ว.วิทย. มข. 43(3) 380-394 (2558) KKU Sci. J. 43(3) 380-394 (2015)

สารรอยเทอรินจากแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติก

Reuterin Produced by Lactic Acid Bacteria

สุจิตรา เตโช[1*] *และ สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์*[1]

บทคัดย่อ

รอยเทอริน หรือ 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) เป็นสารประกอบอัลดีไฮด์ที่มีความเป็นกลาง สามารถละลายน้ำได้ ไม่ใช่องค์ประกอบของโปรตีน และมีมวลโมเลกุลต่ำ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยส่วนใหญ่สายพันธุ์ของ *Lactobacillus reuteri* สามารถผลิตรอยเทอรินในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลภายใต้สภาวะไร้อากาศ อย่างไรก็ตามสายพันธุ์อื่น ๆ ของ *Lactobacillus* species เช่น *L. coryniformis*, *L. fermentum*, *L. plantarum* และ *L. collinoides* สามารถผลิตรอยเทอรินได้เช่นกัน โดยความสามารถในการผลิตรอยเทอรินขึ้นอยู่กับการมี glycerol dehydratase gene (*gld gene*) ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์กลีเซอรอลดีไฮดราเทส (glycerol dehydratase) จากคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ของรอยเทอริน ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้รอยเทอรินในอุตสาหกรรมอาหารจึงได้รับความสนใจอย่างมาก

ABSTRACT

Reuterin or 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA) is a neutral, water soluble, non-protein and low molecular weight aldehyde which exhibit broad spectrum antimicrobial activity. *Lactobacillus reuteri* strains generally produce reuterin during anaerobic fermentation of glycerol. However, many researches have been reported that other strains of *Lactobacillus* species such as *L. coryniformis, L. fermentum, L. plantarum* and *L. collinoides* acted as reuterin producers. The ability of these *Lactobacillus* strains to produce reuterin depended on the presence of glycerol dehydratase encoding gene (*gld gene*) which regulated the expression of glycerol dehydratase activity. Due to its broad spectrum antimicrobial activity, the application of reuterin in the food industry has become a major interest.

คำสำคัญ: รอยเทอริน แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติก กลีเซอรอล ดีไฮดราเทส ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

Keywords: Reuterin, Lactic acid bacteria, Glycerol dehydratase, Antimicrobial activity

[1]ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพ 10330

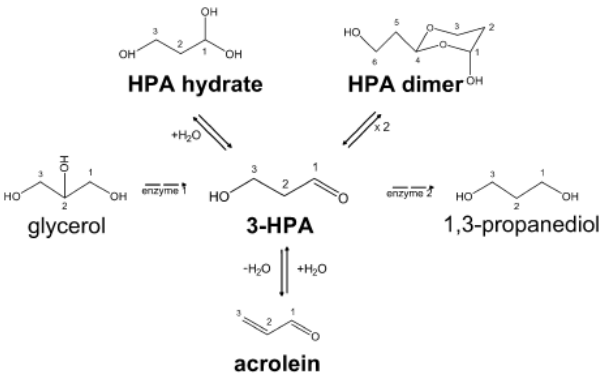
*Corresponding Author, E-mail: sujitra_jaa@hotmail.com

บทนำ

แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติก (lactic acid bacteria, LAB) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ มีรูปร่างแท่งหรือกลม ผลิตกรดแล็กติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักคาร์โบไฮเดรต (Ruas-Madiedo et al., 2012) แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก (Saito, 2004) สามารถผลิตสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคโดยเฉพาะ *Lactobacillus reuteri* ที่มีความสามารถในการสร้างสารรอยเทอริน (Talarico et al., 1988) ซึ่งในเวลาต่อมามีการค้นพบว่า *Lactobacillus* ชนิดอื่น ๆ ก็สามารถผลิตรอยเทอรินได้เช่นกัน (Nakanishi et al., 2002; Martín et al., 2005; Tanaka et al., 2009) ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกชนิดอื่น ๆ ที่มีความสามารถในการสร้างรอยเทอริน เพื่อนำสารนี้มาประยุกต์ใช้เป็นสารป้องกันการเน่าเสียที่มีสาเหตุจากจุลินทรีย์ในอาหารหลายชนิด โดยใช้ในรูปแบบของการเติมสารรอยเทอรินเพียงชนิดเดียว ใช้รอยเทอรินร่วมกับสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น รวมทั้งใช้ในรูปแบบของต้นเชื้อบริสุทธิ์ (starter culture)

1. รอยเทอริน (reuterin)

รอยเทอรินหรือ 3-hydroxypropional dehyde (3-HPA) คือ สารประกอบประเภทอัลดีไฮด์ที่มีคุณสมบัติในการละลายน้ำที่ดี มีความคงตัวภายใต้สภาวะความเป็นกรดด่างในช่วงกว้าง ทนต่อเอนไซม์กลุ่มที่ย่อยโปรตีนและไขมัน (Vollenweider and Lacroix, 2004) ที่สำคัญคือ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด (broad-spectrum antimicrobial substance) ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ (Axelsson et al., 1989) รวมไปถึงยีสต์ รา และโปรโตซัว (Talarico and Dobrogosz, 1989) จึงมีการนำเอาสารนี้มาศึกษาเพื่อใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร (El-Ziney et al., 1999) รอยเทอรินมีโครงสร้างหลายรูปแบบ (form) โดยอาจจับตัวกันเป็นคู่กลายเป็นโครงสร้างที่อยู่ในรูป HPA dimer หรืออาจมีน้ำอยู่ในโมเลกุลทำให้อยู่ในรูปที่เรียกว่า HPA hydrate หรือเกิดการสูญเสียน้ำออกจากโมเลกุลอยู่ในรูปของ acrolein ดังแสดงในรูปที่ 1 สารชนิดนี้ถูกสร้างขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักกลีเซอรอลภายใต้สภาวะไร้อากาศโดย *Lactobacillus reuteri* สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์กลีเซอรอลดีไฮดราเทส (glycerol dehydratase) เปลี่ยนกลีเซอรอลให้เป็นรอยเทอริน (Talarico et al., 1988)



รูปที่ 1 โครงสร้างแบบต่าง ๆ ของรอยเทอริน (Vollenweider and Lacroix, 2004)

2. แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกที่สร้างรอยเทอริน

2.1 *Lactobacillus reuteri*

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างรอยเทอรินนั้นส่วนใหญ่มักเป็นสายพันธุ์ของ *Lactobacillus reuteri* ซึ่งพบมากในระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal ecosystem) ของมนุษย์ สัตว์ปีก สุกร และสัตว์ชนิดอื่น ๆ แบคทีเรียชนิดนี้ผลิตรอยเทอรินจากกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยรอยเทอรินที่ได้มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์หลายกลุ่มทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา (Talarico et al., 1988) มีการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างรอยเทอรินของ *L. reuteri* ที่แยกจากมนุษย์ ได้แก่ สายพันธุ์ ATCC 55730, 6475, 4659 และ 5289 พบว่า *L. reuteri* ทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็นรอยเทอริน แต่รอยเทอรินที่สร้างได้มีปริมาณแตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ ATCC 55730 สามารถเปลี่ยนกลีเซอรอลเป็นรอยเทอรินปริมาณสูงสุดถึง 80% (Spinler et al., 2008) อีกการศึกษาหนึ่ง พบว่า *L. reuteri* SD2112 (ATCC 55730) สามารถเปลี่ยนกลีเซอรอล 200 mM ให้เป็นรอยเทอรินได้ 170 mM ซึ่งคิดเป็นร้อยละผลได้ (% yield) 57% (Cleusix et al., 2007) และการศึกษาของ Kang et al. (2012) ได้เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างรอยเทอรินของ *L. reuteri* สายพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ *L. reuteri* KCTC 3594 และ KCTC 3698 ที่แยกจากมนุษย์ กับ KCTC 3679 ที่แยกจากหนู พบว่า *L. reuteri* KCTC 3594 สามารถสร้างรอยเทอรินได้ 2.51 mM ในขณะที่อีกสองสายพันธุ์นั้นไม่มีความสามารถในการสร้างรอยเทอริน สำหรับช่วงเวลาการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการสร้างรอยเทอรินของ *L. reuteri* ATCC 55730 และ L22 คือ ช่วงปลายของ logarithmic growth phase ซึ่งใช้เวลาในการเจริญ 16 ชั่วโมง หากเลี้ยงในอาหารเหลว De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) หรือ 20 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB) (Dexian et al., 2012) นอกจากนี้ในการศึกษาเพื่อคัดเลือก *Lactobacillus* สายพันธุ์ที่สร้างรอยเทอรินที่แยกจากมูลสุกร พบว่าจากทั้งหมด 165 ไอโซเลต สามารถคัดเลือกได้ 6 ไอโซเลต ได้แก่ สายพันธุ์ PRO108, PRO109, PRO133, PRO137, PRO149 และ PRO152 ที่สามารถผลิตรอยเทอรินได้มากกว่า 15 μg ml^{-1} และเมื่อทำการวิเคราะห์รูปแบบการหมักน้ำตาลและลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene ปรากฏว่า lactobacilli ทั้ง 6 ไอโซเลต คือ *L. reuteri* ซึ่งทั้งหมดมี glycerol dehydratase gene (*gld* gene) ที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์กลีเซอรอล ดีไฮดราเทส ทำหน้าที่เปลี่ยนกลีเซอรอลให้เป็นรอยเทอริน อย่างไรก็ตามมีการศึกษายืนที่ควบคุมการสร้างรอยเทอรินของ *L. reuteri* สายพันธุ์ SD2112 (ATCC 55730), ATCC 23272^T (type strain), RC-14, 359 และ 656 พบว่าเฉพาะสายพันธุ์ 23272^T และ SD2112 เท่านั้นที่มี *gld* gene ควบคุมการผลิตเอนไซม์ glycerol dehydratase จึงทำให้แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างรอยเทอริน ในขณะที่สายพันธุ์อื่นไม่มี *gld* gene จึงไม่สามารถสร้างรอยเทอรินได้ (Cadiux et al., 2008) จากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า *L. reuteri* เฉพาะสายพันธุ์ที่มี *gld* gene เท่านั้นจึงจะมีความสามารถในการสร้างรอยเทอริน

2.2 *Lactobacillus* species

ดังที่กล่าวแล้วว่า *L. reuteri* ส่วนใหญ่สามารถสร้างรอยเทอรินได้ แต่อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษายังพบ *Lactobacillus* spp. อื่นที่สามารถสร้างรอยเทอรินได้เช่นกัน การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกที่ผลิตรอยเทอรินเมื่อบ่มเซลล์ในสารละลายกลีเซอรอลภายใต้สภาวะไร้อากาศทั้งหมด 148 สาย

พันธุ์พบว่า *Lactobacillus coryniformis* 394 แสดงความสามารถในการผลิตรอยเทอรินได้สูงสุด แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถผลิตรอยเทอรินได้สูงสุดเมื่อบ่มเซลล์ในสารละลายกลีเซอรอลที่เติม $CaCO_3$ 0.5% ที่อุณหภูมิ 25°C ในสภาวะไร้อากาศ รอยเทอรินจาก *L. coryniformis* 394 แสดงฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งเชื้อรายีสต์ และแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติก (Nakanishi et al., 2002) โดยความสามารถในการสร้างรอยเทอรินนี้มาจากการมี *gld* gene ที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์กลีเซอรอลดีไฮดราเทส สำหรับ *L. coryniformis* CECT5711 ที่แยกจากชีสนมแพะมียีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์กลีเซอรอลดีไฮดราเทส จึงทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถเปลี่ยน กลีเซอรอลเป็นรอยเทอรินได้ (Martín et al., 2005) นอกจากนี้ตรวจพบ *gldC* gene ใน *L. fermentum* 14 จากการศึกษาเพื่อคัดเลือก lactobacilli ที่มีความสามารถในการสร้างรอยเทอริน (Cadieux et al., 2008) การทดสอบคุณสมบัติด้านความสามารถในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์รอยเทอรินของแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* จากอุจจาระของทารกหลังคลอดที่มีสุขภาพดี พบว่า *L. plantarum* H210 มีความสามารถสร้างรอยเทอรินและมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ทดสอบ (Chimchang, 2012) นอกจากนี้ *L. collinoides* ที่พบในน้ำผลไม้หมักสามารถเปลี่ยนกลีเซอรอลให้กลายเป็น 3-HPA ได้ สารประกอบดังกล่าวเป็นสารตั้งต้นของการผลิต acrolein ที่ทำให้เกิดรสขมและเกิดการเน่าเสียในน้ำผลไม้หมัก (cider) ซึ่งส่งผลเสียต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ (Claisse and Lonvaud-Funel, 2000; Sauvageot et al., 2000)

