Bendas และคณะ. 1996) สารประกอบแซคคาไรด์และโพลีแซคคาไรด์ที่ใช้เป็นสารป้องกันเซลล์จากความเย็นได้แก่

ก) กลูโคส (glucose)

กลูโคสใช้เป็นสารป้องกันเซลล์ให้กับจุลินทรีย์โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 1-18 (เฉลี่ยร้อยละ 4) ทำให้การมีชีวิตรอดสูงมากขึ้นหลังจากทำการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียร่วมกับสารละลายกลูโคสที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Keith. 1913)

ข) ซูโครส (sucrose)

ซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 1-68 (เฉลี่ยร้อยละ 10) เป็นสารที่นิยมใช้ป้องกันเซลล์จากความเย็นให้กับจุลินทรีย์ โดยจากการศึกษาการอยู่รอดของเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Proteus* และ *Micrococcus* spp. โดยนำเชื้อเหล่านี้มาแช่แข็งร่วมกับสารละลายซูโครสเข้มข้นร้อยละ 10 พบว่าเชื้อสามารถอยู่รอดจากการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียสได้นานมากขึ้น (Keith. 1913) และพบว่าสารละลายซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 สามารถป้องกันการสูญเสียของกลีเซอรอลในเชื้อ *L. lactis* ssp. *lactis* ได้ดีกว่ากลีเซอรอลเข้มข้นร้อยละ 10 เมื่อเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -20 ถึง -70 องศาเซลเซียส (Chavarri และคณะ. 1988) นอกจากนี้ Carvalho และคณะ (2003) ได้ทำการทดสอบคุณสมบัติของซูโครสเมื่อเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีความสัมพันธ์ที่คล้ายคลึงกับทรีฮาโลส คือสามารถป้องกันเซลล์ของเชื้อ *L. bulgaricus* จากการบาดเจ็บเนื่องจากความเย็นในขณะที่ทำการเก็บรักษาได้

ค) แลคโตส (lactose)

แลคโตสที่ความเข้มข้นร้อยละ 1-10 (เฉลี่ยร้อยละ 8) ใช้เป็นสารป้องกันเซลล์ได้ดีกว่ากลีเซอรอล ในกลีเซอรอลในเชื้อ *L. lactis* ssp. *lactis* เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -20 ถึง -70 องศาเซลเซียส (Chavarri และคณะ. 1988) นอกจากนี้แลคโตสยังมีผลต่อการแช่แข็งของเชื้อ *E. coli* (Doebbler. 1966), *Lactobacillus delbrueckii* (Panoff และคณะ. 2000) และ *Saccharomyces cerevisiae* แต่ให้ผลน้อยมากในเชื้อ *Streptomyces tenebrarius* (Daily และ Higgens. 1973) และไร้ประสิทธิภาพในการป้องกันเซลล์จากความเย็นให้กับเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย และ *Spirulina platensis* (Takano และคณะ. 1973)

ง) ทรีฮาโลส (trehalose)

ทรีฮาโลสใช้เป็นสารป้องกันเซลล์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5-19 (เฉลี่ยร้อยละ 10) โดยใช้กับเชื้อไวรัส *S. cerevisiae* ไชโครฟิลิกชีสต์ *L. bulgaricus* และ ไมคอไรซอลฟังไจ (Coutinho และคณะ. 1988 ; Diniz-Mendes และคณะ. 1999 ; Breierová. 1994) นอกจากนี้ Crowe และคณะ. (1996) ได้รายงานว่ ทรีฮาโลส ให้ผลในการป้องกันเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์จากการทำแห้งได้ดีกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ ในขณะที่ Leslie และคณะ. (1995) ได้ทดลองใช้ทรีฮาโลสช่วยป้องกันเซลล์ของ *E. coli* และ *Bacillus thuringiensis* ในระหว่างการแช่แข็งและเก็บรักษา พบว่าทำให้อัตราการบาดเจ็บของเชื้อทั้งสองลดลง

2.6.4.2 โพลีอัลกอฮอล์ (polyalcohols)

โพลีอัลกอฮอล์ที่นิยมใช้เป็นสารป้องกันเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากความเย็นได้แก่

ก) ซอร์บิทอล (sorbitol)

