

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ (non-motile) ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส (catalase negative) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า มีทั้งรูปร่างแท่งและรูปร่างกลม การจัดเรียงกลุ่มแบคทีเรียแลคติกในสกุลต่างๆ ขึ้นอยู่กับรูปร่างลักษณะรูปแบบของการหมักน้ำตาลกลูโคส การใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ และการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ การผลิตเกลือแลคติกเชื้อเจริญในที่ที่มีความเข้มข้นสูง และการทนต่อกรดหรือด่าง (Wood and Holzapfel, 1997) แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ พบในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะในนม ผัก และผลไม้ ส่วนมากแบคทีเรียนี้เป็นแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ แต่ในสภาวะที่มีอากาศก็ไม่ตาย แบคทีเรียแลคติกขาดสารไซโตโครม (cytochromes) และพอร์ไฟลิน (porphyrins) จึงไม่ให้เอนไซม์แคตาเลสและออกซิเดส (สุมณฑา, 2545)

แบคทีเรียแลคติกสร้างพลังงานจากการหมักคาร์โบไฮเดรต เกิดกรดแลคติกจากปฏิกิริยา 2 ทาง คือ วิธีทางที่ได้แลคเตทเพียงอย่างเดียว เรียกว่า โฮโมเฟออร์เมนเตทีฟ (homofermentative) และวิธีทางที่ได้แลคเตทร่วมกับสารอื่นในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เรียกว่า เฮเทอโรเฟออร์เมนเตทีฟ (heterofermentative) (สมใจ, 2537)

1) โฮโมเฟออร์เมนเตทีฟแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณร้อยละ 85 หรือมากกว่าจากการหมักคาร์โบไฮเดรต ซึ่งพวกนี้จะหมักน้ำตาลกลูโคส 1 โมล เป็นกรดแลคติก 1.8 โมล และได้กรดอะซิติก เอทานอล และ คาร์บอนไดออกไซด์เล็กน้อย

2) เฮเทอโรเฟออร์เมนเตทีฟ เป็นแบคทีเรียที่หมักคาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาลกลูโคส ให้กรดแลคติก ประมาณ ร้อยละ 50 นอกนั้นให้ กรดอะซิติก แอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจะหมักน้ำตาลกลูโคส 1 โมล แล้วสร้างกรดแลคติกได้น้อยกว่า 1.8 โมล

ในปัจจุบันได้มีการจัดจำแนกแบคทีเรียแลคโตบาซิลไลออกเป็นกลุ่มย่อย 3 กลุ่ม ดังนี้ (สุมณฑา, 2545)

1) กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟเพียงอย่างเดียว (obligate homofermenter) สปีชีที่นิยมใช้หมัก ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbruckii* และ *L. helveticus*

2) กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักได้ทั้งสองแบบ (facultative heterofermenter) สปีชีที่นิยมใช้หมัก ได้แก่ *L. plantarum*, *L. casei* และ *L. sake*

3) กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟเพียงอย่างเดียว (obligate heterofermenters) สปีชีที่นิยมใช้หมัก ได้แก่ *L. bervis*, *L. fermentum* และ *L. kefir*

สำหรับแบคทีเรียแลคติกชนิดอื่นๆ ที่มีไซโตแบซิลไล (สุมนทนา, 2545) ประกอบด้วย

1) จีโนส ลิวโคนอสตอค (*Leuconostoc*) เป็นแบคทีเรียแลคติกที่มีรูปร่างกลมอันเป็นลักษณะสำคัญ ที่ทำให้สามารถจำแนกออกจากพวกแลคโตแบซิลไลได้ง่าย แบคทีเรียชนิดนี้ไม่นิยมนำมาใช้ในการหมักกรดแลคติก เพราะเกิดเมือก

2) จีโนส เพดิโอคอกคัส (*Pediococcus*) เป็นแบคทีเรียแลคติกที่นิยมนำมาใช้หมักกรดแลคติกมากกว่า เช่น *P. pentosaceus* ส่วน *P. halophilus* ในปัจจุบันถูกจัดไว้ในสปีชีใหม่ในชื่อว่า *Tetragenococcus halophilus*

3) จีโนส เสตรปโตคอกคัส (*Streptococcus*) เป็นแบคทีเรียแลคติกอีกสปีชีหนึ่ง จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในกลุ่มเสตรปโตคอกคัสมีลักษณะเด่นที่สามารถจำแนกย่อยออกได้เป็น 3 กลุ่ม (จีโนส) คือ *Enterococci*, *Lactococcus* และ *Streptococcus*

