ไนซิน: วัตถุกันเสียจากธรรมชาติ

Nisin: Natural Preservative

อรัญญา มิ่งเมือง*

ภาควิชาคหกรรมศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพ 10110

Arunya Mingmuang*

Department of Home Economics, Faculty of Science, Srinakarinwirot University, Bangkok 10110

บทคัดย่อ

ไนซินเป็นสารแบคเทอริโอซิน มีฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และสามารถใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหารได้ ไนซินมีโครงสร้างเป็นโพลีเปปไตด์ซึ่งไม่สามารถผลิตได้โดยการสังเคราะห์ทางเคมี การผลิตจึงทำได้โดยการหมักของแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* กล่าวได้ว่าไนซินเป็นวัตถุกันเสียธรรมชาติ ความปลอดภัยของการใช้ไนซินในอาหารทำให้สารนี้ได้รับการจัดให้อยู่ในกลุ่มสารที่ปลอดภัย หรือ GRAS (generally recognized as safe) ไนซินมีผลในการยับยั้งแบคทีเรีย แกรมบวกหลายชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium botulinum* และหากใช้ร่วมกับวิธีการอื่น จะสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดได้ การใช้ไนซินเป็นวัตถุกันเสียในอาหารต้องพิจารณาความเหมาะสมของสมบัติของอาหาร เนื่องจากประสิทธิภาพของไนซินในอาหารจะลดลงในสภาวะที่ความเป็นกรดด่างสูงขึ้น และสภาวะที่มีปริมาณไขมันสูง ข้อจำกัดดังกล่าวทำให้มีการศึกษาวิธีการอื่นๆ ในการใช้ไนซินนอกเหนือจากการเติมโดยตรงในอาหาร เช่น การตรึงในสารพาหะ การเติมไนซินลงในวัสดุบรรจุภัณฑ์อาหาร เป็นต้น

คำสำคัญ : ไนซิน แบคเทอริโอซิน สารยับยั้งจุลินทรีย์ วัตถุกันเสียในอาหาร

***Corresponding author.** E-mail:

Abstract

Nisin is a bacteriocin with antimicrobial activity and can be used as a food preservative. Its polypeptide structure cannot be synthesized chemically, so the nisin-producing bacteria, *Lactococcus lactis*, are used for nisin production. Nisin is natural preservative and is approved to be a GRAS (generally recognized as safe) because it involves in food products without any adverse effects. It is effective against many gram-positive pathogenic bacteria, especially *Listeria monocytogenes* and *Clostridium botulinum*. Moreover, combined with other treatments, nisin is also effective against some gram-negative pathogenic bacteria. Applications of nisin in food systems are restricted, because of food characteristics such as high pH or high fat content, due to its efficacy reduction. Immobilization of nisin on carriers or incorporation of nisin into packaging materials are alternative approaches instead of direct incorporation in food systems.

Keywords : nisin, bacteriocin, antimicrobial agent, food preservative

บทนำ

ความปลอดภัยของอาหารเป็นสิ่งที่นักวิทยาศาสตร์ให้ความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากเกี่ยวข้องกับสุขภาพของผู้บริโภคโดยตรง การเจ็บป่วยเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเป็นพิษก่อให้เกิดความสูญเสียทรัพย์สินหรือแม้แต่ชีวิต ถึงแม้ว่าผลิตภัณฑ์อาหารจะผ่านกระบวนการแปรรูปอย่างถูกสุขลักษณะ เพื่อให้เชื่อมั่นในความปลอดภัยก่อนเข้าสู่ตลาด แต่การปนเปื้อนของเชื้อโรคอาจเกิดขึ้นได้ระหว่างการขนส่งที่ไม่ระมัดระวัง รวมทั้งในระหว่างการวางสินค้าในร้านค้า หรือแม้แต่การเตรียมอาหารอย่างไม่ถูกสุขลักษณะ เพื่อให้อาหารมีความปลอดภัยมากขึ้นและเป็นการยืดอายุการวางขายผลิตภัณฑ์ได้มีการใช้วัตถุกันเสียชนิดต่างๆ เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และเชื้อที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญกับผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการบริโภควัตถุกันเสียสังเคราะห์ นักวิทยาศาสตร์จึงพยายามคิดค้นวัตถุกันเสียจากธรรมชาติ ที่มีความปลอดภัยมากขึ้น เพื่อลดความเสี่ยงของผู้บริโภคในเรื่องผลข้างเคียงของสารต่อสุขภาพ ในขณะเดียวกันยังคงสามารถเชื่อมั่นในความปลอดภัยของอาหาร และผลิตภัณฑ์ก็ยังคงมีอายุการเก็บที่เหมาะสม

