อะลิไซโคลบาซิลลัส: แบคทีเรียที่เป็นปัญหาต่ออุตสาหกรรมน้ำผลไม้
Alicyclobacillus: A Significant Bacteria for Fruit Juice Industry

กิติพงศ์ อัศตรกุล*
Kitipong Assatarakul*

บทนำ

น้ำผลไม้ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นในสังคมปัจจุบัน เนื่องจากการดำเนินชีวิตของคนในปัจจุบันที่เปลี่ยนแปลงไปจากอดีต ผู้บริโภคนิยมบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารที่มีประโยชน์เพื่อสุขภาพเพิ่มมากขึ้น และน้ำผลไม้ก็อุดมไปด้วยวิตามินและเกลือแร่ซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกาย นอกจากนี้น้ำผลไม้ยังเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความสะดวกและสามารถหาซื้อได้ง่าย จึงเป็นอีกปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้ผู้บริโภคนิยมดื่มน้ำผลไม้มากยิ่งขึ้น มูลค่าการตลาดของน้ำผลไม้ในประเทศไทยมีอัตราเพิ่มขึ้นทุกปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2550 จนถึงปัจจุบัน และมูลค่าการตลาดของน้ำผลไม้ในประเทศไทยมีมูลค่าประมาณ 10,000 ล้านบาทต่อปี แต่อย่างไรก็ตามคุณภาพและความปลอดภัยของน้ำผลไม้ก็ยังเป็นสิ่งสำคัญที่ส่งผลต่อความเชื่อมั่นของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ ผู้ผลิตน้ำผลไม้เชื่อมั่นว่าคุณลักษณะของน้ำผลไม้ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ ประมาณ 3.5-4.4 และความร้อนที่ใช้ในกระบวนการพาสเจอไรซ์ (ความร้อนที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค) สามารถป้องการเจริญของสปอร์ของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสีย เช่น *Bacillus coagulans* และ *Clostridium pasteurianum* ได้ จนกระทั่งในปี พ.ศ. 2525 มีการรายงานเป็นครั้งแรกว่าอะลิไซโคลบาซิลลัส (*Alicyclobacillus* spp.) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคแต่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์อาหารสามารถทำให้เกิดการเสื่อมเสียของน้ำแอปเปิ้ลพาสเจอไรซ์เป็นจำนวนมาก ส่งผลให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ และสปอร์ของอะลิไซโคลบาซิลลัสสามารถทนต่อสภาวะและความร้อนที่ใช้ในกระบวนการพาสเจอไรซ์น้ำผลไม้หลายชนิด เช่น น้ำแอปเปิ้ลและน้ำส้ม ทำให้ผู้ผลิตกำหนดอะลิไซโคลบาซิลลัสเป็นจุลินทรีย์เป้าหมายสำหรับการผลิตน้ำผลไม้พาสเจอไรซ์ ในบทความนี้จะกล่าวถึงประวัติการค้นพบอะลิไซโคลบาซิลลัส สปีชีส์ต่างๆ ของอะลิไซโคลบาซิลลัสในผลิตภัณฑ์อาหาร สรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา ความเป็นพิษ ลักษณะการเสื่อมเสียที่สำคัญ และวิธีการควบคุมเพื่อป้องกันการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้

ประวัติการค้นพบและสปีชีส์ของอะลิไซโคลบาซิลลัส

ในปี พ.ศ. 2510 Uchino และ Doi รายงานการค้นพบแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่ทนกรดและทนร้อนจากน้ำพุร้อนในประเทศญี่ปุ่น และแบคทีเรียเหล่านี้ ถูกจำแนกให้อยู่ในสกุล *Bacillus* ถึงแม้ว่าคุณสมบัติต่างๆ จะไม่เหมือน *B. coagulans* และ *B. stearothermophilus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทนกรดและทนร้อนที่มีการศึกษาอย่างมากในขณะนั้น แต่แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์นี้ก็ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *B.coagulans* ตามคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา [1]

อีก 4 ปีถัดมา Darland และ Brock รายงานการค้นพบแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีลักษณะคล้ายกับสายพันธุ์ที่ Uchino และ Doi พบ จากแหล่งธรรมชาติที่มีสภาพเป็นกรดและร้อนในพื้นที่ต่างๆ ของสหรัฐอเมริกา แบคทีเรียกลุ่มนี้มีความแตกต่างอย่างมากจาก *B. coagulans* เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียกลุ่มที่ Uchino และ Doi รายงาน คุณลักษณะที่แตกต่างกันอย่างมากคือค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญและองค์ประกอบของดีเอ็นเอ นอกจากนี้องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้มีกรดไขมันโอเมก้าไซโคลเฮกเซน (ω-cyclohexane fatty acid) มากถึง 65% ของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ทั้งหมด ดังนั้นจึงมีการเสนอให้แบคทีเรียกลุ่มนี้ถูกจำแนกให้อยู่ในสปีชีส์ใหม่ *B.acidocaldarius* [2]

ในปี พ.ศ. 2524 Hippchen และคณะ ได้ศึกษาสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติทนกรดและทนร้อนซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับ *B. acidocaldarius* ที่คัดแยกจากดินที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกลาง เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเหล่านี้มีคุณสมบัติคล้ายกับ *B. acidocaldarius* อย่างมากแต่ไม่สามารถยืนยันความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียสองกลุ่มนี้ได้ [3] ถึงแม้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้จะสามารถก่อให้เกิดการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์อาหารก็ตาม จนกระทั่งการค้นพบแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากน้ำแอปเปิ้ลเสีย ซึ่งมีคุณลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียที่ Hippchen และคณะ พบ ต่อมาแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ถูกจำแนกให้อยู่ในสปีชีส์ใหม่ *B. acidoterrestris* ซึ่งเป็น

Kitipong.A@chula.ac.th
*อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
*Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

แบคทีเรียกลุ่มที่สามารถทนกรดและทนร้อนได้นอกเหนือจาก *B.coagulans* และ *B. acidocaldarius* [4]

การศึกษารหัสพันธุกรรมโดยการศึกษายีน 16S ribosomal RNA (16S rRNA gene) ของ *Bacillus* 3 สปีชีส์นี้ พบว่ารหัสพันธุกรรมของ *Bacillus* 3 สปีชีส์นี้แตกต่างจากทุกๆ สปีชีส์ของ *Bacillus* และนำไปสู่การเสนอให้แบคทีเรียกลุ่มนี้ให้ถูกจำแนกอยู่ในกลุ่มใหม่ *Alicyclobacillus* ซึ่งสอดคล้องกับคุณลักษณะของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ โดย alicyclo มาจากองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีกรดไขมันโอเมก้าอะลิไซคลิกเป็นองค์ประกอบอยู่มาก และ bacillus มาจากคุณสมบัติด้านอื่นๆ ที่คล้ายแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* [5]