2.2 ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตอาหารหมักจากผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นม เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต ผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดอง เช่น กิมจิ ผักกาดดอง ใช้ในผลิตภัณฑ์ปลา เช่น ปลาร้า ปลาสาม ปลาจ่อม ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว นอกจากนั้นในการผลิตอาหารสัตว์บางชนิดยังมีการใช้แบคทีเรียแลคติก เช่น การทำหญ้าหมัก ซึ่งเชื่อว่าได้หญ้าหมักที่มีคุณภาพดี มีคุณค่าทางอาหารสูง เหมาะกับการเลี้ยงสัตว์ ตัวอย่างของการใช้แบคทีเรียแลคติกในอาหารหมักดองบางชนิดมีรายละเอียดพอสังเขป ดังต่อไปนี้ (ปิ่นมณี ขวัญเมือง, 2546-2547)

2.2.1 ผลิตภัณฑ์นม (dairy products)

ผลิตภัณฑ์นมหมักเตรียมได้จากนมหลายชนิด (อาจเป็นนมสด นมขาดมันเนย นมข้นหรือนม คั้นรูปจากนมผงที่ขาดหรือพร่องมันเนย) นำมาผ่านการโฮโมจีไนส์เพื่อให้อนุภาคของไขมันเล็กลงหรือไม่ก็ได้ นำมาฆ่าเชื้อด้วยการสเตอริไลซ์แล้วหมักต่อด้วยจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว ซึ่งอาจจะเป็นแบคทีเรียหรือยีสต์ หรือทั้งสองชนิดร่วมกัน หลักการของแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์นมหมัก คือ การสร้างกรดแลคติกของกล้ำเชื้อ คือ การสร้างกรดแลคติกของกล้ำเชื้อในระหว่างการหมักทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของผลิตภัณฑ์ลดลง และเกิดการจับตัวของโปรตีนในนม เกิดเป็นเคิร์ด (curd) รสชาติของผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยว ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ที่ใช้แบคทีเรียแลคติก ได้แก่ นมเปรี้ยว โยเกิร์ต และชีส เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโยเกิร์ต ได้แก่ *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

2.2.2 ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (meat products)

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ใช้แบคทีเรียแลคติกในการผลิตส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เช่น แหนม รวมทั้งไส้กรอกแห้ง และไส้กรอกกึ่งแห้ง เช่น ซาลามิ เปปเปอโรมิ เป็นต้น แหนมจัดเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมักของไทยที่มีความแตกต่างจากผลิตภัณฑ์ในแถบยุโรป เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณไขมันต่ำ ใช้ระยะเวลาในการหมักค่อนข้างสั้น ไม่มีการทำให้แห้ง ผลิตจากเนื้อหมูบดละเอียด หนังกหมู ข้าวสุก กระเทียม และส่วนผสมอื่นๆ คลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วนำมาบรรจุลงในถุงพลาสติก อาจมีการห่อทับด้วยใบตอง ปัจจุบันนิยมบรรจุลงในหลอดพลาสติก เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ ระหว่างการหมักมีการสร้างกรดแลคติกเกิดขึ้น ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของส่วนผสมลดลงจาก 6.5-6.6 เป็น 5.0-4.5 ซึ่งการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง จะมีผลต่อรสชาติของแหนม ตามรายงานของ Adam and Moss (1995) นอกจากนี้ยังทำให้การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนรวมถึงจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคลดลงด้วย ซึ่งผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้นจากสารที่ผลิตจากกล้ำเชื้อหรือจากแบคทีเรียที่พบในแหนม เช่น สารในกลุ่มแบคทีเรียโอซิน ตามรายงานของ Swetwivathana et al. (2003) โดยจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อนี้ช่วยให้แหนมมีความปลอดภัยต่อการบริโภคและเก็บไว้ได้นานขึ้น แบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องกับการหมักแหนมที่พบ ได้แก่ *Lactobacillus* sp. และ *Pediococcus* sp. ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ใช้เป็นกล้ำเชื้อในทางการค้าของผลิตภัณฑ์เนื้อหมักในต่างประเทศ นอกนั้นบางผลิตภัณฑ์ยังใช้ *Micrococcus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่รีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ มีผลทำให้สีของผลิตภัณฑ์มีความคงทนยิ่งขึ้น

2.2.3 ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (fermented fish products)