ไนซิน (nisin) เป็นวัตถุกันเสียชนิดหนึ่งที่ได้รับการรับรองจาก U.S. FDA (U.S. Food and Drug Administration) ให้เป็นสารที่ปลอดภัย ที่เรียกว่า GRAS (generally recognized as safe) เนื่องจากได้มีการพิสูจน์ว่าไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายใดๆ ต่อผู้บริโภคเมื่อนำมาใช้ในอาหาร

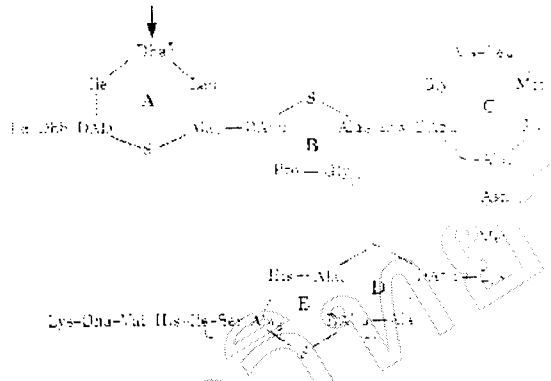
โครงสร้างโมเลกุล และสมบัติทางเคมี

ไนซินเป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่ม แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งหมายถึงโปรตีนที่ผลิตโดยแบคทีเรีย สารนี้มีสมบัติในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น ไนซินได้จากการหมัก *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้ในอาหารหมัก เช่น เนยแข็ง โครงสร้างโมเลกุลของไนซินมีลักษณะเป็นพอลิไซคลิก-เปปไตด์ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 เรซิดิว โดยมีกรดอะมิโน 4 ชนิดที่มีลักษณะเฉพาะ คือ dehydroalanine (Dha) dehydrobutyrine (Dhb) lanthionine และ β-methyllanthionine ซึ่งมีการเชื่อมต่อด้วย thioether linkage ทั้งหมด 5 ตำแหน่ง ไนซินมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3510 แต่ถ้าอยู่ในลักษณะที่เป็น dimer หรือ tetramer จะมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 7000 หรือ 14000 (Gross & Morell, 1971) แบคทีเรียสามารถผลิตไนซินได้หลายชนิด ได้แก่ ชนิด A B C D และ Z ไนซิน A และ B เป็นชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งจุลินทรีย์ ส่วนไนซิน C และ D มีประสิทธิภาพต่ำ ส่วนไนซิน Z มีโครงสร้างต่างจากชนิด A ที่กรดอะมิโนตำแหน่ง 27 ของไนซิน Z เป็นแอสพาราจีนแทนที่จะเป็น ฮิสทิดีน (ภาพที่ 1) โดยไนซิน A เป็นชนิดที่มีการผลิตในทางการค้า (Ray, 1992; Hurst & Hoover, 1993)

การศึกษาโครงสร้างของไนซิน โดยวิธี Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (Chan *et al.*, 1996) ทำให้ทราบว่าโมเลกุลของไนซิน A ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็น 5 วงแหวน โดยเกิดจากเรซิดิวของ lanthionine (DAla-S-Ala_s) ในวงแหวน A และ methyllanthionine (DAbu-S-Ala_s) ในวงแหวน B C D และ E รวมทั้งประกอบด้วยเรซิดิวของ dehydro amino acid ได้แก่ Dhb 2, Dha 5 และ Dha 33 (ภาพที่ 1)

การแตกตัวของโมเลกุลของไนซินทำให้ได้อนุพันธ์ของไนซิน (nisin derivative) หลายชนิด สารที่เกิดมากที่สุด คือ nisin (1-32) และ (des ΔAla5) nisin (1-32) (Chan *et al.*, 1989) โดยที่ nisin (1-32) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 32 เรซิดิว (ไม่มี Dhb 33 และ Lys 34) และมีหมู่เอไมด์ (amide group) เพิ่มขึ้น 1 หมู่ที่ Val 32 ส่วน

(des ΔAla5) nisin (1-32) มีกรดอะมิโน 32 เรซิดิวเช่นกัน แต่มี Pyr5-Leu6 แทน ΔAla5 (หรือ Dha 5)-Leu6 ไนซิน (1-32) จะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทัดเทียมกับไนซินปกติ แต่ (des ΔAla5) nisin (1-32) มีความสามารถในการยับยั้งน้อยกว่าประมาณ 500 เท่า การที่ความสามารถในการยับยั้งเชื้อของไนซินลดลงในระหว่างการเก็บ หรือเมื่อไนซินได้รับความร้อนอาจเกิดจากการเกิด (des ΔAla5) nisin (1-32) (Hurst & Hoover. 1993)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของไนซิน A
ที่มา: Chan *et al.*. 1996

