

Alicyclobacillus กับความท้าทายในอุตสาหกรรมอาหาร (Alicyclobacillus - a New Challenge for the Food Industry)

โดย

สิริพร สอนเสาวภาคย์

สถาบันคั้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำนำ

Alicyclobacillus acidoterrestris หรือเดิมเรียกว่า *Bacillus acidocaldarius* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถอยู่รอดจากขบวนการพาสเจอร์ไรซ์เข้มข้นในการผลิตน้ำผลไม้และน้ำผลไม้เข้มข้น มีรายงานเกี่ยวกับเชื่อนี้ว่าเป็นสาเหตุการเสียน้ำผลไม้เป็นครั้งแรกจากประเทศเยอรมันในปีพ.ศ. 2523 ตั้งแต่นั้นมีรายงานต่อเนื่องเป็นระยะว่า เชื้อนี้เป็นสาเหตุการเสียน้ำผลไม้ประเภทมีอายุการเก็บนาน (shelf – stable foods) เช่นน้ำผลไม้ มะเขือเทศกระป๋อง เครื่องดื่มเกลือแร่ (Yamazaki et al., 1996 ; Walls and Chuyate , 2000) และมีการแยกเชื้อนี้ได้จากน้ำและถ่านกรองที่ใช้ในการกรองน้ำ ลักษณะเด่นของน้ำผลไม้ที่เกิดการเสียน้ำจากเชื้อนี้ คือ จะมีกลิ่นและรสผิดปกติ โดยจะมีกลิ่นคล้ายยา น้ำยาฆ่าเชื้อ หรือกลิ่นคล้ายดิน

โดยทั่ว ๆ ไปน้ำผลไม้จะมีอายุการเก็บได้นาน แม้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากการผสมผสานระหว่างขบวนการให้ความร้อนและสภาพความเป็นกรดของน้ำผลไม้ ความเป็นกรดของน้ำผลไม้ตามธรรมชาติจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั่ว ๆ ไปได้ ยกเว้น ยีสต์ รา และแบคทีเรียที่ชอบกรด แต่ขบวนการพาสเจอร์ไรซ์เข้มข้น รวมทั้งการบรรจุขณะร้อน (hot –fill–hold process) จะทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ทนความร้อน เช่น แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ยีสต์ และราบางชนิดได้ จะมีแต่เชื้อราบางชนิดที่ทนความร้อนสามารถอยู่รอดได้ ซึ่งอาจทำให้น้ำผลไม้เน่าเสีย ดังนั้นน้ำผลไม้ที่ผ่านขบวนการให้ความร้อนอย่างเหมาะสม จัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิเหมาะสม จะสามารถอยู่ในสภาพปลอดภัยทางการค้า (commercially sterile) ในช่วงอายุการเก็บที่ระบุไว้จนกว่าจะมีการเปิดภาชนะบรรจุน้ำผลไม้ขึ้นหรือหมดอายุการเก็บ

A. acidoterrestris เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ชอบกรด ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต เคลื่อนไหวได้ ไม่ทำให้เกิดโรค สร้างสปอร์รูปร่างเป็นท่อน โดยสปอร์จะอยู่ตรงกลางหรือส่วนปลายของเซลล์ สปอร์ของเชื้อนี้จะทนความร้อนได้ดี (Silva et al., 1999) สามารถมีชีวิตอยู่รอดจากขบวนการให้ความร้อนในการผลิตน้ำผลไม้ เจริญเติบโตได้ดีที่ pH 2.5 – 5.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 46 °ซ. มีค่า D ที่ 87.8°ซ. 11 นาที 91.1°ซ. 3.8 นาที และ 95°ซ. 1 นาที ตามลำดับในน้ำเบอรั (McIntyre et at., 1995) สปอร์ของเชื้อนี้พบได้ทั่วไปในดิน (Hippchen et at., 1981) และผ่านเข้าสู่โรงงานโดยติดมากับเปลือกของผลไม้ หรือน้ำผลไม้เข้มข้น (Doyle , 1999) ปัจจุบันการเจริญเติบโตของอุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้มีเพิ่มมากขึ้นทุกปี อุบัติการณ์การเสียน้ำผลไม้โดยเชื้อ *A. acidoterrestris* นับวันจึงมีเพิ่มขึ้นตามลำดับ ก่อให้เกิดการสูญเสียด้านเศรษฐกิจ (แม้จะไม่เกี่ยวข้องในด้านความปลอดภัยในการบริโภคก็ตาม) ซึ่งนับเป็นความท้าทายอย่างยิ่งสำหรับวงการอุตสาหกรรมอาหาร