ลักษณะทั่วไป

อะลิไซโคลบาซิลลัสเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ก่อให้เกิดโรคแต่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์อาหาร ต้องการออกซิเจนในการเจริญ สามารถสร้างสปอร์ และสามารถทนความเป็นกรดและทนอุณหภูมิสูงได้ โคโลนีมีลักษณะสีขาวออกเหลืองและสีจะเข้มมากขึ้นเมื่อโคโลนีมีอายุเพิ่มมากขึ้น เซลล์มีรูปร่างแท่งและขนาดของโคโลนีมีขนาดแตกต่างกันตามอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเจริญ โคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YSG (yeast starch glucose agar) มีขนาด 2-5 มิลลิเมตร [6] อะลิไซโคลบาซิลลัสสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20-70 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 40-60 องศาเซลเซียส และเจริญได้ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 2.0-6.0 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 3.5-4.5 สามารถพบอะลิไซโคลบาซิลลัสได้ตามแหล่งธรรมชาติต่างๆ ดังแสดงใน Table 1

Table 1 *Alicyclobacillus* species

Species	Habitats	References
A. acidocaldarius	Acid soil	[5]
A. acidophilus	Orange juice	[7]
A. acidoterristris	Acid soil and fruit juices	[5]
A. hesperidium	Sulfur-containing soil	[8]
A. herbarius	Herbal flower	[9]
A. sendaiensis	Acid soil	[10]
A. vulcanalis	Acid hot spring	[11]

โครงสร้างที่เป็นปัจจัยต่อการทนความร้อน

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบเยื่อหุ้มเซลล์ของอะลิไซโคลบาซิลลัส พบว่ามีองค์ประกอบของกรดไขมันโอเมก้าอะลิไซคลิก (ω-alicyclic fatty acid) มากที่สุด โดยเฉพาะกรดไขมันโอเมก้าไซโคลเฮกเซน ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่เป็นลักษณะจำเพาะของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ และยังมีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดไขมันโอเมก้าไซโคลเฮกเซนต่อคุณสมบัติการต้านทานต่อภาวะความเป็นกรดสูงและความร้อนของอะลิไซโคลบาซิลลัส คุณสมบัติของกรดไขมันโอเมก้าไซโคลเฮกเซนอาจควบคุมคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์สามารถทนภาวะความเป็นกรดสูงและความร้อนของแบคทีเรียในกลุ่มที่ทนร้อน [12]

นอกจากกรดไขมันโอเมก้าอะลิไซคลิกแล้ว กรดไดพิโคลินิก (dipicolinic acid) และการเปลี่ยนแปลงแร่ธาตุภายในเซลล์ (mineralization) ยังเป็นอีกปัจจัยที่ส่งผลต่อความต้านทานความเป็นกรดสูง และความร้อนของอะลิไซโคลบาซิลลัส การดึงแร่ธาตุออกจากเซลล์ส่งผลต่อการต้านทานความร้อนที่ลดลงในขณะเดียวกันการเสริมแร่ธาตุของอิออนที่มีประจุ เช่น อิออนแคลเซียมและอิออนแมกนีเซียม สามารถเพิ่มความต้านทานความร้อนของสปอร์อะลิไซโคลบาซิลลัสได้ [13] กรดไดพิโคลินิกซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ของสปอร์อะลิไซโคลบาซิลลัสสามารถจับกับ อิออนแคลเซียมและอิออนแมกนีเซียม ทำให้ผนังเซลล์แข็งแรงขึ้น ส่งผลต่อความต้านทานความร้อนที่เพิ่มสูงขึ้น [14]

ความเป็นพิษและการเสื่อมเสียโดยอะลิไซโคลบาซิลลัส

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอะลิไซโคลบาซิลลัสมีเพิ่มมากยิ่งขึ้นในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา เนื่องจากอะลิไซโคลบาซิลลัสสามารถทำให้เกิดการเสื่อมเสียอย่างมากในน้ำผลไม้ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ เช่น น้ำแอปเปิ้ล และน้ำส้มโดยข้อมูลการสำรวจโดย Grocery Manufacturers Association ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี 2541 พบว่า 35% (12) จาก 60% (34 จาก 57) ของบริษัทที่ตอบแบบสอบถามให้ข้อมูลว่าเคยเกิดปัญหาการเสื่อมเสียจากอะลิไซโคลบาซิลลัสในผลิตภัณฑ์ บริษัทส่วนใหญ่ให้ข้อมูลเพิ่มเติมว่าประสบปัญหาหนึ่งหรือสองครั้งในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา และพบว่าน้ำแอปเปิ้ลเป็นผลิตภัณฑ์ที่พบปัญหาจากการเสื่อมเสียโดยอะลิไซโคลบาซิลลัสมากที่สุด [15] สปอร์ *A.*

Kitipong.A@chula.ac.th
*อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
*Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

acidoterrestris สามารถทนต่อความร้อนที่ใช้ในกระบวนการพาสเจอไรซ์ น้ำผักและน้ำผลไม้ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ และภาวะนี้อาจกระตุ้นการงอกของสปอร์ (spore germination) [16] อะลิไซโคลบาซิลลัสสามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้หลายชนิดซึ่งน่าจะเป็นไปได้ที่จะปนเปื้อนมาจากดินระหว่างกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวและกระบวนการผลิต [6]

ถึงแม้ว่าอะลิไซโคลบาซิลลัสจะถูกจัดเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคเนื่องจากไม่มีการรายงานถึงการเจ็บป่วยหรืออาการอาหารเป็นพิษที่เกิดจากแบคทีเรียชนิดนี้ แต่ความเป็นไปได้ในการก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อผู้บริโภค จึงนำไปสู่การวิจัยด้านพิษวิทยาของแบคทีเรียนี้ การฉีดแบคทีเรีย *A. acidoterrestris* ในหนูตะเภาโดยตรงและให้อาหารด้วยน้ำส้มที่เกิดการเสื่อมเสียด้วย *A. acidoterrestris* ความเข้มข้น 5 x 10^6 CFU/ml พบว่าไม่มีอาการผิดปกติและไม่พบอาการเจ็บป่วยหรือการตายในหนูตะเภา ดังนั้น *A. acidoterrestris* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคในระดับความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้ในการทดลอง [15]