การละลายและเสถียรภาพของไนซินขึ้นอยู่กับ pH โดยความสามารถในการละลาย และเสถียรภาพของไนซินที่อยู่ในสภาวะที่เป็นกรดจะสูงกว่าในสภาวะที่เป็นด่าง (Hurst. 1981) ที่ pH 2.5 ไนซินสามารถละลายได้ 12% และการละลายจะลดลงเหลือ 4% ที่ pH 5.0 ส่วนที่ pH เป็นกลาง หรือ เป็นด่าง ความสามารถในการละลายของไนซิน ลดลงใกล้ศูนย์ และที่ pH มากกว่า 7.0 โครงสร้างของไนซินมีการเปลี่ยนแปลงแบบผันกลับไม่ได้ และสูญเสียความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม การเก็บไนซินไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็นหรือแช่แข็ง จะคงความสามารถของไนซินอยู่ได้เป็นเวลานาน (Delves-Broughton. 1990)

เอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (proteolytic enzymes) จะทำลายความสามารถในการยับยั้งเชื้อของไนซิน โดยพบว่าเอนไซม์ pancreatin α-chymotrypsin และ ficin สามารถย่อยสลายโมเลกุลของไนซิน ในขณะที่ เอนไซม์ trypsin pepsin erepsin elastase และ carboxypeptidase จะไม่สามารถย่อยสลายโมเลกุลของไนซิน (Hurst & Hoover. 1993)

การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของไนซิน

ไนซินมีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด แต่ไม่มีผลต่อราอีสต์ ไวรัส และแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียที่ไนซินมีผลในการยับยั้ง มีหลายชนิดที่เป็นสาเหตุในการเกิดอาหารเป็นพิษ โดยเฉพาะ 2 ชนิดที่สำคัญ คือ *Clostridium botulinum* และ *Listeria monocytogenes* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นอันตรายถึงชีวิต แบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ไนซินมีผลในการยับยั้ง เช่น *Staphylococcus* sp. *Lactococcus* sp. *Lactobacillus* sp. *Leuconostoc* sp. *Pediococcus* sp. และ *Micrococcus* sp. (Delves-Broughton. 1990; Ray. 1992) แบคทีเรียมีความต้านทานไนซิน แตกต่างกันถึงแม้ว่าจะเป็นเชื้อในจีนัสเดียวกัน เช่น สปอร์ของ *Cl. botulinum* มีความต้านทานต่อไนซินต่ำกว่าสปอร์ของ *Cl. butyricum* หรือแม้แต่ในสปีชีส์เดียวกัน เช่น *Cl. botulinum* type E มีความต้านทานต่อไนซินน้อยกว่า *Cl. botulinum* type B และ *Cl. botulinum* type A มีความต้านทานต่อไนซินมากที่สุด (Scott & Taylor. 1981)

ความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกของไนซินเป็นผลจากการจับตัวของไนซินกับ lipid II ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการเกิดผนังเซลล์ (cell wall) ของแบคทีเรีย สารประกอบไนซิน-lipid II จะแทรกตัวเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ทำให้รบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดช่องหรือรู ซึ่งทำให้แบคทีเรียตายเนื่องจากการสูญเสียสารที่อยู่ภายในเซลล์ นอกจากนี้ในบางสายพันธุ์อาจมีการแตกสลายของเซลล์ สำหรับการที่แบคทีเรีย