ผลิตภัณฑ์ปลาหมักหลายชนิดในแถบเอเชีย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ ปลา ร้า ปลาเจ่า ปลา ส้ม และ ส้ม พัก โดยที่ผลิตภัณฑ์กลุ่มนี้จัดอยู่ในชนิดผลิตภัณฑ์หมักจากปลา/เกลือ/คาร์โบไฮเดรต และยังมีผลิตภัณฑ์ชนิดฟิช ซอส (fish sauce) เช่น น้ำปลา และ เพซท (paste) ซึ่งส่วนผสมหลักในการผลิตประกอบด้วยปลา เกลือ ตัวอย่างเช่น การผลิตน้ำปลา จะใช้เวลาหมักเป็นเวลาประมาณ 18 เดือน ซึ่งในระหว่างการหมักปลา จะมีการสลายตัวเองโดยกิจกรรมของเอนไซม์ในตัวปลา ได้ผลผลิตเป็นของเหลวสีน้ำตาลออกมา ซึ่งของเหลวนี้นี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน โปรตีนที่ละลายและนิวคลีโอไทด์ ทำให้น้ำปลามีคุณค่าทางโภชนาการมากขึ้น และนิยมใช้เป็นเครื่องปรุงในการประกอบอาหารหลายประเภท แบคทีเรียแลคติกที่พบในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก ได้แก่ *Lactobacillus farciminis*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *Lactobacillus* sp. และ *Leuconostoc* sp. ตามรายงานของ Tanasupawat et al. (1998)

2.2.4 ผลิตภัณฑ์ผักดองเปรี้ยว (fermented vegetable products)

การทำผักดอง เป็นการแปรรูปผักอีกวิธีหนึ่งที่น่าผักสดที่มากเกินการบริโภคมาแปรรูป ทำให้ เก็บไว้บริโภคได้นาน และยังรวมไปถึงการผลิตผลไม้ดองด้วย การดองส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียแลคติก ผักที่นิยมนำมาดอง ได้แก่ กะหล่ำปลี หอม แดง กวาง หน่อไม้ ส่วนผลไม้ที่นิยมนำมาดอง ได้แก่ มะขาม มะม่วง มะกอก เป็นต้น ในประเทศไทย ผักดองในลักษณะนี้ซึ่งเป็นที่รู้จักกันทั่วไป ได้แก่ ผักเสี้ยนดอง หน่อไม้ดอง หอมดอง ผักกาดดอง ตัวอย่างแบคทีเรียแลคติกที่พบในการดองผักเสี้ยน ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. buchineri*, *L. fermentum* และ *Pediococcus cerevisiae* ตามรายงานของ Steinkraus (1996)

2.2.5 ผลิตภัณฑ์จากถั่วและธัญพืช (Legume and cereal products)

ผลิตภัณฑ์จากพืชที่นอกเหนือจากผักและผลไม้แล้ว ถั่วและธัญพืชนับเป็นอาหารอีกกลุ่มหนึ่งที่มีการศึกษา โดยเป็นการหมักที่ใช้ถั่วและธัญพืชเป็นสับสเตรท เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องมีหลายกลุ่มด้วยกัน ได้แก่ ยีสต์ รา และแบคทีเรียตัวอย่างได้แก่ ซีอิ๊ว ซึ่งสับสเตรทในการหมักส่วนใหญ่ประกอบด้วยถั่วเหลืองและข้าวสาลี เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมัก ได้แก่ *Aspergillus oryzae*, *P. halophilus* และ *L. delbrueckii* อาหารหมักชนิดนี้ใช้เป็นเครื่องปรุงรส ในอาหารหมักกลุ่มของถั่วหมัก (fermented bean) เช่น ทามานะโตะ (hamanatto) ทู-ชิน (tou-shin) และ เต้า-ซี (tao-si) ซึ่งเป็นอาหารหมักของญี่ปุ่น ใช้ถั่วเหลืองทั้งเมล็ดและแป้งข้าวสาลี เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ *Aspergillus*, *Streptococcus* และ *Pediococcus*

2.3 สภาพที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติก (ดวงรัตน์ และนันทพล, 2539)

2.3.1 อุณหภูมิ

การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ใดๆ ก็ตามเพื่อให้ได้ปริมาณมาก จำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมกับเชื่อนั้นๆ สำหรับแบคทีเรียแลคติก อุณหภูมิที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปในแต่ละสกุล ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก

สกุล	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
<i>Lactobacillus</i> spp.	
<i>thermobacterium</i>	37 – 45
<i>streptobacterium</i>	28 – 32
<i>betabacterium</i>	28 – 40
<i>Pediococcus</i> spp.	25 – 33
<i>Streptococcus</i> spp.	30 – 37
<i>Leuconostoc</i> spp.	20 - 25

2.3.2 ระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง

ถึงแม้แบคทีเรียแลคติกจะเจริญได้ที่ระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง ในช่วงค่อนข้างกว้าง (4-7.5) แต่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมโดยทั่วๆ ไปจะอยู่ในช่วงประมาณ 6-6.5 และเนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเมแทบอลิซึมน้ำตาลเป็นกรดแลคติก ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารลดลงอย่างรวดเร็ว จึงจำเป็นต้องคอยปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้สูงขึ้น การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เป็นกรดนั้น นอกจากการเจริญจะช้าลงแล้ว ยังมีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อในขณะเก็บเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีกรดมากๆ เซลล์บางส่วนจะบาดเจ็บ และไม่สามารถดำเนินกิจกรรมการหมักได้ทันที

2.3.3 ออกซิเจน

แบคทีเรียแลคติกเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่เรียกว่าไมโครแอโรไฟล์ (microaerophile) ซึ่งเมแทบอลิซึมสารอาหารด้วยกระบวนการเฟอร์เมนเตชันในสภาวะที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงจึงไม่ต้องพ่นอากาศ แต่เพื่อให้อาหารเป็นเนื้อเดียวกันตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

จึงจำเป็นต้องมีการกวน ซึ่งมีผลให้อากาศลงไปให้อาหารได้ และทำให้เกิดการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในสภาวะเช่นนี้เชื้อจะเจริญช้าลง ซึ่งการแก้ปัญหาอาจทำได้โดยการเติมเอนไซม์แคตาเลสหรือสารรีดิวส์อื่นๆ เช่น ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์-แคตาเลส นอกจากการเติมสารต่างๆ ดังได้กล่าวแล้ว การพ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงในถังเลี้ยงเชื้อ เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ขจัดปัญหาการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้

2.4 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

บทบาทของแบคทีเรียแลคติกในอาหารหมัก พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยสูงขึ้น ตลอดจนเก็บรักษาได้นานขึ้น โดยปัจจัยที่เกี่ยวข้อง (สุมนทนา, 2545) ได้แก่

2.4.1 การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง และการเกิดกรดอินทรีย์

การเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติก จะให้กรดอินทรีย์ คือ กรดแลคติกและกรดอะซิติก เป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของซบัสเตรตต่ำลง ความเป็นกรดสูงและค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่ำ จึงมีผลยับยั้งจุลินทรีย์

2.4.2 การเกิดแบคทีเรียโอซิน (bacteriocin)

แบคทีเรียโอซินเป็นสารประเภทเปปไทด์หรือโปรตีนที่สามารถฆ่าแบคทีเรียซึ่งมีลักษณะนิสัยคล้ายกับแบคทีเรียที่ให้กรดแลคติกได้ เนื่องจากแบคทีเรียโอซินเป็นสารที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ จึงมีความปลอดภัยมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์ที่นำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียโอซินที่ยอมรับและอนุญาตให้นำมาใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารได้ในขณะนี้ มีเพียงไนซินอย่างเดียว ไนซินผลิตมาจากแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* บางสายพันธุ์ในประเทศอังกฤษและประเทศอื่นบางประเทศได้ใช้ในจีนเป็นวัตถุกันเสียในอาหารมาตั้งแต่ต้นทศวรรษที่ 1950 ในขณะที่องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (The United States Food and Drug Administration) ผ่านกฎหมายยอมรับไนซินเป็นวัตถุเจือปน (กันเสีย) เมื่อปี ค.ศ. 1988 ลักษณะการทำลายแบคทีเรียของไนซินเป็นแบบทำลายแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป และสามารถทำลายเยื่อหุ้มภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด มีลักษณะคล้ายกับถูกบำบัดด้วยสารคีเลตติ้ง (chelating agent) เช่น กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) สปอร์ของแบคทีเรียไวต่อไนซิน แรกทีเดียวการนำไนซินมาใช้ในอาหารก็เพื่อวัตถุประสงค์ที่จะหยุดการเจริญของสปอร์แบซิลลัสในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดเท่านั้น เช่น เนยแข็ง และอาหารกระป๋อง แต่เมื่อใช้ในจีนกับเซลล์ของแบคทีเรียจะมีผล

