บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

แบคทีเรียเป็นแหล่งของ antimicrobial peptides แบคเทอริโอซินเป็นแหล่งของเปปไทด์ที่ต่อต้านจุลินทรีย์ซึ่งใช้ประโยชน์สำหรับการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร แบคเทอริโอซินประกอบด้วยกลุ่มของสารต่างชนิดกัน (heterogenous group) ถึงแม้ว่าจะประกอบด้วยสารที่มีความแตกต่างกันทางเคมีแต่คุณสมบัติหนึ่งที่เป็นจุดเด่นของแบคเทอริโอซินก็คือมีโปรตีนเป็นส่วนสำคัญ การทดสอบความไวต่อเอนไซม์ที่จำเพาะ (โปรติเอสและไลเปส เป็นต้น) ถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกองค์ประกอบทางเคมีของโมเลกุลสารแบคเทอริโอซิน จากหลักการนี้มีผู้รายงานว่า streptocin STH อาจเป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยหมู่ของโปรตีน ไขมันและฟอสเฟตที่สำคัญ การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารแบคเทอริโอซินบ่งชี้ได้ว่าสารแบคเทอริโอซินบางชนิดประกอบด้วยโปรตีนอย่างง่าย อย่างไรก็ตามจากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ทำให้ทราบว่าแบคเทอริโอซินของ Staphylococcal, Clostridial และ *Lactobacillus* เป็นโมเลกุลที่ค่อนข้างซับซ้อนซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของไขมันและคาร์โบไฮเดรตนอกเหนือจากโปรตีนที่มีอยู่ในโมเลกุลสำหรับองค์ประกอบของ staphylococcin 414 คล้ายกับองค์ประกอบโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ของ *Staphylococcus* จากการวิเคราะห์สาร colicins พบว่ามีส่วนประกอบของแอคทีฟโปรตีนที่ซับซ้อนซึ่งมีไลโปพอลิแซคคาไลน์แอนติเจน (lipopolysaccharide antigen) อยู่ที่บริเวณผิวเซลล์ของแบคทีเรียที่สร้างสาร colicins นั้น โมเลกุลของสาร butyricin 7423 และ perfringocin 11105 ประกอบด้วยส่วนที่เป็นแอมพิฟีลิกโปรตีน (amphiphilic protein) และคาดการณ์ว่ามีส่วนที่ไม่ชอบน้ำอยู่ด้วยซึ่งอาจช่วยให้การกระทำกับเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีความไวต่อสารแบคเทอริโอซินเกิดได้ง่ายขึ้น (Tagg และคณะ. 1976)

สารที่จัดเป็นแบคเทอริโอซินประกอบด้วย โปรตีนขนาดต่างๆ กัน อยู่ในช่วงตั้งแต่ขนาดโมเลกุลเล็กอย่างง่ายและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น streptococcin A–FF22 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 8,000 ดาลตัน จนกระทั่งถึงขนาดโมเลกุลใหญ่ที่ซับซ้อนมีน้ำหนักโมเลกุลมากถึง 10^6 แบคเทอริโอซินที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำโดยทั่วไปแล้วจะมีความไวต่อเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) สูงแต่มีความไวต่อความร้อนต่ำ นักวิจัยได้เคยตรวจสอบแบคเทอริโอซินในกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและพยายามที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของสารแบคเทอริโอซินกับโครงสร้างที่เห็นภายใต้กล้อง ซึ่งคุณลักษณะของสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรีย

แกรมบวกที่พบได้บ่อยคือมีโครงสร้างทางกายภาพ 2 แบบหรือมากกว่านั้น ซึ่งโมเลกุลของสารแบคเทอริโอซินที่แตกต่างกันในแบคเทอริโอซินเหล่านี้ ดูเหมือนว่าจะมีความสมดุลในแง่ของสัดส่วนของโมเลกุลที่มีขนาดเล็กและโมเลกุลขนาดใหญ่ที่รวมกันอยู่โดยค่าพีเอชและความแรงของไอออน (ionic strength) จะมีอิทธิพลต่อแบคเทอริโอซินเหล่านี้ (Tagg และคณะ, 1976)