แกรมลบมีความต้านทานต่อไนซิน เนื่องจากผนังเซลล์มีความต้านทานต่อการซึมผ่านมากกว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก โดยด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ มีชั้นของ glycerophospholipids และ lipopolysaccharide หุ้มอยู่ lipopolysaccharide ซึ่งอยู่ด้านนอกมีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic property) ทำหน้าที่กั้นโมเลกุลที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำและมีขนาดใหญ่ไม่ให้ผ่านเข้าไปได้ ไนซินซึ่งมีโมเลกุลใหญ่และมีสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic property) จึงไม่สามารถแทรกผ่านชั้น lipopolysaccharide เข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (Ray. 1992; Helander & Mattila-sandholm. 2000; Delves-Broughton. 2005) แม้ว่าไนซินไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ แต่เมื่อใช้ไนซินร่วมกับสาร EDTA หรือใช้ร่วมกับกระบวนการอื่นๆ เช่น การแช่แข็ง การให้ความร้อน และการลดความเป็นกรดด่าง พบว่าไนซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด เช่น *Salmonella* sp. *Escherichia coli* *Pseudomonas* sp. *Actinobacillus* sp. *Klesiella* sp. *Yersinia* sp. และ *Aeromonas* sp. (Stevens *et al*.. 1991) ทั้งนี้ เนื่องจากกระบวนการดังกล่าวทำให้ผนังเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรียแกรมลบเกิดบาดแผลขึ้น ทำให้ไนซินสามารถเข้าไปและทำให้รบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ ประสิทธิภาพของไนซินนอกจากจะขึ้นอยู่กับความต้านทานของเซลล์ของเชื้อแล้ว ยังขึ้นอยู่กับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย และความเข้มข้นของไนซิน ที่ระดับความเข้มข้นของไนซินคงที่ กล่าวคือเมื่อมีปริมาณของเชื้อมากขึ้น จำนวนของเซลล์ที่รอดตายจะมีปริมาณมากขึ้น ในทางตรงข้ามที่ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียคงที่ จำนวนเซลล์ที่ตายจะเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของไนซินสูงขึ้น จนกระทั่งสุดท้ายมีแต่เซลล์ที่มีความต้านทานมากกว่าเซลล์ปกติเท่านั้น จึงจะมีชีวิตรอด โดยทั่วไปกล่าวได้ว่า หากในระบบมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์มากขึ้น จะต้องใช้ปริมาณไนซินมากขึ้นด้วยเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อเหล่านั้น (Delves-Broughton. 2005)

ไนซินในทางการค้า

ตั้งแต่ ปี ค.ศ.1953 ได้มีการผลิตไนซินในทางการค้าในชื่อทางการค้าว่า "Nisaplin®" โดย Nisaplin® จะประกอบด้วยไนซินประมาณ 2.5% (มีส่วนประกอบของนมผงและเกลือ) และมีกิจกรรมของไนซิน 1 ล้าน IU (International Units) ต่อกรัม ผู้ผลิต Nisaplin® คือ บริษัท Danisco ประเทศอังกฤษ Nisaplin® มีเสถียรภาพดีเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25°ซ. ในที่ไม่มีแสง โดยไม่พบการสูญเสียกิจกรรมของไนซินภายในเวลา 2 ปี (Delves-Broughton. 2005) นอกจาก Nisaplin® แล้ว ในปัจจุบันมีการผลิต Nisaplin® ND ซึ่งเป็นไนซินในรูปแบบที่ปราศจากนมผง เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการให้มีส่วนผสมของนม และ Nisaplin® BS ซึ่งเป็นไนซินที่สามารถใช้ในผลิตภัณฑ์กลุ่มเบเกอรี่ และแป้งที่ผ่านความร้อน เช่น crumpets บริษัทอื่นๆ ที่มีการผลิตไนซินเชิงการค้า ได้แก่ Sigma-Aldrich และอีกหลายบริษัทในประเทศจีน ได้แก่ Lanzhou WeiRi Bio-engineering. Shanghai Chihon Biotechnology เป็นต้น

การใช้ไนซินในอาหาร

ไนซินได้รับการรับรองให้เป็นวัตถุเจือปนอาหารที่ปลอดภัย (generally recognized as safe. GRAS) ในผลิตภัณฑ์ชีสสเปรดที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ และในผลิตภัณฑ์ไข่เหลว (liquid eggs) โดยปริมาณสูงสุดที่บริโภคได้ต่อวันคือ 35.000 IU ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (1 มิลลิกรัมของไนซินบริสุทธิ์ เท่ากับ 40.000 International Units. IU. โดยประมาณ) นอกจากนี้ไนซินยังได้รับการรับรองโดย FAO / WHO Expert Committee on Food Additives ให้เป็นสารเจือปนอาหารหมายเลข 234 ประเทศ/กลุ่มประเทศที่อนุญาตให้ใช้ไนซิน ได้แก่ สหภาพยุโรป สหรัฐอเมริกา จีน อาเจนตินา บราซิล เวเนซูเอลา รวมทั้ง ออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม กฎหมายการใช้ไนซินในแต่ละประเทศมีความแตกต่างกัน เช่น ประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์

อนุญาตให้ใช้ไนซินได้ในหลายผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ครีม (ไม่เกิน 10 มก./กก.) ผลิตภัณฑ์แป้งแผ่น (ไม่เกิน 250 มก./กก.) และ ในผลิตภัณฑ์เนยแข็ง ผลิตภัณฑ์มะเขือเทศ เบียร์ ขนม ขนมขบเคี้ยว ซอส มายองเนส น้ำสลัด อนุญาตให้ใช้ในระดับที่เหมาะสมตาม GMP (Delves-Broughton. 2005) ส่วนในประเทศไทยอนุญาตให้ใช้ในผลิตภัณฑ์โพรเซสชีส ในปริมาณไม่เกิน 100 มก./กก.