3. การวิเคราะห์ปริมาณรอยเทอริน

การวิเคราะห์ปริมาณรอยเทอรินที่นิยมใช้มี 2 วิธี คือ การวัดค่าการดูดกลืนแสง (colorimetric assay) โดยให้รอยเทอรินทำปฏิกิริยาทางเคมีกับกรดอะมิโนทริปโตฟาน (tryptophan) เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสีที่ความยาวคลื่น 560 nm ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือการวิเคราะห์โดยใช้ high performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งมีคอลัมน์ชนิดต่าง ๆ ในการแยกรอยเทอรินให้บริสุทธ์ และตรวจวัดปริมาณโดยใช้รีแฟรกโตมิเตอร์ (refractometer) เป็นดีเทคเตอร์ ปริมาณรอยเทอรินจะคำนวณจากพื้นที่ใต้พีค (peak area) ของโครมาโทรแกรม ในการวิเคราะห์ปริมาณรอยเทอรินอาจเลือกใช้เพียงวิธีใดวิธีหนึ่ง หรือใช้ทั้ง 2 วิธีนี้ร่วมกันหากต้องการวิเคราะห์ปริมาณรวมถึงทำรอยเทอรินให้บริสุทธิ์ (Cleusix et al., 2007; Cadiux et al., 2008; Spinler et al., 2008) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณรอยเทอรินแต่ละวิธีมีรายละเอียดดังนี้

3.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสง

การวิเคราะห์เริ่มจากการทำให้โมเลกุลของรอยเทอริน หรือ 3-hydroxypropionaldehyde เกิดการสูญเสียน้ำเสียก่อนโดยเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น รอยเทอรินจะเปลี่ยนมาอยู่ในรูปของสาร acrolein จากนั้นเติมกรดอะมิโน tryptophan จะทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่าง acrolein และกรดอะมิโน tryptophan ได้สารประกอบเชิงซ้อน (acrolein-tryptophan complex) ที่มีสีเหลืองแล้วจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อนที่ความยาวคลื่น 560 nm วิธีการดังกล่าวนิยมนำมาใช้มากในการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตรอยเทอริน จากการเปรียบเทียบปริมาณรอยเทอรินที่ผลิตโดย *L. reuteri* สายพันธุ์ ATCC 55730, ATCC PTA6475, ATCC PTA4659 และ ATCC PTA5289 พบว่า *L. reuteri* ATCC 55730 สามารถเปลี่ยนกลีเซอรอลให้เป็นรอยเทอรินได้มากกว่า *L. reuteri* สายพันธุ์อื่น ๆ ถึง 3 เท่า (Spinler et al., 2008) นอกจากนี้พบการใช้วิธีการดังกล่าวใน

การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกที่แยกจากมูลสุกรซึ่งพบว่า มีแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติก 28 ไอโซเลตจาก 165 ไอโซเลต สามารถผลิตรอยเทอรินได้โดยมีปริมาณรอยเทอรินอยู่ระหว่าง 0.87-58.83 μg/mol (Rodríguez et al., 2003)

3.2 การวิเคราะห์ด้วย high performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC เป็นวิธีทางโครมาโทรกราฟีที่นิยมใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณรอยเทอริน รวมทั้งแยกรอยเทอรินให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ชนิดต่าง ๆ เช่น Aminex HPX 87C 300 7.8mm cation-exchange column, Dowex 50WX8 200-400-mesh, H form column, Shim-pack SCR-101N column, Shodex Sugar SH1011 (Phenomenex) column เป็นต้น และใช้รีแฟรกโตมิเตอร์เป็นดีเทคเตอร์ หลังจากแยกผ่านคอลัมน์จนได้รอยเทอรินที่บริสุทธิ์แล้วจะนำไปทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคหรือวิเคราะห์โครงสร้างรอยเทอรินเป็นลำดับถัดไป (Spinler et al., 2008; Martín et al., 2005; Nakanishi et al., 2002; Cadiux et al., 2008) จากการศึกษาของ Spinler et al. (2008) ที่ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณรอยเทอรินและตรวจสอบความถูกต้อง (validate) ระหว่างปริมาณรอยเทอรินที่วิเคราะห์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงกับการใช้เทคนิค HPLC พบว่า วิธีการทั้งสองให้ผลสอดคล้องกัน ปริมาณรอยเทอรินที่วิเคราะห์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงมีความคลาดเคลื่อนต่ำกว่า 3% เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณรอยเทอรินที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค HPLC แสดงให้เห็นว่าทั้งสองเทคนิคสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณรอยเทอรินได้อย่างถูกต้อง และค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกัน

สำหรับข้อดีของการวิเคราะห์ปริมาณรอยเทอรินด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงคือสามารถตรวจวัดรอยเทอรินที่มีปริมาณน้อยมาก ๆ ได้ (น้อยกว่า 15 μg) สามารถวิเคราะห์ปริมาณรอยเทอรินได้อย่างถูกต้อง มีความคลาดเคลื่อนต่ำ ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อย และสามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว (high-throughput method) ซึ่งมีประโยชน์สำหรับการกลั่นกรองเบื้องต้น (screening) เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก (Spinler et al., 2008) นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย เหมาะสำหรับการใช้งานเมื่อต้องการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตรอยเทอรินซึ่งมีจำนวนมาก (Rodríguez et al., 2003) แต่มีข้อควรระวังคือ ในระหว่างการทำปฏิกิริยาไม่ควรมีสารจำพวก aldehyde ชนิดอื่นๆเข้ามาเกี่ยวข้องเพราะจะทำให้ปริมาณรอยเทอรินที่วิเคราะห์ได้มีความคลาดเคลื่อน (Circle et al., 1945) ส่วนการใช้เทคนิค HPLC มีข้อดีคือ สามารถแยกรอยเทอรินออกจากสารอื่น ทำให้รอยเทอรินมีความบริสุทธิ์มากขึ้น สามารถนำรอยเทอรินที่บริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์โครงสร้าง ต่อได้ แต่มีข้อเสียคือ วิธีการวิเคราะห์ค่อนข้างยุ่งยาก ใช้เวลาในการวิเคราะห์มาก และมีค่าใช้จ่ายสูง

4. ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

เนื่องด้วยรอยเทอรินเป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา (Cleusix et al., 2008; Talarico and Dobrogosz, 1989) จึงทำให้เกิดงานวิจัยมากมายที่ทำการศึกษาฤทธิ์ของรอยเทอรินต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เพื่อประเมินศักยภาพในการใช้รอยเทอรินเป็นสารป้องกันการเน่าเสียในอาหาร ลดความเสี่ยงในการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค รวมถึงประเมินศักยภาพในการใช้แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกที่มีความสามารถในการผลิตรอยเทอรินเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกอีกด้วย ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรอยเทอรินต่อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มีดังนี้