Carvalho และคณะ (2003) ได้ทำการทดลองพบว่าซอร์บิทอลช่วยป้องกันเซลล์ของเชื้อ *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecalis* และ *Enterococcus durans* ได้ดีในระหว่างทำการเก็บรักษา นอกจากนี้ Fonseca และคณะ (1996) ได้ศึกษาผลของซอร์บิทอลที่มีต่อเชื้อ *S. thermophilus* พบว่าซอร์บิทอลช่วยให้จุลินทรีย์อยู่รอดในระหว่างเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง แต่กิจกรรมและความสามารถของเชื้อหลังการแช่แข็งนั้นพบว่าลดลง การป้องกันการสูญเสียของเซลล์โดยใช้ซอร์บิทอลขึ้นอยู่กับกลไกพื้นฐานดังนี้

1. ป้องกันการถูกทำลายที่เนื้อเยื่อเซลล์โดยผ่านทางกรทำปฏิกิริยาร่วมกันของซอร์บิทอลและเยื่อหุ้มเซลล์ และป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่มีคุณสมบัติที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน (anti-oxidant) (Linders และคณะ. 1997)

2. รักษาความเสถียรโครงสร้างของโปรตีนและรักษารูปประกอบของโปรตีนที่มีหน้าที่ซับซ้อนร่วมกัน (Wisselink และคณะ. 2002)

3. รักษาความดันออสโมติก (Yoo และ Lee. 1993)

2.6.4.3 เอไมด์และไอไมด์ (Amides and imides)

เอไมด์และไอไมด์ชนิดที่ใช้เป็นสารป้องกันเซลล์ให้กับแบคทีเรียกรดแลคติกได้แก่

ก) อะซิทาไมด์ (Acetamides)

อะซิทาไมด์ ไดเมทิลอะซิทาไมด์ (Dimethylacetamide) และไดเมทิลฟอมาไมด์ (Dimethylformamide) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 พบว่าสามารถป้องกันเซลล์ให้กับเชื้อ *E. coli* จากความเย็นได้ดีเช่นเดียวกับ กลีเซอรอล และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ส่วนฟอมาไมด์ (น้ำหนักโมเลกุล 45.04) พบว่าให้ผลในการปกป้องเชื้อได้น้อยมาก (Nash และคณะ. 1963) นอกจากนี้ Lovelock (1954) ได้ทดลองใช้อะเซทาไมด์ (Acetamides) เป็นสารป้องกันเซลล์จากความเย็น โดยการเติมอะซิทาไมด์ในหางนมในปริมาณร้อยละ 0.5 หรือ 2.0 ให้กับเชื้อ *L. lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* และ *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* (Gibson และคณะ. 1966) พบว่าเชื้อสามารถต้านทานความเย็นได้ดีขึ้น

ข) ซัคซินิไมด์ (Succinimide)

ซัคซินิไมด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.3 สามารถป้องกันการบาดเจ็บของเชื้อ *Lactobacillus leichmannii* ที่อุณหภูมิต่ำได้ดี (Johannsen. 1972)

2.6.4.4 ไดเมทิลซัลโฟไซด์ (Me_2SO)

Panoff และคณะ (2000) ได้ทำการทดสอบผลของสารที่ใช้ป้องกันเซลล์ชนิดต่างๆ โดยการเติมไดเมทิลซัลโฟไซด์ (Me_2SO) กลีเซอรอล แลคโตส ซูโครส และทรีฮาโลสลงในสารแขวนลอยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CPI 101027T จากนั้นทำการแช่แข็งเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และทำให้ละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าไดเมทิลซัลโฟไซด์ช่วยให้เชื้ออยู่รอดได้ดีกว่า กลีเซอรอล แลคโตส ซูโครส และทรีฮาโลส

2.6.4.5 สารประกอบเชิงซ้อน (Complex compound)

ก) ยีสต์สกัด (Yeast extract)

ยีสต์สกัดที่ประกอบด้วย ไนโตรเจนร้อยละ 11 ฟอสเฟตร้อยละ 3 เกลือร้อยละ 12 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และวิตามิน ได้แก่ กรดไนโคตินิก ไรโบฟลาวิน และสารประกอบอื่นๆ โดยยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25-5 (เฉลี่ยร้อยละ 5) พบว่าให้ผลดีในการป้องกันเซลล์เมื่อเผชิญกับอุณหภูมิที่ต่ำเช่นเดียวกับกลีเซอรอลหรือไดเมทิลซัลโฟไซด์ และดีกว่าสารป้องกันเซลล์ชนิดอื่นๆ เช่น ซูโครส เคซีน อัลบูมินในไข่ (egg albumin) กลูตาเมต และน้ำแอปเปิ้ล ซึ่งใช้เป็นสารป้องกันเซลล์ให้กับเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (Baumann และ Reinbold, 1966 ; Johannsen, 1972 ; Speck และ Cowman, 1970)

ข) มอลต์สกัด (Malt extract)

มอลต์สกัดที่นิยมใช้จะประกอบด้วย มอลโตสร้อยละ 52 เดกซ์ทรินร้อยละ 15 คาร์โบไฮเดรตอื่นๆร้อยละ 6 และโปรตีนร้อยละ 5 โดยมอลต์สกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-20 (เฉลี่ยร้อยละ 2.5) น้ำหนักต่อน้ำหนัก ใช้ป้องกันเซลล์จากความเย็นให้กับแบคทีเรียกรดแลคติกที่อยู่ในอาหาร hydroxyethyl starch ได้ดี (Johannsen, 1972)

ค) หางนม (Skim milk)

ในการผลิตกล้าเชื้อสำหรับผลิตภัณฑ์นมโดยปกติจะถูกทำให้อยู่ในรูปการทำแห้งแบบเยือกแข็งเพื่อให้การเก็บรักษาได้ยาวนาน โดยหางนมเป็นสารป้องกันเซลล์พื้นฐานที่ได้ทดสอบแล้วพบว่าให้ผลดีสำหรับการเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (Champagne และคณะ, 1991) ในปี 1985 Ivanova และ Dzhevizov ได้ทำการเปรียบเทียบผลของการเติมหางนม ยีสต์ บรอตโมโนโซเดียม กลูตาเมต และซูโครส ต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Streptococcus* ซึ่งใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักพบว่าหางนมให้ผลดีที่สุด รองลงมาได้แก่ โมโนโซเดียมกลูตาเมต เดกสเตรนและซูโครสตามลำดับ

2.6.5 กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสำหรับผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาในปัจจุบันนอกจากผลิตภัณฑ์ที่จะต้องปราศจากกลิ่นและรสชาติที่ไม่พึงประสงค์แล้ว คุณค่าและประโยชน์ของอาหารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ปลาทั้งหมดที่ได้ก็

สำคัญอย่างยิ่ง ด้วยเหตุนี้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจึงถูกนำมาใช้ในกระบวนการหมักเพื่อยกระดับผลิตภัณฑ์ปลาไปสู่อุตสาหกรรม (Jeppesen และ Huss. 1993)

Gelman และคณะ (2001) ได้ทำการทดลองหมักปลาเฮอริง (herring) ร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้จากปลาเฮอริงสด เมื่อหมักปลาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 สัปดาห์ พบว่าเชื้อ *L. mesenteroides* และเชื้อ *L. plantarum* แบคทีเรียยู่รอดสูงทำให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วอีกทั้งเกิดกลิ่นและรสชาติเป็นที่น่าพอใจ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อ *L. plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* ที่นำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ซอสปลาหมักและอาหารสัตว์สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินและสารชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกับแบคทีเรียโพรไบโอติก (Nambudiry. 1986 ; Yoon และคณะ. 1997 ; Helander และคณะ. 1997 ; Suma และคณะ. 1998)

ในประเทศไทยมีผลิตภัณฑ์ปลาหมักหลายชนิดด้วยกัน ซึ่งการผลิตในการค้าขายยังคงใช้เชื้อจากธรรมชาติ ซึ่งได้มีการทดลองหมักปลาด้วยเชื้อบริสุทธิ์ เช่น การเติมเชื้อ *Pediococcus cerevisiae* จะทำให้ปลาหมักเป็นเวลา 5 วัน มีค่าพีเอชและปริมาณกรดใกล้เคียงกับปลาหมักโดยวิธีธรรมชาติเป็นเวลา 10 วัน นอกจากนี้การเติม *P. cerevisiae* หรือ *L. brevis* พบว่าทำให้หมักปลาเร็วขึ้น (นาถสุดา วิสวงษ์. 2522) สำหรับปลา กุ้งจ่อมและหอยแมลงภู่ดองนั้นพบว่าการหมักโดยใช้เชื้อ *Pediococcus halophilus* สามารถลดระยะเวลาหมักและได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นรสไม่ต่างจากการหมักด้วยเชื้อจากธรรมชาติ (จินดารัตน์ นิติวฒนพงษ์. 2522)