การศึกษาการใช้ไนซินในอาหารเพื่อชะลอการเน่าเสีย และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษนั้น ได้มีการรวบรวมไว้ในบทความทางวิชาการอย่างกว้างขวาง (Hurst. 1981; Delves-Broughton. 1990; Ray. 1992; Delves-Broughton. 2005) การใช้ไนซินในอาหารจะมีประโยชน์ เมื่อเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุหลักในการเสื่อมเสีย หรือทำให้เกิดอาหารเป็นพิษในอาหารชนิดนั้น เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ต้านทานไนซิน

ในผลิตภัณฑ์นม โดยเฉพาะอย่างยิ่งโพรเซสชีสซึ่งใช้เนยแข็งเป็นวัตถุดิบหลักอาจมีการปนเปื้อนสปอร์ของ *Cl. botulinum* ซึ่งอาจถูกทำลายไม่หมดในระหว่างการผลิต และเนื่องจากผลิตภัณฑ์มักถูกบรรจุอยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ จึงทำให้สปอร์ที่ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อนเจริญเติบโตได้ จากงานวิจัยพบว่า การใช้ไนซินตั้งแต่ 12.5 มก./กก. ขึ้นไปสามารถป้องกันการเจริญ และการสร้างสารพิษของ *Cl. botulinum* ในขณะที่การใช้ไนซิน 5-20 มก./กก. สามารถควบคุมการเจริญของ *Bacillus* sp. ซึ่งเป็นเชื้อกลุ่มที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์นี้ (Delves-Broughton. 2005) นอกจากนี้ยังมีการใช้ไนซินในผลิตภัณฑ์นมอื่นๆ เช่น การเติมไนซิน 0.75-1.25 มก./กก. เพื่อยืดอายุการเก็บนมพาสเจอร์ไรซ์ (Delves-Broughton. 1990) ในขณะที่การใช้ไนซิน 2-2.5 มก./กก. ในผลิตภัณฑ์นมข้นจืดบรรจุกระป๋อง และนมสเตอริไลซ์ จะช่วยลดเวลาในการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน และลดการเน่าเสียที่เกิดจากสปอร์ที่ทนความร้อน (Gregory *et al.* 1964) ส่วนการเติมไนซิน 0.5-1.25 มก./กก. ในโยเกิร์ตหลังจากการหมักสิ้นสุดจะช่วยให้ผลิตภัณฑ์คงความเปรี้ยวที่เหมาะสม ไม่เกิดการแยกชั้น ทำให้อายุการเก็บนานขึ้น (Gupta & Prasad. 1988)

ผลิตภัณฑ์จากไข่ที่มีการแปรรูปในลักษณะที่แยกเปลือกออก หรือไข่เหลว (liquid egg) ผลิตภัณฑ์ชนิดนี้จะผ่านกระบวนการให้ความร้อนระดับพาสเจอร์ไรซ์ เพื่อทำลายเชื้อ *Salmonella* sp. อย่างไรก็ตามการให้ความร้อนระดับนี้ ไม่เพียงพอที่จะทำลายสปอร์ของแบคทีเรีย รวมทั้งแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ที่มีความทนทานต่อความร้อน เช่น *Enterococcus faecalis* การเติมไนซิน 2.5-5 มก./ลิตร ลงในผลิตภัณฑ์จะช่วยในการยืดอายุการเก็บ รวมทั้งยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษพวก *B. cereus* และ *L. monocytogenes* (Delves-Broughton. 2005)

ในการผลิตอาหารกระป๋องที่มีความเป็นกรดต่ำ เช่น ผักกระป๋อง มีความเสี่ยงที่อาจมีสปอร์ของเชื้อที่ทนความร้อนสูง และสามารถเจริญที่อุณหภูมิสูง เช่น *B. stearothermophilus* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของอาหารกระป๋องแบบ "flat sour" และ *Cl. thermosaccharolyticum* ซึ่งทำให้กระป๋องบวม การเติมไนซิน 2.5-5.0 มก./กก. จะช่วยชะลอการเสื่อมเสียจากการเจริญของเชื้อดังกล่าวได้ (Delves-Broughton. 1990) การเติมไนซินในปริมาณเดียวกันยังช่วยควบคุมการเจริญ และป้องกันการเน่าเสียที่เกิดจาก *Cl. pasteurianum* และ *B. coagulants* ในผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นกรดสูง เช่น มะเขือเทศกระป๋อง (Vas. 1963)