การแยกเชื้อ *Alicyclobacillus acidoterrestris*

A. acidoterrestris เจริญเติบโตได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (pH 3.5) และ Orange Serum Agae (pH 5.5 หรือน้อยกว่า) และถ้าเติม 0.5% ซูโครส จะกระตุ้นให้เจริญดีขึ้น (Jensen , 2000) โคโลนีมีลักษณะกลมมน ขาวขุ่น มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 – 3 มิลลิเมตร เจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 37 - 50 °ซ. pH 2.5 – 6.0 และหยุดการเจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20°ซ. เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (strict aerobe) คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อนี้แสดงใน Table 1

Table 1. Biochemical profile of *A. acidoterrestris* .

Test	Results
Catalase	+
Voges – Proskauer	+
Nitrate reductase	-
Phenylalanine deaminase	-
Hydrogen sulfide formation	-
Indole formation	+
Ornithine decarboxylase	+/-
Lysine decarboxylase	-
Malonate utilization	-
Urease activity	-
Esculin hydrolysis	+/-
ONPG beta – galactosidase	-
L- arabinose fermentation	+/-
D- glucose fermentation	+/-
D- mannitol fermentation	+/-
D- xylose fermentation	+/-
Trehalose fermentation	+/-

Note : + = positive
 - = negative
 +/- = variable

ลักษณะการเสียของน้ำผลไม้

น้ำผลไม้ที่มีสาเหตุการเสียจากเชื้อ *A. acidoterrestris* จะมีกลิ่นคล้ายยา น้ำยาฆ่าเชื้อหรือกลิ่นคล้ายดิน ซึ่งเกิดจากมีการผลิตสาร halophenols 2 ชนิดคือ 2, 6 - dibromophenol และ 2, 6 - dichlorophenol จากรายงานของ Jensen (2000) พบว่าในน้ำผลไม้ปกติจะไม่มีสารทั้ง 2 ชนิดนี้ แต่ในน้ำผลไม้ที่เสียจากเชื้อนี้พบ 2, 6 – dibromophenol 2 –20 ng/L และพบ 2, 6 - dichlorophenol 16 – 40 ng/L และยังพบว่า 1 สปอร์ใน 10 mL ของน้ำผลไม้ก็เพียงพอที่จะทำให้น้ำผลไม้เน่าเกิดการเสียได้

Pettipher et al. (1997) รายงานว่า *A. acidoterrestris* นอกจากจะสร้างสารพวก halophenols แล้ว ยังสร้างสาร guaiacol ซึ่งมีกลิ่นคล้ายรมควัน และพบความเข้มข้นของสารนี้มากกว่า 1,000 เท่าของสาร halophenols พบว่ามี guaiacol ในน้ำส้มมากกว่าในน้ำแอปเปิ้ล และพบในน้ำผลไม้ที่บ่มที่อุณหภูมิ 46°C. มากกว่า 37°C. ดังแสดงใน Table 2

Table 2. Production of guaiacol in Australian juices after 27 days at 46 °C. and 37 °C.