4.1 แบคทีเรีย

4.1.1 แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติก เนื่องจากการใช้แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกหลายสายพันธุ์ร่วมกัน (multi-strain probiotic formulations) มีประโยชน์อย่างมากต่อการคิดค้นสูตรโปรไบโอติกที่เหมาะสมเพื่อจำหน่ายเป็นผลิตภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ ดังนั้นจึงมีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งกันในกลุ่มของ *L. reuteri* และระหว่าง *L. reuteri* กับแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกชนิดอื่น ๆ เพื่อทดสอบว่าสารต้านจุลินทรีย์ที่ *L. reuteri* สร้างขึ้นนั้นจะมีผลไปยับยั้งแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกชนิดอื่นๆหรือไม่ รายงานการวิจัยฉบับแรกที่กล่าวถึงฤทธิ์ของรอยเทอรินต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกคือรายงานของ Axelsson et al. (1989) ซึ่งกล่าวว่ารอยเทอรินเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกหลายสกุล ได้แก่ *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* การศึกษาของ Spinler et al. (2008) ได้ทดสอบความเข้ากันได้ (compatability) ของ *L. reuteri* สายพันธุ์ ATCC 55730, 6475, 4659 และ 5289 ที่มีความสามารถในการผลิตรอยเทอรินกับ *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. casei* ATCC 334, *L. gasseri* ATCC 33323 และ *L. johnsonii* ATCC 33200 พบว่า ไม่เกิดการยับยั้งระหว่าง *L. reuteri* ด้วยกันเอง แต่พบการยับยั้งเกิดขึ้นเล็กน้อยระหว่าง *L. reuteri* กับ *L. acidophilus* ATCC 4356 และ *L. gasseri* ATCC 33323 เกิดการยับยั้งในระดับปาน-กลางระหว่าง *L. reuteri* กับ *L. johnsonii* ATCC 33200 ในขณะที่เกิดการยับยั้งอย่างมากระหว่าง *L. reuteri* กับ *L. casei* ATCC 334 นอกจากนี้รอยเทอรินที่สร้างจาก *L. reuteri* SD2112 ถูกทำให้บริสุทธิ์และนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) โดยทดสอบกับ *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. casei* ATCC 334, *L. fermentum* ETH-Z, *L. salivarius* ETH-Z, *L. reuteri* DSM 20016, *L. reuteri* SD2112, *Enterococcus faecium* DSM 20477 และ *Streptococcus salivarius* DSM 20560 ผลการทดสอบพบว่า *L. reuteri* DSM 20016 และ *L. reuteri* SD2112 มีความทน (resistance) ต่อการยับยั้งของรอยเทอรินมากที่สุด โดยมีค่า MIC 30-50 mM และ MBC 60-120 mM สำหรับ lactobacilli ชนิดอื่น ๆ มีค่า MIC 15-40 mM และ MBC 15-80 mM ส่วนการยับยั้ง *E. faecium* DSM 20477 กับ *S. salivarius* DSM 20560 มีค่า MIC 3.8-7.5 mM และ MBC 15-50 mM ซึ่งจัดว่าไว (sensitive) ต่อการยับยั้งของรอยเทอริน สำหรับ *Bifidobacterium breve* DSM 20213 มีค่า MIC 7.5–15 mM และ MBC 3.8–15 mM ส่วน *B. longum* var *infantis* DSM 20088, *B. longum* DSM 20219 และ *B. catenulatum* LMG 11043 นั้นมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 1.9 ถึง 3.8 mM (Cleusix et al., 2007) และจากการศึกษาของ Martín et al. (2005) พบว่า รอยเทอรินที่สร้างจาก *L. coryniformis* CECT 5711 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกที่ใช้ทดสอบได้ทุกชนิด (inhibition zone มากกว่า 2 mm) ได้แก่ *Lactococcus lactis* MG1614, *L. sakei* CECT 5712, *E. faecium* P21, *E. faecalis* TAB28 รวมไปถึง *Pediococcus acidilactici* 347 ด้วย (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกของรอยเทอริน

Reuterin-producing LAB	Test method	LAB as indicator strains	References
Lactobacillus reuteri (strains ATCC 55730, 6475, 4659, 5289)	Agar spot method	*L. acidophilus* ATCC 4356	Spinler et al. (2008)
		L casei ATCC 334	
		L. gasseri ATCC 33323	
		L. johnsonii ATCC 33200	
L. reuteri SD2112 (ATCC 55730)	MIC and MBC	*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356	Cleusix et al. (2007)
		Lactobacillus casei ATCC 334	
		Lactobacillus fermentum ETH-Z	
		Lactobacillus salivarius ETH-Z	
		Lactobacillus reuteri DSM 20016	
		Lactobacillus reuteri SD2112	
		Enterococcus faecium DSM 20477	
		Streptococcus salivarius DSM 20560	
		Bifidobacterium longum var *infantis* DSM 20088	
		Bifidobacterium longum DSM 20219	
		Bifidobacterium catenulatum LMG 11043	
		Bifidobacterium breve DSM 20213	
L. coryniformis CECT 5711	Overlay method	*Lactococcus lactis* MG1614	Martín et al. (2005)
		Lactobacillus sakei CECT 5712	
		Enterococcus faecium P21	
		Enterococcus faecalis TAB28	
		Pediococcus acidilactici 347	
L. reuteri 1063	Susceptibility test	*Streptococcus lactis* (2 strains)	Axelsson et al. (1989)
		Pediococcus cerevisiae (1 strain)	
		Leuconostoc mesenteroides (1 strain)	
		Lactobacillus acidophilus (6 strains)	
		Lactobacillus plantarum (2 strains)	

4.1.2 กลุ่มที่ไม่ใช่แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติก การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรอยเทอรินต่อการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่ใช่แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกนั้นมักเป็นการทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) ชนิดต่างๆที่ก่อโรคในมนุษย์และสัตว์ การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของรอยเทอรินที่ผลิตจาก *L. reuteri* SD2112 ด้วยวิธี MIC และ MBC ต่อการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ใช่แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกพบว่า *Bacteroides vulgatus* DSM 1447 และ *Clostridium difficile* ETH-Z มีความไวต่อรอยเทอรินมากที่สุด โดยมี MIC ต่ำกว่า 1.9 mM รองลงมาคือ *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM 2079, *Eubacterium eligens* DSM 2079 ซึ่งมีค่า MIC ระหว่าง 1.9 to 3.8 mM ลำดับถัดมาคือ *Ruminococcus productus* DSM 2950 และ *Listeria innocua* HPB13 (MIC 7.5-15 mM, MBC 3.8-15 mM) ตามด้วย *Escherichia coli* DSM 5698 (MIC 7-15 mM, MBC 15-30 mM) และ *Clostridium clostridioforme* DSM 933 มีค่า MIC 15-30 mM และ MBC 15-30 mM ซึ่งจัดว่าทนต่อความเข้มข้นของรอยเทอรินมากที่สุด (Cleusix et al., 2007) เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของ *L. reuteri*