การร้องเรียนจากผู้บริโภคเป็นวิธีเดียวที่จะทำให้ทราบว่าผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เกิดการเสื่อมเสียจากอะลิไซโคลบาซิลลัส เนื่องจากลักษณะการเสื่อมเสียจากอะลิไซโคลบาซิลลัสไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยสายตาได้ง่าย แบคทีเรียชนิดนี้ไม่สร้างแก๊สซึ่งจะไม่ทำให้บรรจุภัณฑ์บวม แต่แบคทีเรียนี้สามารถทำให้เกิดการขุ่นได้ในน้ำผลไม้แบบใส [15,17] วิธีการตรวจสอบการเสื่อมเสียอย่างง่ายโดยผู้บริโภคสามารถตรวจสอบได้จากกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์หรือสารกัวไอคอล (guaiacol) ที่สร้างขึ้น กัวไอคอลเป็นสารทุติยภูมิที่สร้างขึ้นโดยอะลิไซโคลบาซิลลัสซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารโดยเฉพาะน้ำผลไม้ที่เป็นกรดสูงเกิดการเสื่อมเสีย สารตั้งต้นในการสังเคราะห์กัวไอคอลคือ วานิลลิน (vanillin) [18]

ปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานชัดเจนถึง วิถีการสังเคราะห์สารกัวไอคอลโดยอะลิไซโคลบาซิลลัส แต่สมมติฐานที่น่าจะเป็นไปได้กล่าวคือกัวไอคอลอาจเกิดจากระหว่างกระบวนการเมตาบอลิซึมของกรดเฟอรูลิก (ferulic acid) ดัง Figure 1 โดยกรดเฟอรูลิกเป็นองค์ประกอบทั่วไปของผัก ผลไม้ ถั่ว และหญ้า และยังเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของพืช กรดเฟอรูลิก จะรวมกับสารประกอบคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ เช่น ลิกนิน ทำให้โครงสร้างของผนังเซลล์แข็งแรง [19] จุลินทรีย์ต่างๆ เช่น ยีสต์ รา และแบคทีเรีย สามารถสังเคราะห์สารต่างๆ จากกรดเฟอรูลิก โดยขั้นแรกจะเกิดปฏิกิริยา ดีคาร์บอกซิเลชั่น (decarboxylation) ของกรดเฟอรูลิกไปเป็น 4-ไวนิลกัวไอคอล (4-vinylguaiacol) [18] และสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อได้เป็นวานิลลินหรือกรดวานิลลิก (vanillic acid) โดยที่ผ่านหรือไม่ผ่านการสังเคราะห์สารอินเตอร์มิเดียต 4-ไวนิลกัวไอคอล จากนั้นจุลินทรีย์จะย่อย 4-ไวนิลกัวไอคอล เป็นวานิลลินและกรดวานิลลิก ตามลำดับ [20] วานิลลินสามารถเกิดปฏิกิริยารีดักชั่น (reduction reaction) ได้ไวนิลแอลกอฮอล์ (vanillyl alcohol) หรือเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้กรดวานิลลิก และกรดวานิลลิกสามารถถูกสังเคราะห์เป็นสารต่างๆ ได้ เช่น เมธอกซีไฮโดรควิโนน (methoxyhydroquinone) และ กัวไอคอล เป็นต้น [18]

สารกัวไอคอลถูกจัดเป็นสารประเภทให้กลิ่น เป็นสารที่ทำให้เกิดกลิ่นรมควัน (smoky) ในผลิตภัณฑ์กาแฟอะราบิก้า (arabica) [21] และปลาแซลมอลรมควัน [22] นอกจากนี้ยังมีคำจำกัดความของกลิ่นกัวไอคอลอื่นๆ อีก เช่น ลักษณะกลิ่นคล้ายยา (medicinal) สารฆ่าเชื้อ (disinfectant) และสารฟีนอลิก (phenolic) [23] นอกเหนือจากกัวไอคอล ยังพบ 2,6 dichlorophenol (2,6 DCP) และ 2,6 dibromophenol (2,6 DBP) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียที่ผลิตจากอะลิไซโคลบาซิลลัส [24]

ปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าความต้านทานความร้อน

มีการรายงานค่าความต้านทานความร้อนของ *A. acidoterrestris* ในน้ำผลไม้หลายชนิดดัง Table 2 เนื่องจากสปอร์ของสปีชีส์นี้ทนความร้อนได้มากที่สุดสปีชีส์หนึ่งเมื่อเทียบกับสปีชีส์อื่นๆ ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยต่างๆ อาทิ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง สปีชีส์และสายพันธุ์ และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเพื่อการสร้างสปอร์ ที่ส่งผลต่อความต้านทานความร้อนของ *A. acidoterrestris* ดังรายละเอียดต่อไปนี้

อุณหภูมิ: อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าความต้านทานความร้อนมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปัจจัยอื่นๆ เช่น เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่าความต้านทานความร้อน (D-value) ลดลง การเพิ่มของอุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส (จาก 95 – 97 องศาเซลเซียส) ส่งผลให้ค่าความ

Kitipong.A@chula.ac.th
*อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
*Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

ต้านทานความร้อนลดลงจาก 2.82 นาที เป็น 0.57 นาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB (malt extract broth) ที่ภาวะที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างและค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ [27] การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส (90 – 93 องศาเซลเซียส) ส่งผลให้ค่าความต้านทานความร้อนของ *A. acidoterrestris* สายพันธุ์ DSM 2498 ลดลงประมาณ 2 เท่า ในตัวอย่างสารละลายบัฟเฟอร์ McIlavaine น้ำแอปเปิ้ล และน้ำแอปเปิ้ลผสม (nectar) ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.00 3.68 และ 2.95 ตามลำดับ [28]

ค่าความเป็นกรด-ด่าง: ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลงจะส่งผลให้ค่าความต้านทานความร้อนของอะลิไซโคลบาซิลลัสลดลง โดยมีความสัมพันธ์ของการลดลงแบบเส้นตรง (linear relationship) และจะเห็นผลได้ชัดเจนยิ่งขึ้นที่อุณหภูมิในช่วง 80 - 90 องศาเซลเซียส [29] ในทางตรงกันข้าม ค่าความต้านทานความร้อนของสปอร์ *A. acidoterrestris* AB-1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 3 – 8 ที่อุณหภูมิเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (α= 0.05) [30] นอกจากนี้องค์ประกอบของน้ำผลไม้ยังเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างมากต่อค่าความต้านทานความร้อน โดยสปอร์ของ *A. acidoterrestris* ในน้ำองุ่นมีค่าความต้านทานความร้อนน้อยกว่าน้ำส้มถึงแม้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำองุ่น (4.00) จะสูงกว่าน้ำส้ม (3.90) ก็ตาม [25]