Isolate	Guaiacol ($\mu\text{g/L}$ juice)	
	Orange juice	Apple juice
Incubation 46° C.		
Australian isolate 1	88	22
Australine isolate 2	43	16
German type strain	38	4
Uninoculated juice	ND	ND
Incubation 37° C.		
Australian isolate 1	38	20
Australian isolate 2	30	5
German type strain	30	4
Uninoculated juice	ND	ND

^a ND = not detect

Pettipher et al. ยังรายงานด้วยว่าสารตั้งต้น (precursor) ในการผลิต guaiacol น่าจะเป็นกรดอะมิโน tyrosine โดยเขาพบว่าในน้ำแอปเปิ้ลจะมี tyrosine อยู่ประมาณ 4.6 $\mu\text{g/mL}$ และน้ำส้มจะมีอยู่ประมาณ 3.4 – 13.5 $\mu\text{g/mL}$ ถ้าในสภาวะที่เหมาะสมปริมาณ tyrosine ในระดับนี้จะเพียงพอที่ทำให้เกิดการสร้างสาร guaiacol ขึ้นมา

การควบคุม

ผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ ซึ่งเดิมจัดเป็นอาหารที่มีอายุการเก็บนาน เกิดการเสียโดยเชื้อ *A. acidoterrestris* ขึ้นได้ จึงนับเป็นความท้าทายในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากความร้อนที่สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อนี้จะทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสที่เปลี่ยนไป ไม่เป็นที่ยอมรับ ทำให้การใช้ความร้อนเพิ่มขึ้นไม่สามารถนำมาปรับใช้ได้ ดังนั้นจึงมีความพยายามทุกวิถีทางที่จะป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อนี้ ตลอดจนการป้องกันกลิ่นผิดปกติที่เกิดขึ้น โดยวิธีการดังต่อไปนี้

1. การใช้กรดอินทรีย์

Yamazaki et al. (1996) รายงานว่า การใช้ 0.1% ของกรด lactic , adipic และ succinic สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อนี้ได้ในระยะแรก แต่หลังจาก 36 ชั่วโมงเชื้อนี้จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีเหมือนเดิม สำหรับกรด ascorbic พบว่าถ้าเติม 10 mg/100 mL ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต

ของเชื้อนี้ได้ แต่ถ้าเติมมากกว่า 15 mg/100mL จึงจะยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยกรด ascorbic จะไปลด redox potential ของน้ำผลไม้ลง กรดอินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างได้ผลคือ 0.1% acetic acid ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ผลิตภัณฑ์ที่มี acetic acid เป็นองค์ประกอบ เช่น น้ำสลัด จะไม่เกิดการเน่าเสียโดยเชื้อนี้

2. การใช้ nisin

Komitopoulou et al. (1999) รายงานว่า nisin สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อ *A. acidoterrestris* ได้ โดยพบว่า การใช้ 5 IU nisin /mL ที่อุณหภูมิ 25°C. จะหยุดการเจริญเติบโตของสปอร์ของเชื้อนี้ทั้งในน้ำแอปเปิ้ลและน้ำส้ม (1 IU nisin เท่ากับ 1µg nisin ที่ผลิตเป็นการค้า) ถ้าใช้ nisin 50 IU nisin/mL ที่อุณหภูมิ 44°C. ในน้ำผลไม้ทั้ง 2 ชนิด มีการเจริญของเชื้อเกิดขึ้นเล็กน้อย แต่เมื่อใช้ 100 IU จะหยุดการเจริญของเชื้อได้ และพบด้วยว่า ในสภาพที่มี nisin จะทำให้สปอร์ทนต่อความร้อนได้น้อยลง

ในประเทศออสเตรเลียอนุญาตให้มีการใช้ nisin เป็นวัตถุเจือปนในอาหารที่มี pH ต่ำกว่า 4.5 ได้ ดังนั้นจึงมีการใช้ nisin ในการควบคุมเชื้อ *A. acidoterrestris* ในน้ำผลไม้ แต่อย่างไรก็ตามโรงงานเองอาจไม่ต้องการให้มีวัตถุกินเสียในผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งตลาดส่งออก ประเทศคู่ค้าไม่อนุญาตให้ใช้ nisin เป็นวัตถุกินเสีย