สายพันธุ์ต่าง ๆ ต่อเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ด้วยวิธี agar spot method พบว่า *L. reuteri* ทุกสายพันธุ์แสดงฤทธิ์ในการยับยั้ง enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* และ*Vibrio cholera* ซึ่ง S. *sonnei* ถูกยับยั้งมากที่สุด (Spinler et al., 2008) นอกจากนี้ยังพบการยับยั้งของรอยเทอรินที่สร้างจาก *L. reuteri* ATCC 55730 ต่อเชื้อก่อโรคในไก่ โดยรอยเทอรินมีฤทธิ์ยับยั้ง *Salmonella pullorum* ATCC 9120 ที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระขาว (pullorum disease), *Staphylococcus aureus* และ *E. coli* 6 สายพันธุ์ ได้แก่ O1, O2, O78, QD1, QD3 และ S2 และรอยเทอรินจาก *L. reuteri* L22 แสดงฤทธิ์ยับยั้ง *S. pullorum* ATCC 9120 และ *E. coli* 4 สายพันธุ์ ได้แก่ O2, QD1, QD3 และ K12 (Dexian et al., 2012) สำหรับรอยเทอรินจาก *L. coryniformis* CECT 5711 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ทดสอบได้ทุกชนิด ได้แก่ *L. monocytogenes* ScottA, *L. monocytogenes* Ohio, *L. seeligeri* RdC, *S. aureus* CECT 5191, *S. epidermidis* CECT 231, *E. coli* CECT 4076 (O157:H7), *Klebsiella pneumoniae* CECT 142, *Proteus vulgaris* CECT 484 และ *K. oxytoca* CECT 860^{T}) (Martín et al., 2005) รอยเทอรินที่ผลิตขึ้นโดย *L. reuteri* DSM 12246 สามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์ของ *L. innocua* ได้อย่างสมบูรณ์ (Rasch et al., 2007) การศึกษาของ Chen et al. (2002) พบว่าแบคทีเรียก่อโรคทุกชนิดที่ใช้ทดสอบมีความไวต่อรอยเทอรินโดยมีค่า MIC 20-35 ppm และมีค่า MBC 30-50 ppm นอกจากนี้ *L. reuteri* 1063 สามารถสร้างสารรอยเทอรินที่มีฤทธิ์ยับยั้งสายพันธุ์ต่างๆของ *E. coli*, *S. typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. epidermidis* และ *Bacillus megaterium* (Axelsson et al., 1989) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ไม่ใช่แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกของรอยเทอริน

Reuterin-producing LAB	Test method	Non-LAB as indicator strains	References
L. reuteri ATCC 55730	Well diffusion method	*Salmonella pullorum* ATCC 9120	Dexian et al. (2012)
L. reuteri L22		*Staphylococcus aureus*	
		6 strains of *E. coli*: O1, O2, O78, QD1, QD3 and S2 for ATCC 55730 and 4 strains of *E. coli*: O2, QD1, QD3 and K12 for L22	
L. reuteri ATCC 55730	Agar spot method	enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)	Spinler et al. (2008)
		enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)	
		Salmonella enterica	
		Shigella sonnei	
		Vibrio cholera	
L. reuteri SD2112 (ATCC 55730)	MIC and MBC	*Bacteroides vulgatus* DSM 1447	Cleusix et al. (2007)
		Bacteroides thetaiotaomicron DSM 2079	
		Eubacterium eligens DSM 2079	
		Eubacterium biforme DSM 3989	
		Ruminococcus productus DSM 2950	
		Listeria innocua HPB13	
		Escherichia coli DSM 5698	

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ไม่ใช่แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกของรอยเทอริน (ต่อ)

Reuterin-producing LAB	Test method	Non-LAB as indicator strains	References
		Clostridium difficile ETH-Z	
		Clostridium clostridioforme DSM 933	
L. reuteri DSM12246	Microtiter assay	*Listeria innocua*	Rasch et al. (2007)
L. coryniformis CECT5711	Overlay method	*Listeria monocytogenes* ScottA	Martín et al. (2005)
		Listeria monocytogenes Ohio	
		Listeria seeligeri RdC	
		Staphylococcus aureus CECT 5191	
		Staphylococcus epidermidis CECT 231	
		Escherichia coli CECT 4076 (O157:H7)	
		Klebsiella pneumoniae CECT 142	
		Proteus vulgaris CECT 484	
		Klebsiella oxytoca CECT 860^{T}	
L. reuteri	MIC and MBC	*Escherichia coli* ATCC 25922	Chen et al. (2002)
		Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	
		Staphylococcus aureus ATCC 25923	
		Bacillus subtilis ATCC 6633	
L. reuteri 1063	Susceptibility test	*Escherichia coli* (7 strains)	Axelsson et al. (1989)
		Salmonella typhimurium (1 strains)	
		Pseudomonas aeruginosa (2 strains)	
		Staphylococcus epidermidis (1 strains)	
		Bacillus megaterium (1 strains)	

4.2 ยีสต์

L. coryniformis CECT 5711 สามารถสร้างรอยเทอรินที่ยับยั้งการเจริญของยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* CECT 10357 และ *Debaryomyces hansenii* CECT 10360 เมื่อทดสอบด้วยวิธี overlay method ใน MRS plates ที่เติมกลีเซอรอล 250 mM (Martín et al., 2005) อีกการศึกษาหนึ่งรายงานว่ารอยเทอรินจาก *L. coryniformis* 394 มีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์หลายชนิดที่พบในกระบวนการผลิตหญ้าหมักหรือไซเลจ (silage) ได้แก่ *Saccharomyces serevisiae* K-4 และ *S. serevisiae* OC2 (Nakanishi et al., 2002) และมีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ที่ไม่ต้องการสำหรับการผลิตไซเลจ เช่น *Candida krusei* IFO 1395^{T} และ *Hansenula anomara* IFO 0140 (Nakanishi et al., 2002) รวมถึงยับยั้ง *Pichia* sp. Y1 ที่เป็นจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในกระบวนการผลิตไซเลจ (Tanaka et al., 2009) สำหรับรอยเทอรินจาก *L. reuteri* แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans*, *C. glabrata*, *S. cerevisiae* และ *Saccharomycopsis fibuligera* (Chung et al., 1989) ดังแสดงในตารางที่ 3

4.3 รา

รอยเทอรินจาก *L. coryniformis* 394 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราได้ดีมาก โดยสามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus oryzae* IAM 2779, *A. niger* IFO 6662, *A. sojae* KBN650, *Penicillium chrysogenum* IFO 9252, *P. notatum* IFO 4640, *Rhizopus delemer* IFO 4754, *Neurospora sitophila* IFO 6069, *Trichoderma viride* IAM 5141, *T. reesei* IAM 13106, *Mucor hiemalis* IFO