สปีชีส์และสายพันธุ์: ความต้านทานความร้อนของแบคทีเรียแต่ละสปีชีส์และสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน ความต้านทานความร้อนของ *A. acidoterrestris* สายพันธุ์ VF และ WAC มีค่าใกล้เคียงกันในตัวอย่างน้ำผลไม้ที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ในขณะที่สายพันธุ์ IP มีค่าความต้านทานความร้อนน้อยกว่าอีกสองสายพันธุ์ [29] *A. acidoterrestris* สายพันธุ์ AB-1 มีค่าความต้านทานความร้อนมากกว่าสายพันธุ์ DSM 2498 ประมาณ 2 เท่า ในสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.00 นอกจากนี้ความต้านทานความร้อนของ *A. acidoterrestris* สายพันธุ์ 46 และ DSM 2498 มีค่าใกล้เคียงกัน ในขณะที่สายพันธุ์ 70 และ 145 มีค่าความต้านทานความร้อนที่มากกว่า ความต้านทานความร้อนที่แตกต่างกันของแต่ละสปีชีส์และสายพันธุ์อาจเป็นผลอันเนื่องมาจากความแตกต่างขององค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ อุณหภูมิที่ใช้ในการสร้างสปอร์ (sporulation temperature) ค่าความเป็นกรด-ด่าง องค์ประกอบของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ และค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ (a_w) [28]

อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเพื่อการสร้างสปอร์: อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นที่ใช้ในการบ่มเพื่อการสร้างสปอร์สามารถเพิ่มความต้านทานความร้อนของอะลิไซโคลบาซิลลัส ค่าความต้านทานความร้อนของ *A. acidocadarius* มีค่าเพิ่มขึ้นและมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเพื่อการสร้างสปอร์เพิ่มขึ้นจากอุณหภูมิ 45 - 65 องศาเซลเซียส [31] ถึงแม้ว่าค่าความต้านทานความร้อนจะลดลงเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเพื่อการสร้างสปอร์ลดลง *A. acidocadarius* มีความต้านทานความร้อนมากกว่า *A. acidoterrestris* ประมาณ 30 เท่าเมื่อใช้อุณหภูมิในการบ่มเพื่อการสร้างสปอร์ที่เท่ากัน [32]

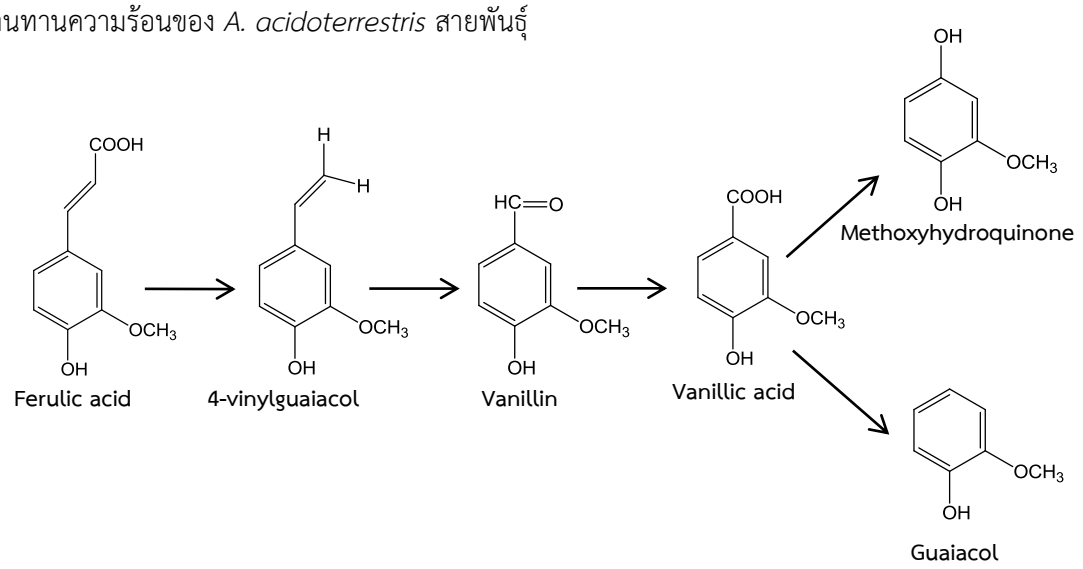

Figure 1 Microbial synthesis pathway of guaiacol

Kitipong.A@chula.ac.th
*อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
*Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

Table 2 Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spore in various fruit juices

Heating medium	strain	pH	TSS	T (°C)	D-value (SD) (min)	z-value	References
Apple juice	VF	3.5	11.4	85	56 (14)	7.7	[17]
				90	23 (7.5)		
				95	2.8 (0.7)		
Orange juice	Z	3.9	nr	80	37.9 (0.2)	12.9	[25]
				90	10.3 (0.3)		
				95	3.59 (0.04)		
Grape juice	WAC	3.3	15.8	88	11 (nr)	7.2	[17]
				90	16 (4.1)		
				95	2.4 (0.9)		
Apple juice	VF	3.6	11.7	90	49.9 (1.0)	8.89	[26]
				95	14.9 (0.6)		
				98	6.2 (0.4)		
	WAC	3.6	11.7	90	59.3 (2.6)	7.57	[26]
				95	13.9 (0.6)		
				98	5.2 (0.8)		
	SAC	3.6	11.7	90	49.2 (1.0)	8.04	[26]
				95	15.3 (0.4)		
				98	5.0 (0.2)		
Orange juice	VF	3.9	12.2	90	41.4 (0.4)	8.96	[26]
				95	9.4 (0.9)		
				98	5.7 (0.1)		
	WAC	3.9	12.2	90	62.5 (2.8)	6.60	[26]
				95	9.5 (0.7)		
				98	4.0 (0.4)		
	SAC	3.9	12.2	90	49.6 (1.3)	7.76	[26]
				95	8.7 (0.1)		
				98	5.2 (0.5)		

*TSS = total soluble solid, D-value = decimal time reduction (time required to kill 90% of microorganism at a certain temperature, z-value = a temperature in degree Fahrenheit or degree Celsius required to reduce 90% of D-value

การควบคุมอะลิไซโคลบาซิลลัส

การควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารสามารถแบ่งได้ 2 วิธีหลัก คือ 1. การใช้สารต้านจุลชีพหรือสารที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และ 2. การใช้กระบวนการแปรรูปทางอาหารต่างๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งในวิธีนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธีย่อยคือ กระบวนการแปรรูปอาหารที่ใช้ความร้อน (thermal processing) และกระบวนการแปรรูปอาหารที่ไม่ใช้ความร้อน (non-thermal processing) โดยในปัจจุบันการใช้สารต้านจุลชีพและกระบวนการแปรรูปอาหารที่ไม่ใช้ความร้อนได้รับความนิยมมากยิ่งขึ้นเนื่องจากวิธีทั้งสองวิธีนี้สามารถรักษาคุณค่าทางโภชนาการของ