ทำให้เกิดรูพรุนขึ้นกับเยื่อหุ้มพลาสมา ทำให้เกิดการรั่วซึมและการรั่วไหลขององค์ประกอบภายในเซลล์ เป็นผลให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการทำหน้าที่ไป

2.4.3 การเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารนี้ทำหน้าที่เป็นตัวรับออกซิเจน เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกมีเอนไซม์ฟลาโวโปรตีนออกซิเดส แต่ขาดเอนไซม์คะตาเลส แบคทีเรียแลคติกจะสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในสถานะที่มีออกซิเจนเท่านั้น เหตุที่แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคทีเรียแลคติกจึงทนสารนี้ได้มากกว่าแบคทีเรียอื่นๆ จากการสังเกตพบว่าในอาหารหมักบางชนิด เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สะสม แม้ว่าปริมาณที่เกิดขึ้นจะไม่มากนักก็ตาม เนื่องจากการหมักกรดแลคติกเกิดขึ้นในสภาวะไร้อากาศ ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เอื้อต่อการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในการหมักกรดแลคติกขึ้นกับปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในชั้นสเตรตในตอนเริ่มต้นของการหมักเท่านั้น แต่ข้อจำกัดนี้กลับเป็นผลดี เพราะหลังจากการหมักดำเนินไปแล้ว จะไม่เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ขึ้นมาอีก การเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากเกินไปอาจจะไปยับยั้งแบคทีเรียแลคติกที่เป็นตัวการหมักได้

2.4.4 การเกิดเอธานอล

การหมักเฮเทอโรเฟออร์เมนเททิฟในสภาวะที่ไม่มีอากาศทำให้เกิดเอธานอลขึ้น เอธานอลเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง ทำให้แบคทีเรียแลคติกได้เปรียบในการแข่งขันเหนือแบคทีเรียอื่นๆ ในการเจริญเติบโต แม้ว่าเอธานอลที่เกิดขึ้นไม่มากนักก็ตาม นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกยังมีประโยชน์ในด้านอื่นๆ อีก แต่มีความสำคัญน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณกรดแลคติกที่แบคทีเรียผลิต (อาจถึง 100 มิลลิโมลาร์) จนมีผลทำให้ความเป็นกรด-ด่าง ของชั้นสเตรตลดลงมาอยู่ระหว่าง 3.5-4.5 แลคติกเป็นกรดที่มีราคาแพงและสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมผลิตอาหารและยา

2.4.5 การเกิดไดอะเซทิล (diacetyl หรือ 2,3-butanediol)

เป็นผลจากการย่อยสลายอาหารจากแบคทีเรียแลคติกบางสปีชีส์ มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการทำเนย เพราะเป็นสารให้กลิ่นในผลิตภัณฑ์นมหมัก และยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ แต่ต้องใช้ในปริมาณมาก และทำให้มีกลิ่นรบกวนจึงทำให้สามารถใช้ในอาหารได้เพียงบางชนิด

ไดอะเซทิล ได้รับการยอมรับว่าสามารถบริโภคได้อย่างปลอดภัย (GRAS (Generally Recognized as Safe)) ว่าปลอดภัย สามารถใช้เป็นสารกันบูดในอาหารแต่มีข้อจำกัด

เนื่องจากต้องใช้จำนวนมาก จึงจะมีผลต่อการถนอมอาหาร อย่างไรก็ตามไดอะเซทิลอาจใช้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะ เครื่องมือ เครื่องใช้ที่สัมผัสอาหารได้ เพราะระเหยง่าย (<http://www.gpo.or.th/rdi/htmls/LAB.html>)

2.4.6 ริวทีริน (Reuterin)

เป็นสารที่มีโมเลกุลต่ำที่ไม่ใช่โปรตีน น้ำหนักโมเลกุลต่ำ และสามารถละลายน้ำได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นกลาง สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ ยีสต์ รา รวมทั้ง โปรโตซัว จึงสามารถนำไปใช้ในการถนอมอาหารเพื่อลดจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และทำให้อาหารเน่าเสีย (<http://www.gpo.or.th/rdi/htmls/LAB.html>)

2.5 ประโยชน์ของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกที่มีต่ออาหารหมัก มีประโยชน์ (ปิ่นมณี ขวัญเมือง, 2546-2547)