8448 และ *Geotrichum candidum* 1239 ที่พบในระหว่างกระบวนการผลิตไซเลจได้อย่างสมบูรณ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Nakanishi et al., 2002) นอกจากนี้ *L. reuteri* สร้างสารรอยเทอรินที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Fusarium samfucienum* และ *A. flavus* ได้อีกด้วย (Chung et al., 1989) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านยีสต์และราของรอยเทอริน

Reuterin-producing LAB	Test method	Yeast and Mould as indicator strains	References
L. coryniformis 394	Optical density (OD)	*Pichia* sp. Y1	Tanaka et al. (2009)
L. coryniformis CECT 5711	Overlay method	*Kluyveromyces marxianus* CECT 10357	Martin et al. (2005)
		Debaryomyces hansenii CECT 10360	
L. coryniformis 394	Optical density (OD)	*Saccharomyces serevisiae* K-4	Nakanishi et al. (2002)
		Saccharomyces serevisiae OC2	
		Candida krusei IFO 1395	
		Hansenula anomara IFO 0140	
		Aspergillus oryzae IAM 2779	
		Aspergillus niger IFO 6662	
		Aspergillus sojae KBN650	
		Penicillium chrysogenum IFO 9252	
		Penicillium notatum IFO 4640	
		Rhizopus delemer IFO 4754	
		Neurospora sitophila IFO 6069	
		Trichoderma viride IAM 5141	
		Trichoderma reesei IAM 13106	
		Mucor hiemalis IFO 8448	
		Geotrichum candidum 1239	
L. reuteri	MIC	*Candida albicans*	Chung et al. (1989)
		Candida glabrata	
		Saccharomyces cerevisiae	
		Saccharomycopsis fibuligera	
		Fusarium samfucienum	
		Aspergillus flavus	

5. กลไกการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

รอยเทอรินมีหมู่อัลดีไฮด์ (aldehyde group) ที่มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาสูง (highly reactive) ดังนั้นจึงสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบต่าง ๆ ในสารละลายได้อย่างรวดเร็ว ดังที่ได้กล่าวแล้วว่ารอยเทอรินมีโครงสร้างโมเลกุล 3 รูปแบบด้วยกัน ได้แก่ HPA hydrated, HPA dimer และ acrolein และสามารถเปลี่ยนโครงสร้างไปมาได้ (รูปที่ 1) จึงยากที่จะวิเคราะห์ได้ว่าฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์นั้นเป็นผลจากรอยเทอรินที่อยู่ในโครงสร้างแบบใด อย่างไรก็ตามมีการเสนอสมมติฐานเกี่ยวกับฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของรอยเทอรินไว้ดังนี้

1) หมู่อัลดีไฮด์ของรอยเทอรินมีความไวต่อการทำปฏิกิริยากับหมู่ไธออล (thiol group) และเอมีนปฐมภูมิ (primary amine, R-NH_2) ดังนั้นรอยเทอรินจึงสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนและสารประกอบโมเลกุลเล็กที่มีหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้ได้ ทำให้โปรตีนหรือสารประกอบต่าง ๆ ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ

(Vollenweider and Lacroix, 2004) กลไกดังกล่าวที่เกิดขึ้นสามารถอธิบายได้ว่าเหตุใดรอยเทอรินจึงมีฤทธิ์ยับยั้งกว้างสามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา และไวรัส

2) รอยเทอรินที่อยู่ในรูปของ HPA dimer มีโครงสร้างคล้ายกับน้ำตาลไรโบสจึงไปขัดขวางแบบจำเพาะเจาะจงกับการทำงานของเอนไซม์ไรโบนิวคลีโอไทด์ รีดักเทส (ribonucleotide reductase) โดยรอยเทอรินทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) กับเอนไซม์ดังกล่าว ซึ่งตามปกติแล้วเอนไซม์ไรโบนิวคลีโอไทด์ รีดักเทสทำหน้าที่สร้างดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (deoxynucleotides) ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้าง DNA ของเซลล์ ด้วยเหตุนี้รอยเทอรินจึงมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด (Talarico and Dobrogosz, 1989)

6. การประยุกต์ใช้รอยเทอรินในอาหาร

การศึกษาเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้รอยเทอรินส่วนใหญ่แล้วมักเติมรอยเทอรินลงในผลิตภัณฑ์นมหรือผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ซึ่งอาจเติมเพียงรอยเทอรินชนิดเดียวหรือเติมร่วมกับสารต้านจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น กรดแล็กติก แบคเทอริโอซิน (bacteriocins) เป็นต้น เพื่อส่งเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ร่วมกัน (synergistic effect) และเติมในรูปของแบคทีเรียที่มีชีวิตซึ่งมีความสามารถสร้างรอยเทอรินในระหว่างกระบวนการผลิต โดยมีการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของรอยเทอรินต่อการเจริญของจุลินทรีย์แกรมบวก (*Listeria monocytogenes* Ohio serotype 4b และ *Staphylococcus aureus* CECT 4013) และแกรมลบ (*E. coli* O157:H7 ATCC 43894, *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* CECT 409, *Yersinia enterocolitica* CECT 559, *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* CECT 398 และ *Campylobacter jejuni* LMG 6629) ผลการวิจัยในนม พบว่าการเติมรอยเทอริน 8 AU/ml ในนมที่มีแบคทีเรียแกรมบวกบ่มที่ 37°C รอยเทอรินแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต (bacteriostatic activity) กับ *L. monocytogenes* และแสดงฤทธิ์ฆ่าเชื้อ (bactericidal activity) เล็กน้อยต่อ *S. aureus* ในขณะที่การเติมรอยเทอรินลงในนมที่มีแบคทีเรียแกรมลบ รอยเทอรินแสดงฤทธิ์ฆ่าเชื้อได้ดีต่อ *E. coli* O157:H7, *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis*, *Y. enterocolitica*, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* และ *C. jejuni*. (Arqués et al., 2004) สำหรับนมที่เติมรอยเทอรินเข้มข้น 150 AU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 7°C เป็นเวลา 3 วัน ส่งผลให้จำนวน *L. monocytogenes* ลดลงประมาณ 4 log units และหลังจาก 5 วัน ไม่สามารถตรวจพบแบคทีเรียดังกล่าว การใช้รอยเทอรินที่มีความเข้มข้น 50 100 และ 150 AU/g สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในคอทเทจชีสได้ 2 3 และ 6 log units ตามลำดับ เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 7°C เป็นเวลา 7 วัน (El-Ziney and Debevere, 1998) นอกจากการใช้รอยเทอรินเป็นสารต้านจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวแล้วยังมีการใช้รอยเทอรินร่วมกับแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกด้วย โดยผลการศึกษาพบว่า การใช้รอยเทอรินร่วมกับไนซิน (nisin) แลคติซิน 481 (lacticin 481) หรือ เอนเทอโรซิน AS-48 (enterocin AS-48) มีฤทธิ์ส่งเสริมกันดีมากต่อการยับยั้ง *L. monocytogenes* การใช้รอยเทอรินร่วมกับไนซินมีฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้ง *S. aureus* และเมื่อศึกษาการเก็บรักษานมไว้ในอุณหภูมิตู้เย็นพบว่า การเติมรอยเทอรินและไนซิน มีฤทธิ์ส่งเสริมการยับยั้ง *L. monocytogenes* และ *S. aureus* ได้ดีมากเนื่องจากเชื้อก่อโรคดังกล่าวถูกยับยั้งการเจริญเติบโตทั้งหมด แสดงว่าการเติมสารต้านจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดลงนมแช่เย็นจะช่วยควบคุมการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (Arqués et al., 2011)

จากการศึกษาการผลิตรอยเทอรินในระหว่างการผลิตและการเก็บรักษานมที่เติมกลีเซอรอล 50 mM และนมที่เติมต้นเชื้อทางการค้า (commercial starter) ร่วมกับ *L. reuteri* สายพันธุ์ต่างๆที่สร้างรอยเทอรินได้ พบว่า *L. reuteri* มีชีวิตรอดและสามารถผลิตรอยเทอรินได้ในชีสและโยเกิร์ตโดย *L. reuteri* INIA P572 สามารถสร้างรอยเทอรินได้สูงสุดถึง 5.5 mM ในชีส และ *L. reuteri* INIA P579 สามารถสร้างรอยเทอรินได้สูงสุดถึง 1.5 mM ในโยเกิร์ต แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์จึงมีความโดดเด่นที่สามารถพัฒนาเป็นต้นเชื้อสำหรับใช้ในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์นม (Langa et al., 2013)

สำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์นั้นมีการศึกษาผลของต้นเชื้อผสมระหว่าง ต้นเชื้อปกติที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อ คือ *Pediococcus pentosaceus* และ *Staphylococcus carnosus* กับแบคทีเรียโปรไบโอติกในรูปของเซลล์ปกติและไมโครเอนแคปซูเลทเซลล์ (free และ micro-encapsulated cells) ได้แก่ *L. reuteri* และ *B. Longum* ต่อการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ในไส้กรอกหมักชนิดแห้ง (dry-fermented sausages) พบว่า การใช้เฉพาะต้นเชื้อ *P. pentosaceus* และ *S. carnosus* สามารถลดการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ลงประมาณ 1 log cfu/g ในระหว่างการหมักและลดลงอีก 0.7 log cfu/g ในระหว่างการทำแห้ง สำหรับใช้ *L. reuteri* ร่วม/หรือไม่ร่วมกับ *B. longum* ในรูปของเซลล์ปกติสามารถลดการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ได้ถึง 3 log cfu/g ซึ่งมากกว่าไมโครเอนแคปซูเลทเซลล์ที่ลดจำนวน *E. coli* O157:H7 ได้ 2.8 log cfu/g (Muthukumarasamy and Holley, 2007) นอกจากนี้พบการใช้รอยเทอรินร่วมกับกรดแล็กติกแสดงฤทธิ์ส่งเสริมกันในการต้านจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ได้ โดยฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของรอยเทอรินต่อ *E. coli* O157:H7 บนผิวของเนื้อหมูปรุงสุกจะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับกรดแล็กติก(El-Ziney et al., 1999)

เนื่องจากสารกลุ่มอัลดีไฮด์มีผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ในแง่ของการเป็นสารก่อการกลายพันธุ์ (mutagenic substance) จึงมีการศึกษาถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) อย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามสำหรับการศึกษาความเป็นพิษของรอยเทอรินนั้นยังมีค่อนข้างน้อย Chen et al. (2002) ได้ทดสอบความเป็นพิษของรอยเทอรินต่อไฟโบรบลาสของหนู (mouse fibroblast) พบว่ารอยเทอรินมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำกว่า glutaraldehyde ซึ่ง glutaraldehyde จัดเป็นสารอัลดีไฮด์ที่มีความสามารถในการก่อการกลายพันธุ์สูงที่สุด สำหรับการศึกษาความเป็นพิษของรอยเทอรินพบว่าความเข้มข้นของรอยเทอรินที่ทำให้หนูที่ใช้ทดสอบตายไปครึ่งหนึ่ง (median lethal concentration, LC_{50}) มีค่าประมาณ 236-287 mg/kg และผลกระทบในระยะยาวของรอยเทอรินต่อสุขภาพของมนุษย์ยังต้องมีการศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตามปัญหาหลักของความเป็นพิษของรอยเทอรินก็คือ การที่รอยเทอรินเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ acrolein (รูปที่ 1) ได้อย่างง่ายดาย acrolein จะทำปฏิกิริยากับสารที่มีหมู่ซัลไฮดริลนำไปสู่การเสียสมดุลของซัลเฟอร์ในเซลล์และทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิดที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าการได้รับ acrolein 1-2 mg/kg เข้าสู่ร่างกายจะก่อให้เกิดการระคายเคืองกับเนื้อเยื่อเมือก (mucosa) และความเข้มข้นของ acrolein ที่ทำให้หนูที่ใช้ทดสอบตายไปครึ่งหนึ่งมีค่าเท่ากับ 46 mg/kg ซึ่งมีค่าน้อยกว่ารอยเทอรินหลายเท่า แสดงให้เห็นว่า acrolein มีความเป็นพิษรุนแรงมากกว่ารอยเทอริน (Steven et al., 2011)

บทสรุป

แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกหลายชนิดสามารถสร้างรอยเทอรินได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* รอยเทอรินเป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งกว้างโดยยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา ไวรัส และโปรโตซัว ด้วยเหตุนี้จึงทำให้การศึกษาเพื่อคัดเลือกแบคทีเรีย กรดแล็กติกที่มีความสามารถในการผลิตรอยเทอรินรวมถึงการนำรอยเทอรินที่ได้ไปประยุกต์ใช้เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารได้รับความสนใจเป็นอย่างมากและมีรายงานการวิจัยเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตามยังขาดการศึกษาเกี่ยวกับคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารรวมถึงการวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสหลังการประยุกต์ใช้รอยเทอริน และถึงแม้ว่ารอยเทอรินจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ดีแต่ยังมีจุลินทรีย์ก่อโรคอีกหลายชนิดที่ยังไม่ได้รับการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งดังกล่าว ยิ่งไปกว่านั้นความปลอดภัยของรอยเทอรินต่อสุขภาพของมนุษย์เป็นอีกประเด็นสำคัญที่ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

เอกสารอ้างอิง

Arqués, J.L., Fernández, J., Gaya, P., Nuñez, M., Rodríguez, E., Medina, M. (2004). Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens. International Journal of Food Microbiology 95: 225-229.

Arqués, J.L., Rodríguez, E., Nuñez, M., Medina, M. (2011). Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk. Food Control 22: 457-461.

Axelsson, L.T., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J. and Lindgren, S.E. (1989). Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. Microbial Ecology in Health and Disease 2: 131-136.

Cadieux, P., Wind, A., Sommer, P., Schaefer, L., Crowley, K., Britton, R.A. and Reid, G. (2008). Evaluation of reuterin production in urogenital probiotic *Lactobacillus reuteri* RC-14. Applied and Environmental Microbiology 74(15): 4645-4649.

Chen, C.N, Sung, H.W., Liang, H.F. and Chang, W.H. (2002). Feasibility study using a natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* in sterilizing and crosslinking biological tissues. Journal of Biomedical Materials Research 61: 360-369.

Chimchang, J. (2012). Probiotic characterization of *Lactobacillus* isolates on cancer cell proliferation and antimicrobial activities. Master's Thesis, Srinakharinwirot University. Bangkok: 123 pp.

Chung T.C., Axelsson, L.T., Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J. (1989). *In vitro* studies on reuterin synthesis in *Lactobacillus reuteri*. Microbial Ecology in Health and Disease 2: 173-144.

Claisse, O. and Lonvaud-Funel, A. (2000). Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider. Food Microbiology 17: 513-519.

Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., Duboux, M. and Le Blay, G. (2007). Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. BMC Microbiology 7(101): 1-9.

Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S. and Le Blay, G. (2008). Glycerol induces reuterin production and decreases *Escherichia coli* population in an *in vitro* model of colonic fermentation

with immobilized human feces, FEMS Microbiology Ecology 63: 56-64.

Circle S.J., Stone L., Boruff, C.S. (1945). Acrolein determination by means of tryptophane. A colorimetric method. Industrial and Engineering Chemistry 17(4): 259-262.

Dexian, Z., Rui, L. and Jichang, L. (2012). *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and L22 display probiotic potential *in vitro* and protect against *Salmonella*-induced pullorum disease in a chick model of infection. Research in Veterinary Science 93: 366–373

Dicks, L.M. and Botes, M. (2010). Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. Beneficial Microbes 1: 11-29.

El-Ziney, M.G., Debevere, J.M. (1998). The effect of reuterin on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk and Cottage cheese. Journal of Food Protection 61: 1275-1280.

El-Ziney, M.G., van den Tempel, T., Debevere, J.M., Jakobsen, M. (1999). Application of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* 12002 for meat decontamination and preservation. Journal of Food Protection 62: 257-261.

Kang, M.-S., Oh, J.-S., Lee, S.-W., Lim, H.-S., Choi, N.-K. and Kim, S.-M. (2012). Effect of *Lactobacillus reuteri* on the Proliferation of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*. The Journal of Microbiology 50(1): 137-142.

Langa, S., Landete, J.M., Martín-Cabrejas, I., Rodríguez, E., Arqués, J.L. and Medina, M. (2013). *In situ* reuterin production by *Lactobacillus reuteri* in dairy products. Food Control 33: 200-206.

Martín, R., Olivares, M., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L. and Rodríguez, J.M. (2005). Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese. International Journal of Food Microbiology 104: 267- 277.

Muthukumarasamy, P. and Holley, R.A. (2007). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria. Food Microbiology 24: 82-88.

Nakanishi, K., Tokuda, H., Ando, T., Yajima, M., Nakajima, T., Tanaka, O. and Ohmomo, H. (2002). Screening of lactic acid bacteria having the ability to produce reuterin—Screening LAB to produce reuterin. Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria 13(1): 37-45.

Rasch, M., Métris, A., Baranyi, J. and Budde, B.B. (2007). The effect of reuterin on the lag time of single cells of *Listeria innocua* grown on a solid agar surface at different pH and NaCl concentrations. International Journal of Food Microbiology 113: 35-40.

Rodríguez, E., Arqués, J.L., Rodríguez, R., Nuñez, M. and Medina, M. (2003). Reuterin production by lactobacilli isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits. Letters in Applied Microbiology 37: 259-263

Ruas-Madiedo, P., Sanchez, B., Hidalgo-Cantabrana, C., Margolles, A., and Laws, A. (2012). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria and bifidobacteria. *In* Y.H. Hui (Ed.), Handbook of animal-based fermented food and beverage technology (2nd ed.). LLC: Taylor & Francis Group. pp. 125-152.

Saito, T. (2004). Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from the *Lactobacillus acidophilus* group and their applications to

functional foods. Animal Science Journal 75: 1-13.

Sauvageot, N., Gouffi, K., Laplace, J.-M. and Auffray, Y. (2000). Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. International Journal of Food Microbiology 55: 167-170.

Schaefer, L., Auchtung, T.A., Hermans, K.E., Whitehead, D., Borhan, B. and Britton, R.A. (2010). The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. Microbiology 156: 1589-1599.

Spinler, J.K., Taweechotipatr, M., Rognerud, C.L., Ou, C.N., Tumwasorn, S. and Versalovic, J. (2008). Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. Anaerobe 14: 166-171.

Stevens, M., Vollenweider, S. and Lacroix, C. (2011). The potential of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* as a broad spectrum preservative in food. Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation 129-160.

Talarico, T.L. and Dobrogosz, W.J. (1989). Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 33(5): 674-679.

Talarico, T.L., Casas, I.A., Chung, T.C. and Dobrogosz, W.J. (1988). Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 32(12): 1854-1858.

Tanaka, O., Komatsu, T., Oshibe, A., Cai, Y., Miyazaki, S. and Nakanishi, K. (2009). Production of 3-hydroxypropionaldehyde in silage inoculated with *Lactobacillus coryniformis* plus glycerol. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 73: 1494-1499.

Vollenweider, S., Lacroix, C. 2004. 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. Applied Microbiology and Biotechnology 64: 16-27.

Wessels, S., Axelsson, L., Hansen, B.E., De Vuyst, L., Laulund, S., Lähteenmäk, L., Lindgren, S., Mollet, B., Salminen, S. and von Wright, A. (2004). The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. Trends in Food Science and Technology 15: 498-505.

❑❑❑❑❑