Kitipong.A@chula.ac.th
*อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
*Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

ผลิตภัณฑ์อาหารได้ดีกว่ากระบวนการแปรรูปอาหารที่ใช้ความร้อน [33] นอกจากนี้วิธีดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของอะลิไซโคลบาซิลลัสในผลิตภัณฑ์อาหารดังรายละเอียดต่อไปนี้

สารต้านจุลชีพ (antimicrobial substances)

กรดอินทรีย์: กรดอินทรีย์ เช่น กรดซอร์บิก (sorbic acid) และกรดเบนโซอิก (benzoic acid) เป็นวัตถุกันเสียที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ เพื่อยังยั้งการเจริญของรา ยีสต์ และแบคทีเรีย รวมทั้งอะลิไซโคลบาซิลลัส อุตสาหกรรมน้ำผลไม้นิยมใช้โซเดียมเบนโซเอตเป็นวัตถุกันเสียเนื่องจากละลายน้ำได้ดีและไม่ระเหยง่าย [34] ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับการแตกตัวของกรดซึ่งขึ้นกับค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ [35] โซเดียมเบนโซเอตและโพแทสเซียมซอร์เบตมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของอะลิไซโคลบาซิลลัสในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ แต่อย่างไรก็ตามวัตถุกันเสียทั้งสองตัวนี้สามารถทำให้เกิดอาการแพ้ต่อผู้บริโภค เช่น อาการหืด-หอบ อาการแน่นหน้าอก และอาจเกิดอาการท้องเสียถ้าบริโภคมากเกินความเหมาะสม [36]

Oxidizing agent: คลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide) องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) แนะนำให้ใช้คลอรีนไดออกไซด์ ความเข้ม 50-200 ppm ในการล้างผักและผลไม้เพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน ซึ่งช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ประมาณ 2 log ขึ้นกับความเข้มข้นและผลิตภัณฑ์ที่ล้าง คลอรีนไดออกไซด์ ความเข้มข้น 40 ppm เวลา 5 นาที สามารถควบคุมสปอร์อะลิไซโคลบาซิลลัสในอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำแอปเปิ้ล โดยลดจำนวนสปอร์อะลิไซโคลบาซิลลัสในอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากกว่า 4 log ในขณะที่ความเข้มข้น 80 ppm เวลา 1 นาที และ ความเข้มข้น 120 ppm 30 วินาที สามารถลดจำนวนสปอร์ได้ 1.8 log และ 4.8 log ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและเวลาที่ใช้ในการสัมผัส [37]

ไนซิน:ไนซินเป็นแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) หรือสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตมาจาก *Lactococcus lactis* subsp. lactis มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด เช่น *Clostridium* spp. *Lactobaciilus* spp. *Staphylococcus* spp. และ *Alicyclobacillus* spp. ไนซินสามารถเติมลงไปในผลิตภัณฑ์ น้ำผลไม้โดยตรงหรือผสมกับโพลิเมอร์เพื่อให้ไนซินถูกปลดปล่อยออกมาระหว่างการเก็บ [38] ความเข้มข้นของไนซินที่ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารอยู่ในช่วง 1.25 - 100 IU/ml และประสิทธิภาพขึ้นกับค่าความเป็นกรด-ด่าง ชนิดของอาหาร และปริมาณของแข็งทั้งหมด [25] ภาวะที่เป็นกรดและค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ต่ำ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของ ไนซิน และไนซินจะยับยั้งสปอร์ของแบคทีเรียได้ดีกว่าเซลล์ปกติ (vegetative cell) [39]

ไลโซไซม์ (lysozyme): ไลโซไซม์สามารถย่อยพันธะ β 1-4 ระหว่าง N-acetylglucosamine และ N-acetylmuramic acid ซึ่งเป็นองค์ประกอบของชั้นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ไลโซไซม์ความเข้มข้น 0.25-2.0 g/l มีฤทธิ์ในการยับยั้งสปอร์ *A. acidoterrestris* ซึ่งมีความไวต่อไลโซไซม์มากกว่าเซลล์ปกติ โดยสปอร์ถูกยับยั้งทันทีจนไม่สามารถตรวจสอบจำนวนสปอร์ได้ หลังจากการเติมไลโซไซม์ [40]

น้ำมันหอมระเหย (essential oils): สารสกัดจากใบของต้นยูคาลิปตัสหลายสายพันธุ์ สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ *A. acidoterrestris* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (minimum inhibition concentration) อยู่ในช่วง 7.8 – 31 g/l [41] เนื่องจากองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจะขึ้นอยู่กับวิธีการสกัด ชนิดของพืช และภูมิอากาศของการปลูก ดังนั้นการใช้สารบริสุทธิ์หรือสารที่ออกฤทธิ์ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จะมีประสิทธิภาพมากกว่าน้ำมันหอมระเหย เช่น ซินนามอลดีไฮด์ (cinnamaldehyde) ยูจีนอล (eugenol) และลิโมนีน (limonene) ซินนามอลดีไฮด์มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการงอกของสปอร์ *A. acidoterrestris* สายพันธุ์ c8 และ γ4 เมื่อเปรียบเทียบกับยูจีนอลและลิโมนีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB ที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสปอร์คือ 0.1-0.5 g/l [42]

สารไดเมทิลไดคาร์บอเนต (dimethyl dicarbonate): ไดเมทิลไดคาร์บอเนตเป็นวัตถุเจือปนอาหารที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยา

Kitipong.A@chula.ac.th
*อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
*Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น ยีสต์ รา และแบคทีเรียในน้ำผลไม้และเครื่องดื่ม ไดเมทิลไดคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 50 125 และ 250 ppm สามารถยับยั้งทั้งเซลล์ปกติและสปอร์ *A. acidoterrestris* สายพันธุ์ VF WAC และ SAC ในน้ำแอปเปิ้ลและน้ำส้ม โดยความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเพิ่มสูงขึ้น ไดเมทิลไดคาร์บอเนตสามารถยับยั้งเซลล์ปกติได้มากกว่าสปอร์ อะลิไซโคลบาซิลลัส และประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเซลล์ปกติและสปอร์ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของอะลิไซโคลบาซิลลัส [26]

กระบวนการแปรรูปทางอาหารที่ไม่ใช้ความร้อน (non-thermal processing)