3. การใช้ disinfectants ในวัตถุดิบ

Doyle (1999) รายงานว่าการใช้ 1% H₂O₂ , 200 ppm Cl₂ และ 500 ppm acidified sodium chlorite มีผลทำให้สปอร์ของเชื้อนี้ลดลง 0.4 ถึง 2.4 log เมื่อทำการทดลองที่อุณหภูมิ 23 °C. ระยะเวลาสัมผัส 10 นาที

ในกรณีของแอปเปิ้ล ผิวของแอปเปิ้ลเป็น hydrophobic ปกคลุมด้วยสารธรรมชาติ cutin ดังนั้นการใช้ 2% H₂O₂ จะไม่มีผลต่อสปอร์ที่อยู่บนผิวของแอปเปิ้ล (ถึงแม้จะไม่เคลือบ wax) ส่วนการใช้ 500 ppm Cl₂ , 1,200 ppm acidified sodium chlorite มีผลในการยับยั้งสปอร์บนผิวของแอปเปิ้ลที่ไม่เคลือบ wax แต่ก็ลดลงได้น้อยกว่า 1 log Doyle แนะนำให้ใช้สารประเภท surfactant ล้างและถูแรง ๆ บนผิวของผลไม้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ sanitisers ในการยับยั้งการเจริญของสปอร์

บทสรุป

ปัจจุบันการป้องกันการเสียของน้ำผลไม้จากเชื้อ *A. acidoterrestris* ทำได้โดย การกำจัดเชื้อออกจากวัตถุดิบ การใช้วัตถุกินเสีย การควบคุมอุณหภูมิการเก็บ ตลอดจนการควบคุมให้มีปริมาณออกซิเจนในภาชนะบรรจุเหลือน้อยที่สุด ในอนาคตข้างหน้าถ้าเราเข้าใจ biochemical pathway ของการสังเคราะห์สารที่ทำให้เกิดกลิ่นผิดปกติในน้ำผลไม้ อาจทำให้การเสียของน้ำผลไม้จากเชื้อ *A. acidoterrestris* ลดลงได้

บรรณานุกรม

- Doyle , M.P. 1999. Inactivation of Alicyclobacillus Spores. At a glance newsletter .
Center for Food Safety and Quality Enhancement, Univ. Georgia, Griffin , U.S.A.
8 : (2) 1.
- Hippchen , B., Roll , A. and Poralla , K. 1981. Occurrence in Soil of Thermo –
acidophilic Bacilli Possessing w – Cyclohexane Fatty Acids and Hopanoids.
Arch. Microbiol. 129 : 53 – 55.
- Jensen , N. 2000. Alicyclobacillus in Australia. *Food Aust.* 52 : 282 – 285.
- Komitopoulou, E., Boziaris , I.S. , Davies , E.A., Delves – Broughton , J. and Adams ,

- M.R.1999. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in Fruit Juices and Its Control by Nisin. *Int. J.Food Sci. and Technol.* 34 : 81 – 85 .
- McIntyre , S., Ikawa , J.Y., Parkinson , N ., Haglund , J. and Lee, J. 1995. Characteristics of An Acidophilic Bacillus Strain Isolated from Shelf Stable Juices. *J. Food Prot.* 58 : 319 – 321.
- Pettipher , G.L. Osmundson , M.E. and Murphy , J.M. 1997. Methods for the Detection and Enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and Investigation of Growth and Production of Taint in Fruit Juice and Fruit Juice – Containing Drinks. *Lett. Appl. Microbiol.* 24 : 185 –189.
- Silva , F.M., Gibbs , P., Vieira , M.C. and Silva , C.L.M. 1999. Thermal Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* Spores Under Different Temperature , Soluble Solids and pH Conditions for the Design of Fruit Processes. *Int. J. Food Microbiol.* 51 : 95 – 103.
- Walls , I. and Chuyate , R. 2000. Spoilage of Fruit Juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris* . *Food Aust.* 52 : 286 – 288.
- Yamazaki , K., Teduka , H. and Shinano , H. 1996. Isolation and Identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from Acidic Beverages. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60 : 543 – 545.