2.6.6 การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อยับยั้งและการทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค

สารที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่างๆ มีดังนี้

1. เกิดจากกรดแลคติก (Amster และ Jost. 1980)
2. ผลร่วมระหว่างกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Abdel-Bar และ Harris. 1984 ; Gilland และ Speck. 1977)

3. สารอื่นๆนอกเหนือจากกรดแลคติกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งได้แก่ สาร Nisin และ Diplococcin ที่ผลิตจากเชื้อ *Streptococcus* spp. (Hirsch. 1951) สาร Lactolin จากเชื้อ *L. plantarum* (Kearney และคณะ. 1990) สาร Acidolin, Lactocidin และ Acidophilin จากเชื้อ *L. acidophilus* (Hamdan และ Mikolajcik. 1975) และสาร Buigarican จากเชื้อ *L. bulgaricus* (Reddy และ Shahani. 1971) โดยสารที่ผลิตขึ้นจากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้จะมีฤทธิ์ยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์อื่นๆ

อรนุช อุดรภิชาติ. (2530) ได้ทดสอบ *Pediococcus* spp. 78 สายพันธุ์ และ *Lactobacillus* spp. 34 สายพันธุ์ ในการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* 8 ซีโรไทป์ พบว่าแต่ละสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* ได้แตกต่างกัน และเมื่อคัดเลือก *Pediococcus* sp. และ *Lactobacillus* sp. ที่มีประสิทธิภาพดีนำมาผลิตเป็นกถาผงและใช้เป็นกถาหมักแทนที่เดิม *Salmonella* พบว่าการใช้กล้าเชื้อทั้งสองผสมกันจะให้ผลที่ดีทั้งในด้านการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* และคุณภาพของผลิตภัณฑ์

2.6.7 ประโยชน์ของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมีผลดีต่อการแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หลายชนิดด้วยกัน ได้แก่

1. ช่วยลดระยะเวลาการหมัก เช่นการใช้กล้า ACCEL หมักไส้กรอกหลายชนิดจะลดระยะเวลาการหมักที่ใช้อยู่เดิมประมาณ 150 ชั่วโมง ให้เหลือเพียง 32-48 ชั่วโมง (Niinivaara และคณะ. 1964)

2. สามารถควบคุมการหมักและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ง่ายขึ้น

3. ลดการสะสมของไนโตรซามีนอันเป็นสารก่อมะเร็ง กล่าวคือการเติมกล้าเชื้อทำให้การผลิตกรดเป็นไปอย่างรวดเร็วมีผลให้ไนโตรที่่เกิดจากการรีดิวส์ไนเตรทหรือที่เติมลงในผลิตภัณฑ์สลายเป็นไนตรัสออกไซด์ จึงทำให้ปริมาณการสะสมของไนโตรที่ลดลง การเกิดไนโตรซามีนจึงลดลงตามด้วย (Doods และ Collins-Thomson. 1984)

4. กล้าเชื้อหลายชนิด เช่น *Pediococcus* spp. และ *Micrococcus* spp. ผลิตเอนไซม์ซูโดแคตาเลส (pseudocatalase) ซึ่งมีปฏิกิริยาเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำและออกซิเจน เป็นการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้หมดไป ซึ่งสารเหล่านี้มีผลทำให้สีของผลิตภัณฑ์ซีดไม่น่ารับประทาน

5. ลดระดับฮีสตามีนในอาหารหมัก การหมักโดยใช้เชื้อจากธรรมชาติโดยปกติในอาหารหมักจะพบจุลินทรีย์ปนกันอยู่หลายชนิด จุลินทรีย์ชนิดที่ผลิตเอนไซม์ฮีสตามีนดีคาร์บอกซิเลสจะเปลี่ยนฮีสตามีนเป็นฮีสตามีน การเติมกล้าเชื้อจะทำให้การหมักเกิดขึ้นรวดเร็วจึงเป็นการยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์เหล่านั้น

6. ยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรค ซึ่งปัจจุบันเป็นวัตถุประสงค์หลักข้อหนึ่งของ การใช้กล้าเชื้อในการแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (นภา โล่ห์ทอง. 2534)