การใช้ความดันสูง (high hydrostatic pressure, HHP): HHP เป็นกระบวนการแปรรูปที่ใช้เพื่อถนอมอาหารด้วยการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส (organoleptic properties) เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนแปรรูปอาหารด้วยความร้อน ดังนั้นปัจจุบัน HPP จึงได้รับความนิยมในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารโดยเฉพาะผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ การใช้ HHP ร่วมกับการพาสเจอไรซ์สามารถยับยั้งสปอร์ *A. acidoterrestris* สายพันธุ์ DSM 2492 โดยการใช้ HHP ที่ความดัน 350 MPa ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BAM หลังจากผ่านการพาสเจอไรซ์ สามารถลดจำนวนสปอร์ได้เพียง 1.13 log ในขณะที่ที่ภาวะเดียวกันสามารถลดจำนวนสปอร์ได้มากกว่า 4 log ในตัวอย่าง น้ำแอปเปิ้ล ประสิทธิภาพของการใช้ความดันสูงต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับปริมาณความดันและเวลา ความแตกต่างในการยับยั้งการงอกของสปอร์ในตัวอย่างอาจเป็นเพราะองค์ประกอบของตัวอย่างที่มีทั้งสนับสนุนและยับยั้งการงอกของสปอร์ [43]

การใช้โฮโมจีไนซ์ความดันสูง (high homogenization pressure): การใช้โฮโมจีไนซ์ความดันสูงที่ 1,700 bars สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ปกติของ *A. acidoterrestris* สายพันธุ์ DSMZ 2498 γ4 และ c8 ประมาณ 1-2 log ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEB ซึ่งประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ขึ้นกับความต้านทานของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ [44]

การฉายรังสี (radiation): การใช้รังสีแกมมาและลำแสงอิเลกตรอนที่ความเข้มข้น 1.02-1.10 kGy ร่วมกับการสเตอริไรซ์สามารถลดการปนเปื้อนของ *A. acidoterrestris* สายพันธุ์ GD3B [45] นอกจากนี้รังสีอัตราไวโอเลต (UV) ที่ความเข้ม 0.38-1.31 mW/cm^2 สามารถยับยั้งสปอร์ *A. acidoterrestris* สายพันธุ์ DSM 3922 โดยที่ความเข้มมากที่สุดสามารถลดจำนวนสปอร์ได้ประมาณ 5.5 log และ 2 log ในน้ำองุ่นและน้ำแอปเปิ้ลตามลำดับ [46]

การตรวจสอบการเสื่อมเสียโดยอะลิไซโคลบาซิลลัสด้วยการตรวจสอบกัวไอคอล

การตรวจสอบกัวไอคอลสามารถทำได้ 3 วิธีหลักๆ ดังนี้ การทดสอบทางประสาทสัมผัส (sensory) การวิเคราะห์ปริมาณ (analytical) และการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี (chemical reaction) ซึ่งวิธีแรกใช้สำหรับการตรวจสอบเชิงคุณภาพ ในขณะที่วิธีที่เหลือใช้สำหรับการตรวจสอบทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพ

การทดสอบทางประสาทสัมผัส: มีงานวิจัยหลายฉบับที่รายงานค่าระดับกั้น (thresholds) ของกลิ่นและรสกัวไอคอลในน้ำเปล่า น้ำส้มและน้ำแอปเปิ้ล ดังแสดงใน Table 3 โดย Wasserman และคณะรายงานค่า thresholds กลิ่นและรสกัวไอคอล คือ 13 ppb และ 21 ppb ในน้ำ ตามลำดับ เป็นครั้งแรก [23] แต่งานวิจัยในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา มีการรายงานค่า thresholds กลิ่นและรสกัวไอคอลในน้ำเปล่าและน้ำผลไม้ที่ลดลง [47] ปัจจัยที่ส่งผลต่อค่า thresholds กลิ่นและรสกัวไอคอล กล่าวคือ ความไวในการรับรู้กลิ่นและรสของผู้ทดสอบตัวอย่างที่แตกต่างกัน เช่น ความไวในการรับรู้กลิ่นและรสของผู้ทดสอบในการทดลองเดียวกันต่างกันมากถึงประมาณ 500 เท่า [48] แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบทางประสาทสัมผัสนั้นให้ผลในเชิงคุณภาพได้ดีกว่าการทดสอบเชิงวิเคราะห์ เช่น การวิเคราะห์ด้วย gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) โดยพบว่าการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยผู้ทดสอบสามารถเลือกตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนกัวไอคอล ในขณะที่การวิเคราะห์ด้วย GC-MS ไม่สามารถตรวจพบสารนี้ [49]

Kitipong.A@chula.ac.th
*อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
*Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

Table 3 Guaiacol thresholds

Sample	Taste Threshold (ppb)	Odor Threshold (ppb)	References
Apple juice	2.00	2.32	[49]
Apple juice	0.24	0.91	[48]
Orange juice	2.00	-	[49]
Water	13.00	21.00	[23]
Water	0.17	0.48	[48]

การวิเคราะห์ปริมาณ: ขั้นตอนหลักในการวิเคราะห์ปริมาณทางเคมีทั่วไปประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ 1. การเตรียมตัวอย่าง (sample preparation) 2. การแยกตัวอย่าง (separation) และ 3. การระบุตัวอย่าง (identification) การเตรียมตัวอย่างนิยมใช้วิธี liquid-liquid extraction (LLE, solid phase extraction (SPE) และ solid phase microextraction (SPME) การแยกตัวอย่างโดยทั่วไปนิยมใช้ high performance liquid chromatography (HPLC) และ gas chromatography (GC) [47]

การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี: การวัดปริมาณกัวไอคอลอาศัยหลักการการเกิดสีของปฏิกิริยาทางเคมี ระหว่างการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกัวไอคอลโดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ในระบบที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) สารมีสีที่เกิดขึ้นก็คือ 3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenoquinone ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงไปและสามารถตรวจวัดได้ที่ค่าความยาวคลื่นที่ 420 nm หรือที่ 470 nm [50,51] โดยปฏิกิริยานี้เป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จากหลักการนี้ได้นำไปสู่การพัฒนาชุดทดสอบแบบง่าย (test kit) โดยชุดทดสอบอย่างง่ายนี้มีส่วนประกอบดังนี้ กรดวานิลลิก อาหารเลี้ยงเชื้อ YSG และสารตั้งต้นที่จะใช้ทดสอบปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของกัวไอคอล ชุดทดสอบอย่างง่ายนี้สามารถใช้หาปริมาณกัวไอคอลและสปีชีส์ของอะลิไซโคลบาซิลลัสที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร [52] การหาปริมาณกัวไอคอลที่ปนเปื้อนสามารถหาโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงเทียบกับกราฟมาตรฐานที่รู้ความเข้มข้นของกัวไอคอล