ความคงตัวของสารแบคเทอริโอซินจะลดลงอย่างมาก เมื่อสารแบคเทอริโอซินถูกทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นและพบว่าการเติม bovine serum albumin จะช่วยป้องกันสารแบคเทอริโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากการถูกยับยั้งการทำงาน (inactivation) ตัวอย่างสารแบคเทอริโอซิน เช่น staphylococcin 1580 และสารปฏิชีวนะที่เกิดจาก *Staphylococcus aureus* จะมีความไวสูงต่อการเสียสภาพทางกล (mechanical denaturation) (Tagg และคณะ, 1976)

ความคงตัวของสารแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมาก โดยความไวของสารแบคเทอริโอซินต่อการถูกยับยั้งการทำงานเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชสารแบคเทอริโอซินและ bacteriocin-like substrate ส่วนใหญ่สามารถทนกรดได้สูงกว่าด่าง ซึ่งหลักเกณฑ์ของความคงตัวต่ออุณหภูมิของสารแบคเทอริโอซินสามารถอธิบายได้ยากเนื่องจากขึ้นอยู่กับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์และปัจจัยอื่นๆ เช่น พีเอช ความแรงของไอออนและการมีโมเลกุลที่ช่วยปกป้องแบคเทอริโอซินจากการเสียสภาพอยู่ด้วย (protective molecules) (Tagg และคณะ, 1976)

การจำแนกชนิดของแบคเทอริโอซิน (Classification of bacteriocins)

โดยทั่วไปแบคเทอริโอซินสามารถแบ่งได้เป็น 3-4 กลุ่ม ไนซิน (nisin) ค้นพบในปี ค.ศ. 1928 และซับทิลิน (subtilin) พบในปี ค.ศ. 1948 เป็นสารที่คล้ายไนซินต่างกันโดย 12 กรดอะมิโน ทั้งคู่จัดอยู่ใน Class I เรียกว่าเป็นแลนติไบโอติก (lantibiotics) การจำแนกแบคเทอริโอซินในปัจจุบันมีการปรับปรุง แสดงให้เห็นความเหมือนและความต่างซึ่งสังเกตได้ในโมเลกุลที่ค้นพบใหม่ Class I แบ่งย่อย เป็น Class Ia และ Class Ib โดยทั่วไปเปปไทด์ของ Class I มีกรดอะมิโน 19 ชนิดถึงมากกว่า 50 ชนิด แบคเทอริโอซิน Class I ถูกจัดจำแนกโดยอาศัยกรดอะมิโนที่ต่างออกไป (unusual amino acid) ตัวอย่างเช่น lanthioninie, methyl-lanthionine, dehydrobuthyrin Class Ia จะรวมถึงไนซินด้วย ประกอบด้วย cationic และ hydrophobic peptides ซึ่งทำให้เกิดลักษณะเป็นรูใน target membrane และมีโครงสร้างที่ยืดหยุ่นได้เมื่อเปรียบเทียบกับโครงร่างแข็งของ Class Ib bacteriocins ซึ่งเป็นเปปไทด์รูปกลม (globular peptides) (Cleveland และคณะ, 2001)

Class II ประกอบด้วยเปปไทด์สายสั้น ๆ ที่คงตัวต่อความร้อนและสามารถแบ่งย่อยได้เป็น Class IIa รวมถึงเปปไทด์ที่คล้าย pediocin ที่แอคทีฟกับเชื้อ *Listeria* ที่มีลำดับของกรดอะมิโนด้าน N-terminal ต่อกับ Tyr-Gly-Asn-Gly-Val และต่อกับ 2 cyteinnes ทำให้เกิด s-s brige ใน N-terminal ครึ่งหนึ่งของสายเปปไทด์แบคเทอริโอซิน ประกอบด้วยเปปไทด์ 2 สายที่ต่างกัน ประกอบกันจัดเป็น Class IIb สายเปปไทด์ 2 สายของแบคเทอริโอซินจำเป็นทั้งคู่ในการเกิดกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน ลำดับของกรดอะมิโนสายแรกของเปปไทด์นั้นแตกต่างกัน แม้ว่าแต่ละอันจะถูกกำกับไว้โดยยีนของตัวเองที่อยู่ใกล้เคียงกันแต่มีเพียงยีนเดียวซึ่งจำเป็นที่เป็นยีนภูมิคุ้มกัน แบคเทอริโอซิน Class IIc เริ่มแรกถูกเสนอขึ้นว่าถูกปล่อยโดย general sec-system และแบคเทอริโอซิน Class III เป็นแบคเทอริโอซินที่ไม่ทนความร้อน สำหรับแบคเทอริโอซิน Class III นี้ยังมีข้อมูลไม่มากนัก สำหรับแบคเทอริโอซิน Class ที่ 4 ได้ถูกเสนอว่าอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนกับสารโมเลกุลใหญ่อื่น ๆ (Cleveland และคณะ, 2001)

ประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินในอาหาร

ถึงแม้ว่าจากผลการทดลองในอาหารเหลวได้แสดงให้เห็นว่า แบคเทอริโอซินยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมายแต่ก็จะต้องทำการศึกษาในเชิงประยุกต์เพื่อยืนยันประสิทธิภาพในอาหาร การใช้ประโยชน์ของแบคเทอริโอซินโดยเฉพาะไนซินในอาหาร ได้มีการรายงานไว้แล้วว่าองค์ประกอบทางเคมีอาหารและกระบวนการทางกายภาพมีอิทธิพลต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน ตัวอย่างเช่น ไนซินสามารถละลายได้ดีที่พีเอช 2 มากกว่าพีเอช 8 ถึง 228 เท่า (Cleveland และคณะ, 2001)

การนำแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ไปใช้ในอาหาร

-ระบบการถนอมอาหารชีวภาพ (Biopreservation Systems)

ได้มีรายงานถึงการประเมินประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินเกี่ยวกับความสามารถในการเป็นตัวยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารและจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย แม้ว่าประสิทธิภาพของการยับยั้ง จุลินทรีย์จะถูกพิสูจน์แล้วใน synthetic media แต่ก็ยังไม่เป็นที่แน่นอนว่าแบคเทอริโอซินจะให้ผลแบบเดียวกันในอาหาร ไนซิน (nisin) เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่รู้จักกันดีที่สุดและเป็นที่ยอมรับในการนำมาใช้ในอาหาร ในสหรัฐอเมริกาได้มีการนำไนซินมาใช้ใน cheese spreads ที่ผ่านการพาสเจอไรส์เพื่อยับยั้งการเจริญของสปอร์ *Clostridium*

*botulinum*และใช้ในซินกันทั่วโลกในผลิตภัณฑ์ที่หลากหลายรวมถึงนมพาสเจอไรซ์นมปรุงแต่งและนมที่มีอายุการเก็บยาวนาน รวมทั้งเนยแข็งที่ผ่านการบ่มและเนยแข็งที่ผ่านการแปรรูป ผักกระป๋องและซุปกระป๋อง เมื่อเร็ว ๆ นี้มีการนำไนซินไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่เป็นที่ต้องการในไวน์และเบียร์ แต่การนำไนซินไปใช้ประโยชน์ในอาหารบางครั้งก็ถูกจำกัด เพราะว่าไนซินมีความสามารถในการละลายต่ำ ราคาแพง และมีความผันแปรในแง่ของความไวต่อแบคทีเรียเป้าหมายและปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น พีเอช โซเดียมคลอไรด์ อุณหภูมิ มีผลต่อกิจกรรมการทำงานของไนซิน (Muriana และ Luchansky, 1993) ตัวอย่างการใช้แบคเทอริโอซินในการถนอมอาหารแสดงดังตารางที่ 1 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงพยายามมุ่งไปสู่การผลิตแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ชนิดใหม่และจัดจำแนกแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกสำหรับการประยุกต์ใช้ในอาหาร

การเติมแบคเทอริโอซินลงในอาหาร

การเติมแบคเทอริโอซินลงในอาหารสามารถทำได้โดยเติมในรูปของแบคเทอริโอซินที่เตรียมได้หรือโดยการเติมเชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซินภายสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซิน ในกรณีแรกจะต้องมีการเพาะเลี้ยงเชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซินในถังหมักในระดับอุตสาหกรรมแล้วเก็บเกี่ยวแบค เทอริโอซินที่ผลิตได้ ทำให้แบคเทอริโอซินเข้มข้นที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ปัจจุบันมีแบคเทอริโอซินเพียงชนิดเดียวที่จดลิขสิทธิ์เป็นสารถนอมอาหาร โดยอาจเติมแบคเทอริโอซินลงในอาหารในรูปของ

1) <u>raw concentrates</u> ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซินในสับสเตรทที่เป็นอาหาร (food-grade substrate) เช่น นมหรือ เวย์ ซึ่งจะทำให้ได้ food additives หรือ food ingredients ที่ใช้ได้อย่างปลอดภัยตามและถูกกฎหมาย องค์ประกอบของสารที่ผลิตได้อาจทำหน้าที่อื่นด้วยเช่น ช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนหรือทำให้อาหารข้น และอาจมีสารเมแทบอไลซ์อื่นจากจุลินทรีย์เช่น กรดแลคติกซึ่งทำหน้าช่วยเสริมการยับยั้ง concentrates ที่มีจำหน่ายแล้วเช่น ALTA™ 2341 หรือ Microgard™ ซึ่งเป็น grade A skim milk ที่ผ่านการหมักโดย *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* แล้วผ่านการพาสเจอร์ไรส์ ผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ได้ผ่านการยอมรับโดย FDA ให้ใช้ได้ในอาหาร เช่นใน cottage cheese และ fruit-flavoured yogurt (Salih และคณะ, 1990)

2) immobilized preparations แบคเทอริโอซินที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนหรือ concentrated cultured broth จะถูกจับไว้โดยตัวพา (carrier) ตัวพานี้จะทำหน้าที่เป็นแหล่งหรือตัวกระจายโมเลกุลของแบคเทอริโอซินที่ถูกทำให้เข้มข้นในอาหารเพื่อการกระจายตัวอย่างทั่วถึง ตัวพานี้อาจช่วยป้องการแบค เทอริโอซินจากการถูกทำให้เสียสภาพโดยองค์ประกอบในอาหารและเอนไซม์ จากการศึกษาวิจัยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวกับในอาหารมัก พบว่า แบคเทอริโอซินในอาหารมีประสิทธิภาพต่ำกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาก บางครั้งจะต้องเติมแบคเทอริโอซินในระดับความเข้มข้นสูงกว่าอย่างน้อย 10 เท่าเพื่อให้ได้ผลการยับยั้งเท่ากัน

ถึงแม้ว่าจะมีการนำแบคเทอริโอซินมาใช้ในอาหารหลายชนิดแต่ก็ไม่ควรถนอมอาหารไว้ด้วย แบค เทอริโอซินอย่างเดียวเท่านั้น ควรใช้แบคเทอริโอซินควบคู่ไปกับการควบคุมสภาวะต่างๆ แม้ว่าแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่แยกได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องกับอาหาร แต่ก็อาจไม่มีประสิทธิภาพในอาหารทุกชนิดอย่างไรก็ตามแบคเทอริโอซินหลายชนิดมีศักยภาพโดยสามารถนำมาใช้ได้ในอาหาร เมื่อมีการควบคุมภายใต้สภาวะต่าง ๆ อย่างเหมาะสมตัวอย่างสำคัญที่สนใจคือการใช้ไนซินในผลิตภัณฑ์เนื้อปกติใช้ไนเตรตในการป้องกันการเจริญของ *Clostridium* ในเนื้อสัตว์ แต่มีข้อจำกัดด้านความปลอดภัยในแง่ของการมีไนไตรต์จึงทำให้อุตสาหกรรมอาหารพยายามที่จะหาวิธีอื่นมาทดแทน เช่น การนำไนซินมาใช้ หรือใช้ไนซินร่วมกับไนเตรตที่ระดับความเข้มข้นต่ำลง สามารถป้องกันการเจริญของ *Clostridium* ได้ (Cleveland และคณะ, 2001)