สำหรับในกรณีของผลิตภัณฑ์เนื้อ และผลิตภัณฑ์ประมง พบว่าไนซินช่วยในการลดการเสื่อมเสียที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก โดยการผสมไนซิน 1.25-6.25 มก./กก. ลงในส่วนผสมระหว่างการทำไส้กรอก หรือจุ่มไส้กรอกสุกลงในสารละลายไนซินความเข้มข้น 5.0-25.0 มก./ลิตร ช่วยยืดอายุการเก็บของไส้กรอกสุกที่บรรจุในสภาพสุญญากาศได้ ส่วนผลิตภัณฑ์ปลารมควัน เช่น ปลาแซลมอนรมควัน พบว่า การใช้ไนซินช่วยยับยั้ง

การเจริญของ *L. monocytogenes* ซึ่งสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ และไม่ถูกทำลายเนื่องจากกระบวนการรมควันที่ใช้ความร้อนต่ำได้ นอกจากนี้การใช้ไนซิน (25 มก./กก.) ร่วมกับการใช้ความร้อนต่ำสามารถป้องกัน *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์อื่น เช่น เนื้อกุ้งมังกร (Delves-Broughton, 2005)

การใช้ไนซินในผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นเป้าหมายในการยับยั้ง แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณการใช้ไนซิน และNisaplin® ในอาหาร (มก./กก. หรือ มก./ลิตร) และเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการยับยั้ง (ดัดแปลงจาก Delves-Broughton, 2005)

ชนิดของอาหาร	เชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย	ปริมาณการใช้ไนซิน	ปริมาณการใช้ Nisaplin®
โพรเซสชีส	*Clostridium* sp.	5-15	200-600
	Bacillus sp.		
นม และ	*Clostridium* sp.	0.25-10.0	10-400
ผลิตภัณฑ์นม	*Bacillus* sp.		
	Bacillus cereus	2.5-6.25	100-200
ซุป	*Clostridium pasteurianum*		
	Clostridium botulinum และ	2.5-5.0	100-200
อาหาร	*Thermosaccharolyticum*		
กระป๋อง	*Listeria monocytogenes*	2.5-5.0	100-200
	Lactic acid bacteria	5-25	200-1000
ซีสวีคอตตา	*Brochothrix thermosphacta*		
ไส้กรอกสุก	*Listeria monocytogenes*		
	Lactic acid bacteria	1.25-6.25	50-250
	Lactic acid bacteria	1.25-5	50-200
ซอส	Lactic acid bacteria	0.25-1.25	10-50
น้ำผลัด	eg. *Lactobacillus* sp.,		
เบียร์	*Pediococcus* sp.		

การใช้ไนซินนอกจากการเติมลงในอาหาร

สมบัติของอาหารมีผลต่อประสิทธิภาพของไนซิน โดยอาหารที่มี pH สูง มีไขมันมาก หรืออนุภาคของอาหารมีขนาดใหญ่จะทำให้ไนซินมีประสิทธิภาพลดลง Jung *et al.* (1992) พบว่าความสามารถของไนซินในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ลดลงอย่างชัดเจนในตัวอย่างน้ำนมที่มีปริมาณไขมันสูง ซึ่งการลดลงดังกล่าวเป็นผลจากสมบัติการชอบไขมันของไนซิน ทำให้ไปสร้างพันธะกับโมเลกุลของไขมันในผลิตภัณฑ์ได้ดี และการเติม Tween 80 ซึ่งมีสมบัติเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ลงในน้ำนมไขมันสูง ทำให้โมเลกุลไนซินมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีขึ้นรวมทั้งทำให้อัตราการสูญเสียไนซินช้าลง เนื่องจาก Tween 80 สามารถสร้างพันธะกับไขมันนมแทนไนซิน จึงช่วยยับยั้งการสูญเสียประสิทธิภาพของไนซินได้

การสูญเสียประสิทธิภาพของไนซินในอาหาร ทำให้เป็นข้อจำกัดในการใช้ประโยชน์ ดังนั้นนักวิจัยจึงพยายามหาวิธีอื่นๆ ในการใช้ไนซินในอาหาร นอกเหนือจากการเติมลงไปโดยตรง โดยใช้วิธีการตรึงไนซิน (immobilization) ในพาหะที่เหมาะสม การเติมไนซิน (incorporation) ลงในวัสดุบรรจุภัณฑ์ และการเคลือบ (coating) ไนซินบนบรรจุภัณฑ์หรือพื้นผิวที่สัมผัสอาหาร

Cutter and Siragusa (1996) ทดลองตรึงไนซินไว้ในเจลของแคลเซียมแอลจิแนต แล้วนำมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของ *Brochothrix thermosphacta* บนผิวของซากโค พบว่าไนซินตรึงรูปทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อดีกว่า และรักษาประสิทธิภาพที่ดีไว้ได้นานกว่าการใช้ไนซินลงบนผิวของซากโดยตรง สำหรับการที่ไนซินมีประสิทธิภาพลดลงอาจเกิดจากการสลายตัวของโครงสร้างโปรตีน เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอส รวมทั้งมีการดูดซับของไนซินลงบนโปรตีน หรือไขมันในเนื้อสด Wan *et al.* (1997) พบว่า การเตรียมไนซินตรึงรูปโดยเติมลงในส่วนผสมของแคลเซียมแอลจิแนต นำมาทำให้แห้ง และบดให้เป็นผงละเอียดขนาดเล็กกว่า 150 ไมครอน สามารถป้องกันการสูญเสียประสิทธิภาพของไนซินที่เกิดจากเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้ในเนื้อสด Natrajan and Sheldon (2000) ศึกษาการใช้ฟิล์มห่อชนิดโพลิไวนิลคลอไรด์ (PVC) ที่เคลือบฟิล์มด้วยสารละลายไนซินในการห่อน่องไก่สด พบว่า การใช้ฟิล์ม

ที่มีไนซินช่วยยืดอายุการเก็บของน่องไก่ให้นานขึ้น บรรจุเนยแข็งในสภาวะสุญญากาศ พบว่า การใช้บรรจุภัณฑ์ดังกล่าวสามารถลดปริมาณเชื้อ *Listeria innocua* และ *Staphylococcus aureus* ในเนยแข็งได้ประมาณ 2 และ 1.5 log CFU/g ตามลำดับ Kim *et al.* (2002a) เติมไนซินลงในสารละลายของโพลิเอไมด์ ซึ่งใช้เคลือบบนฟิล์มโพลิเอทิลีน แล้วศึกษาการใช้ฟิล์มดังกล่าวในการห่อหอยนางรมสด และเนื้อวัวบด พบว่า การใช้ฟิล์มที่มีไนซินสามารถชะลอการเพิ่มจำนวนของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและโคลิฟอร์ม เมื่อเก็บที่ 3 และ 10°ซ. Guerra *et al.* (2005) ศึกษาการดูดซับของไนซินบ Scannell *et al.* (2000) ศึกษาการดูดซับไนซินบนฟิล์มโพลิเอทิลิน/โพลิเอไมด์ และใช้ในรูปของถุงนพื้นผิวที่มักมีการสัมผัสกับอาหาร ได้แก่ สแตนเลส พลาสติกโพลิเอทิลีนเทอร์ฟะทาเลต (polyethylene terephathalate, PET) และยาง พบว่ายางสามารถดูดซับไนซินไว้บนผิวได้มากกว่า PET ในขณะที่สแตนเลสดูดซับไนซินไว้ได้น้อยที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าวัสดุที่มีการดูดซับไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของ *Enterococcus hirae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และการเกาะติดของ *Listeria monocytogenes* ลดลง การใช้ขวด PET ที่มีไนซินดูดซับอยู่บนผิว บรรจุนมขาดมันเนย ทำให้ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (total aerobic count) ลดลง 1.4 log CFU/g หลังการเก็บที่ 4°ซ. เป็นเวลา 24 วัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเติมไนซินในวัสดุบรรจุภัณฑ์ชนิดอื่น เช่น Saranณ F-310 resin (Limjaroen, 2003) โพลิเมอร์อะครีลิก และโคโพลิเมอร์อะซิเตท-เอทิลีนเคลือบบนกระดาษ (Kim *et al.*, 2002b) เป็นต้น

สรุป

ไนซินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของอาหาร รวมทั้งชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ การใช้ไนซินเป็นวัตถุกันเสียในอาหาร มีข้อดีในแง่ของความปลอดภัย และได้รับการรับรองและอนุญาตให้ใช้ในอาหารในประเทศต่างๆ ทั่วโลก การที่ไนซินไม่ใช่สารที่ได้จากการสังเคราะห์โดยวิธีทางเคมี เป็นข้อได้เปรียบเนื่องจากผู้บริโภคในปัจจุบันมีความสนใจในเรื่องความปลอดภัยของวัตถุเจือปนที่ใช้ในอาหารมากขึ้น ข้อจำกัดของการใช้ไนซินในอาหารบางชนิด สามารถหลีกเลี่ยงได้โดยการเติมไนซินลงในบรรจุภัณฑ์ แทนการเติมในอาหารโดยตรง นอกจากนี้การใช้ไนซินร่วมกับวิธีการอื่น เช่น การใช้ความร้อนในระดับต่ำ การใช้ร่วมกับวัตถุเจือปนอาหารบางชนิด ทำให้ไนซินมีประสิทธิภาพมากขึ้น การศึกษาการใช้ไนซินในอาหารร่วมกับวิธีการแปรรูประดับต่ำทำให้สามารถผลิตอาหารที่ผ่านการแปรรูปเพียงเล็กน้อย และมีความปลอดภัยมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

Chan, W.C., Bycroft, B.W., Lian, L.Y., & Roberts, G.C.K. (1989). Isolation and characterization of two degradation products derived from the peptide antibiotic nisin. *FEBS Letters*, *252*, 29-36.

Chan, W.C., Dodd, H.M., Horn, N., Maclean, K., Lian, L.Y., Bycroft, B.W., Gasson, M.J., & Roberts, G.C.K. (1996). Stucture-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: role of dehydroalanin 5. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(8), 2966-2969.

Cutter, C. N., & Siragusa, G.R. (1996). Decontamination of *Brochothrix thermosphactra* on beef surfaces following immobilization of nisin in calcium alginate gels. *Letters in Applied Microbiology*, *23*, 9-12.

Delves-Broughton, J. (1990). Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technology*, *44*, 100, 102, 104, 106, 108, 111-112, 117.

Delves-Broughton, J. (2005). Nisin as a food preservative. *Food Australia, 57*(12), 525-527.

Gregory, M.E., Henry, K., & Kon, S.K. (1964). Nutritive properties of freshly prepared and stored evaporated milk manufactured by a normal commercial procedure or by reduced thermal process in the presence of nisin. *Journal of Dairy Research, 31*, 113-119.

Gross, E., & Morell, J.L. (1971). The structure of nisin. *Journal of the American Chemical Society, 93*, 4634-4635.

Guerra, N.P., Araujo, A.B., Barrera, A.M., Agrasar, A.T., Macias, C.L., Carballo, J., & Pastrana, L. (2005). Antimicrobial activity of nisin adsorbed to surfaces commonly used in the food industry. *Journal of Food Protection, 68*(5), 1012-1019.

Gupta, R.K., & Prasad, D.N. (1988). Incorporation of nisin in stirred yogurt. I. Effect on lactic and nonlactic organisms during storage. *Cultured Dairy Products Journal, 23*, 17.

Helander, I.M., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Permeability barrier of the gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. *International Journal of Food Microbiology, 60*, 153-161.

Hurst, A. (1981). Nisin. *Advanced in Applied Microbiology, 27*, 85-123.

Hurst, A., & Hoover, D.G. (1993). Nisin. In P.M. Davidson and A.L. Branen (eds). *Antimicrobials in Foods*. (pp 369-394). New York: Mercel Dekker.

Jung, D.S., Bodyfelt, F.W., & Daeschel, M.A. (1992). Influence of fat and emulsifier on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *Journal of Dairy Research, 75*, 387-393.

Kim, Y.M., An, D.S., Park, H.J., Park, J.M., & Lee, D.S. (2002b). Properties of nisin-incorporated polymer coating as antimicrobial packaging materials. *Packaging Technology and Science, 15*(5), 247-254.

Kim, Y.M., Paik, H.D., & Lee, D. S. (2002a). Shelf-life characteristics of fresh oysters and ground beef as affected by bacteriocin-coated plastic packaging film. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 82*(9), 998-1002.

Limjaroen, P. (2003). Development of a food packaging coating material with antimicrobial properties. *Journal of Plastic Film and Sheeting, 19*(2), 95-109.

Natrajan, N., & Sheldon, B.W. (2000). Efficacy of nisin-coated polymer films to inactivate *Salmonella* Typhimurium on fresh broiler skin. *Journal of Food Protection, 63*(9), 1189-1196.

Ray, B. (1992). Nisin of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* as a food preservative. In B. Ray, M. Daeschel (eds). *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. (pp 207-264). Boca Raton: CRC Press.

Scannell, A.G., Hill, C., Ross, R.P., Marx, S., Hartmeier, W., & Arendt, K. (2000). Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins lacticin 3147 and nisaplin. *International Journal of Food Microbiology, 60*, 241-249.

Scott, V.N., & Taylor, S.L. (1981). Effect of nisin on outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. *Journal of Food Science, 46*, 117-120.

Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., & Klaenhammer, T.R. (1991). Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology, 57*, 3613-3615.

Vas, K. (1963). Use of nisin in the thermal preservation of tomato products. *Fruchtsaft-Indusrrie ver Confructa, 8*, 73-77.

Wan, J., Gordon, J.B., Muirhead, K., & Hickey, M.J. (1997). Incorporation of nisin in micro-particle. *Letters in Applied Microbiology, 24*, 153-158.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University