บทสรุป

อะลิไซโคลบาซิลลัสมีความสำคัญอย่างมากในอุตสาหกรรมน้ำผลไม้และเครื่องดื่ม เนื่องจากการเสื่อมเสียจากแบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดความเสียหายต่อเศรษฐกิจอย่างมาก นอกจากนี้ยังส่งผลให้ผู้บริโภคขาดความเชื่อมั่นในผลิตภัณฑ์ ได้มีการรายงานวิธีการตรวจสอบ การระบุและการแยกอะลิไซโคลบาซิลลัสในตัวอย่างอาหารอย่างมากมาย แต่วิธีมาตรฐานยังไม่มีการจัดทำขึ้น ดังนั้นการวิจัยเพื่อหาวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบอะลิไซโคลบาซิลลัสจึงมีความสำคัญ ถึงแม้ว่างานวิจัยส่วนใหญ่จะศึกษาเฉพาะ *A. acidoterrestris* เนื่องจากเป็นสปีชีส์ที่สปอร์สามารถทนความร้อนได้มากและเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของน้ำผลไม้และเครื่องดื่มมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสปีชีส์อื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามอะลิไซโคลบาซิลลัสสปีชีส์อื่นๆ ยังสามารถก่อให้เกิดการเสื่อมเสียในน้ำผลไม้และเครื่องดื่มได้ ดังนั้นงานวิจัยเกี่ยวกับการยับยั้งการเจริญของอะลิไซโคลบาซิลลัสสปชีส์อื่นๆ ยังมีความสำคัญและเป็นที่ต้องการของอุตสาหกรรมน้ำผลไม้และเครื่องดื่ม

การใช้เทคโนโลยีใหม่ๆ โดยเฉพาะกระบวนการแปรรูปที่ไม่ใช้ความร้อนและสารยับยั้งการเจริญของอะลิไซโคลบาซิลลัส เป็นวิธีทางเลือก (alternative treatment) อีกวิธีหนึ่งที่จะยับยั้งการเจริญของอะลิไซโคลบาซิลลัสในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพที่แตกต่างกันของผลิตภัณฑ์อาหารแต่ละชนิด อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของอะลิไซโคลบาซิลลัส การใช้เทคโนโลยีหลายอย่างร่วมกันอาจส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาต่อองค์ประกอบของอาหารและอาจทำให้ประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของอะลิไซโคลบาซิลลัสลดลง รวมไปถึงผลของเทคโนโลยีใหม่ๆ และสารยับยั้งการเจริญของอะลิไซโคลบาซิลลัสที่อาจส่งผลต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหารได้ ดังนั้นข้อมูลที่สำคัญเหล่านี้เป็นที่ต้องการของอุตสาหกรรมเพื่อที่จะได้ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีคุณภาพ ปลอดภัย และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค นอกจากนี้ข้อมูลการยับยั้งการเจริญ

Kitipong.A@chula.ac.th
*อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
*Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

ของอะลิไซโคลบาซิลลัสต่างๆ นั้นทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ ดังนั้นการขยายส่วนระดับการทดลองเพื่อนำร่องสู่การใช้ได้จริงเป็นสิ่งที่สำคัญ ทั้งนี้เพื่อที่จะได้นำเทคโนโลยีนี้ไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารอ้างอิง

[1] Uchino, F. and Doi, S. (1967). Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. Agricultural and Biological Chemistry. 31: 817-822.

[2] Darland, G. and Brock, T.D. (1971). *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., acidophilic themophilic spore-forming bacterium. Journal of General Microbiology. 67: 9-15.

[3] Hippchen, B., Roll, A. and Poralla, K. (1981). Occurrence in soil of thermo-acidophilic bacilli processing ω-cyclohexane fatty acids and hapanoids. Archives of Microbiology. 129: 53-55.

[4] Cerny, G., Hennlich, W. and Poralla, K. (1984). Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoiling microorganism. Z. Lebens Unters Forsch. 179: 224-227.

[5] Wisotzkey J.D., Jurtshuk, P., Fox, G.E., Deinhard, G. and Poralla, K. (1992). Comparative sequence analyses on the 16s rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 42: 263-269.

[6] Wisse, C.A. and Parish, M.E. (1998). Isolation and enumeration of sporeformimg, thermoacidophilic, rod-shaped bacteria from citrus processing environments. Dairy Food and Environmental Sanitation. 8: 504-509.

[7] Matsubara, H., Goto, K., Matsumura, T., Mochida, K., Iwaki, M., Niwa, M. and Yamasoto, K. (2002). *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, ω-alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52: 1681–1685.

[8] Albuquerque, L., Rainey, F.A. and Chung, A.P. (2000). *Alicyclobacillus hesperidium* sp. nov. and a related genomic species from solfataric soil of Sao Miguel in the Azores. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50: 451-457.

[9] Goto, K., Matsubara, H., Mochida, K., Matsumura, T., Hara, Y., Niwa, M. and Yamasato, K. (2002). *Alicyclobacillus herbarius* sp. nov., a novel bacterium containing omega-cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52: 109-113.

[10] Tsuruoka, N., Isono, Y., Shida, O., Hemmi, H., Nayayama, T. and Nishimo, T. (2003). *Alicyclobacillus sendaiensis* sp. nov., a novel acidophilic, slightly thermophilic species isolated from soil in Sendai, Japan. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53: 1081-1084.

[11] Simbahan, J., Drijber, R. and Blum, P. (2004). *Alicyclobacillus vulcanalis* sp. nov., a thermophilic, acidophilic bacterium isolated from Coso Hot Springs, California, USA. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 54: 1703-1707.

[12] Kannenberg, E., Blume, A. and Poralla, K. (1984). Properties of ω-cyclohexane fatty

Kitipong.A@chula.ac.th

*อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

*Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

acid in membranes. The Federation of European Biochemical Societies. 172: 331-334.

[13] Beaman, T.C. and Gerhardt, P. (1986). Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation. Applied and Environmental Microbiology. 52: 1242-1246.

[14] Yamazaki, K., Kawai, Y., Inoue, N. and Shinamo, H. (1997). Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. Letters in Applied Microbiology. 25: 153-156.

[15] Walls, I. and Chuyate. R. (2000). Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Food Australia. 52: 286-288.

[16] Yamazaki, K., Teduka, H. and Shinano, H. (1996). Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 60: 543-545.