ดังนี้

2.5.1 ช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ จากการศึกษาในกลุ่มของรัญพีชพบว่าคุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้นจากกิจกรรมการหมักที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิต เช่น ในเทมเป้จากข้าวสาลี เพราะมีจุลินทรีย์บางชนิดสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญ จึงทำให้องค์ประกอบของวิตามินในอาหารที่ผ่านการหมักสูงกว่าอาหารที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก

2.5.2 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ บทบาทของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารหมักพบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยสูงขึ้น ตลอดจนเก็บรักษาได้นาน

2.5.3 แบคทีเรียกรดแลคติกมีกิจกรรมในการลดปริมาณคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด

2.5.4 กิจกรรมในการป้องกันมะเร็ง โดยเฉพาะ *Lactobacillus acidophilus* เป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งในลำไส้ใหญ่

2.5.5 ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีงานวิจัยหลายฉบับที่ทำการศึกษาคัดแยกแบคทีเรียแลคติก และศึกษาการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ได้มาจากแบคทีเรียแลคติก ดังนี้

Kojic, M. et al. (1991) ได้ศึกษาแบคทีเรียโอซินซึ่งผลิตได้จากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* S50 โดยเรียกว่าแบคทีเรียโอซิน เอส 50 (bacteriocin S50) ซึ่งสารนี้จะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น และกิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน เอส 50 จะไวต่อเอนไซม์โปรติเอส สารนี้จะยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์หลังจากที่ให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 60 นาที และในช่วง pH 2 ถึง 11

Sarkar, P.K. and Banerjee, S. (1996) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากหลายๆ แหล่ง ได้เชื้อ 171 ไอโซเลต ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ *Lactobacillus* (106 สายพันธุ์) *Lactococcus* (53 สายพันธุ์) *Leuconostoc* (6 สายพันธุ์) และ *Pediococcus* (6 สายพันธุ์) จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้งหมดนี้ จะมี 24 สายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแลคติก 19 สายพันธุ์ ซึ่งทดสอบด้วยวิธีอาการ์สปอตเทสต์ (agar spot test) และเวลล์ ดิฟฟิวชันแอสเซย์ (well diffusion assay) และภายใต้สภาวะที่มีการกำจัดอิทธิพลของกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีเรียโอฟาจ (bacteriophages) *Lactobacillus* 7 ไอโซเลต จะแสดงความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้ เนื่องจากเชื้อพวกนี้ผลิตสารที่คล้ายกับแบคทีเรียโอซิน

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. (2000) ได้คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารพื้นบ้าน ที่มีคุณสมบัติในการผลิตแบคทีเรียโอซิน ภายใต้สภาวะที่มีการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกรดอินทรีย์ สารยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตขึ้นได้จากแบคทีเรีย 1 สายพันธุ์ ซึ่งก็คือ *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* ซึ่งเชื้อนี้ผลิตแบคทีเรียโอซิน ซึ่งไวต่อเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic enzymes) ทนความร้อน และมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียที่จำเพาะ โดยแบคทีเรียโอซินที่ผลิตได้จาก *L. lactis* subsp. *lactis* มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* (TISTR 473) โดยไม่ต้องทำลายเซลล์ แบคทีเรียโอซินจะถูกตรวจสอบได้เป็นครั้งแรกในช่วงล็อกเฟส (log phase) และจะมีความสามารถในการฆ่าเชื้อได้สูงสุดในช่วงสแตชันนารีเฟส (stationary phase)

Bromberg, R. et al (2004) ได้คัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินด้วยวิธีแซนด์วิช (sandwich test) จากตัวอย่างเนื้อ และผลิตภัณฑ์จากเนื้อทั้งหมด 285 ตัวอย่าง พบว่า ใน 174 ตัวอย่าง จะสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกได้ 813 สายพันธุ์ เชื้อที่แยกได้จะยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* CTC33 และ/หรือ *Listeria innocua* Lin 11 เมื่อมีการ

ทดสอบด้วยวิธีเวลล์ดีฟิวชันแอสเซย์ (well-diffusion assay) พบว่าเชื้อ 128 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นดัชนีได้ เชื้อที่คัดแยกได้นี้จะสามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ *S. aureus* จะไวต่อการทดสอบมากที่สุด ขณะที่ *Enterococcus faecalis* และ *Lactobacillus plantarum* จะทนได้มากที่สุด สารประกอบทั้งหมดที่ผลิตขึ้นจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกจะถูกยับยั้งการทำงานบางส่วนหรือทั้งหมดด้วยเอนไซม์โปรติโอไลติกบางชนิด