[17] Splittstoesser, D.F., Churey, J.J. and Lee, C.Y. (1994). Growth characteristics of aciduric spore forming bacilli isolated from fruit juices. Journal of Food Protection. 57: 1080-1083.

[18] Rahouti, M., Seigle-Murandi, F., Steiman, R. and Eriksson, K.E. (1989). Metabolism of ferulic acid by *Paecilomyces variotii* and *Pestalotia palmarum*. Applied and Environmental Microbiology. 55: 2391–2398.

[19] Provan, G.J., Scobbie, L. and Chesson A. (1994). Determination of phenolic acids in plant cell walls by microwave digestion. Journal of the Science of Food and Agriculture. 64: 63–65.

[20] Karmakar, B., Vohra, R.M., Nandanwar, H., Sharma, P., Gupta, K.G. and Sobti, R.C. (2000). Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin by a newly isolated strain of *Bacillus coagulans*. Journal of Biotechnology. 80: 195–202.

[21] Mayer, F., Czerny, M. and Grosch, W. (1999). Influence of provenance and roast degree on the composition of potent odorants in Arabica coffees. The Journal European Food Research and Technology. 209: 242–250.

[22] Varlet, V., Knockaert, C., Prost, C. and Serot, T. (2006). Comparison of odor-active volatile compounds of fresh and smoked salmon. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54: 3391–3401.

[23] Wasserman, A.E. (1966). Organoleptic evaluation of three phenols present in wood smoke. Journal of Food Science. 31: 1005-1010.

[24] Jensen, N. and Whitfield, F.B. (2003). Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice. Letters in Applied Microbiology. 36: 9-14.

[25] Komitopolou, 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. International Journal of Food Science and Technology. 34: 81–85.

[26] Assatarakul, K. (2012). Intervention methods to improve the microbiological quality and safety of juices. Docterate's thesis. Cornell University, New York, USA.

Kitipong.A@chula.ac.th

*อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

*Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

[27] Silva, F.M.S., 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. International Journal of Food Microbiology. 51: 95-103.

[28] Bahçeci, K.S. and Acar, J. (2007). Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. International Journal of Food Microbiology. 120: 266-273.

[29] Pontius, A.J., Rushing, J.E. and Foegeding, P.M. (1998). Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. Journal of Food Protection. 61: 41-46.

[30] Murakami, M. Tedzuka, H. and Yamazaki, K. (1998). Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH. Food Microbiology. 15: 577-582.

[31] Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A. (2005). Food protection with high temperatures, and characteristics of thermophilic microorganisms. In Modern Food Microbiology, (7th ed.). New York: Springer Science and Business Media.

[32] Palop, A., Álvarez, I., Raso, J. and Condón, S. (2000). Heat resistance of *Alicyclobacillus acidocaldarius* in water, various buffers and orange juice. Journal of Food Protection. 63: 1377-1380.

[33] Qin, B.L., Pothakamury, H., Vega, H., Martin, O., Barbosa-Canovas, G.V. and Swanson, B.G. 1995a, Food pasteurization using high intensity pulsed electric fields. Food Technology. 49(12): 55–60.

[34] Walker, M. and Phillips, C.A. (2008). *Alicyclobacillus acidoterrestris*: an increasing threat to the fruit juice industry? International Journal of Food Science and Technology. 43: 250-260.

[35] Dziezak, J.D. (1986). Preservatives: antimicrobial agents. A means toward product stability. Food Technology. 40: 104-111.

[36] Walker, R. (1990). Toxicology of sorbic acid and sorbates. Food Additives and Contaminants. 7: 671-676.

[37] Lee, S.Y., Gray, P.M., Dougherty, R.H. and Kang, D.H. (2004). The use of chlorine dioxide to control *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in aqueous suspension and on apples. International Journal of Food Microbiology. 92:121–127.

[38] Buonocore, G.G., Sinigaglia, M., Corbo, M.R., Bevilacqua, A., La Notte, E. and Del Nobile, M.A. (2004). Controlled release of antimicrobial compounds from highly swellable polymers. Journal of Food Protection. 67: 1190–1194.

[39] Yamazaki, K., Mukamarami, M., Kawai, Y., Inoue, N. and Matsuda, T. (2000). Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. Food Microbiology. 17: 315-320.

[40] Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Buonocore, G.G., Del Nobile, M.A. and Sinigaglia, M. (2007). Antimicrobial effectiveness of lysozyme against *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Advances in Food Sciences. 29: 47–52.

[41] Takahashi, T., Kokubo, R. and Sakaino, M. (2004). Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from Eucalyptus maculata. Letters in Applied Microbiology. 39: 60–64.

Kitipong.A@chula.ac.th
*อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
*Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

[42] Bevilacqua, A., Corbo, M.R. and Sinigaglia, M. (2008). Inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by natural compounds. International Journal of Food Science and Technology. 43: 1271-1275.

[43] Alpas, H., Alma, L. and Bozoglu, F. (2003). Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells in model system, apple, orange and tomato juices by high hydrostatic pressures. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 19: 619–623.

[44] Bevilacqua, A., Cibelli, F., Corbo, M.R. and Sinigaglia, M. (2007). Effects of high pressure homogenization on the survival of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in a laboratory medium. Letters in Applied Microbiology. 45: 382–386.

[45] Nakauma, M., Saito, K., Katayama, T., Tada, M. and Todoriki, S. (2004). Radiation-heat synergism for inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in citrus juice. Journal of Food Protection. 67: 2538–2543.

[46] Baysal, A.H., Molva, C. and Unluturk, S. (2013). UV-C light inactivation and modeling kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in white grape and apple juices. International Journal of Food Microbiology. 166: 494-498.

[47] 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. Letters in Applied Microbiology. 24: 185-189.

[48] Eisele, T.A. and Semon, M.J. (2005). Best estimated aroma and taste detection threshold for guaiacol in water and apple juice. Journal of Food Science. 70: 267-269.

[49] Orr, R.V., Shewfelt, R.L., Huang, C.J., Tefera, S. and Beuchat, L.R. (2000). Detection of guaiacol produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by sensory and chromatographic analyses and comparison with spore and vegetative cell populations. Journal of Food Protection. 63: 1517-1522.

[50] Doerge, D.R., Divi, R.L. and Churchwell, M.I. (1997). Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. Analytical Biochemistry. 250: 10-17.

[51] Niwa, M. and Kawamoto, A. (2003). Development of a rapid detection method of *A. acidoterrestris*, hazardous bacteria to acidic beverage. Fruit Processing. 13: 102-107.

[52] Niwa, M. and Kuriyama, A. (2003). *A. acidoterrestris* rapid detection kit. Fruit Processing. 13: 328-331.

Kitipong.A@chula.ac.th
*อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
*Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok