ผลของการเตรียมหัวเชื้อด้วยสภาวะที่เป็นกรดต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus casei* ในสภาวะกรดและในน้ำผลไม้จำลอง

EFFECT OF ACIDIC ADAPTATION ON VIABILITY OF LACTOBACILLUS CASEI IN ACIDIC CONDITION AND MODEL FRUIT JUICE

ปรมาภรณ์ เกิดทรัพย์[1] และ วรากร เกิดทรัพย์[2]
[1]อาจารย์, คณะเทคโนโลยีและนวัตกรรมผลิตภัณฑ์การเกษตร มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ 63 หมู่ 7 ต.องครักษ์ อ.องครักษ์ จ.นครนายก 26120, paramapornk@g.swu.ac.th
[2]อาจารย์, คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษมบัณฑิต 1761 ถ.พัฒนาการ สวนหลวง กรุงเทพฯ 10250, warakorn.ker@kbu.ac.th

Paramaporn Kerdsup[1] and Warakorn Kerdsup[2]
[1]Lecturer, Faculty of Agricultural Product Innovation and Technology, Srinakharinwirot University 63 Moo 7 Ongkharak Nakhonnayok 26120, Thailand, paramapornk@g.swu.ac.th
[2]Lecturer, Faculty of Engineering, Kasem Bundit University 1761 Pattanakarn Rd. Suanluang Bangkok 10250, Thailand, warakorn.ker@kbu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเตรียมหัวเชื้อโพรไบโอติกส์ด้วยกรดอินทรีย์และอนินทรีย์ และติดตามความสามารถในการรอดชีวิตของโพรไบโอติกส์ในสภาวะกรดในกระเพาะอาหารและในน้ำผลไม้จำลอง จากการศึกษาพบว่า ในสภาวะการเตรียมหัวเชื้อที่มีค่า pH เท่ากัน การใช้กรดไฮโดรคลอริคซึ่งเป็นกรดอนินทรีย์ในการเตรียมหัวเชื้อทำให้ *Lactobacillus casei* สามารถทนต่อสภาวะที่มีกรดซิตริคเป็นส่วนประกอบและสภาวะน้ำผลไม้จำลองได้ดีขึ้น แต่ในสภาวะที่มีกรดมาลิคเป็นส่วนประกอบหลักกลับพบว่าการเตรียมหัวเชื้อด้วยกรดอินทรีย์จะทำให้ *L. casei* สามารถทนความเป็นกรดได้มากกว่า ส่วนการทดสอบการทนกรดในสภาวะกระเพาะอาหารจำลองพบว่าการเตรียมเซลล์โพรไบโอติกส์ด้วยกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ให้ผลไม่แตกต่างกัน จากการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลและกรดที่ถูกใช้ไปในสารละลายที่ใช้ในการเตรียมเซลล์พบว่า ในสารละลายสำหรับเตรียมเซลล์ที่ใช้กรดไฮโดรคลอริคเป็นส่วนประกอบจะพบการใช้น้ำตาลของเชื้อที่ต่ำกว่าในสารละลายสำหรับเตรียมเซลล์ที่ใช้กรดอินทรีย์เป็นส่วนประกอบอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งชี้ให้เห็นถึงการแสดงออกของเซลล์ที่แตกต่างกัน และกลไกการตอบสนองต่อกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ที่แตกต่างกันของเซลล์

คำสำคัญ: โพรไบโอติกส์ น้ำผลไม้จำลอง

ABSTRACT

This research aims to study the adaptation of probiotic bacteria with organic and inorganic acid to monitor the survival of probiotics in acidic conditions, the condition found in stomach and in simulated fruit juice. According to the studies, it has been found that, adaption of the cell with hydrochloric acid, and inorganic acid, promoted the acid resistance of *Lactobacillus casei* in citric acid solution and in simulated fruit juice. In the condition that malic acid was the main acid component, the cell adaptation with organic acid causes more acid tolerance of the cell. However, preparation of the cell with organic and inorganic acid showed the same acid tolerance of the Lactobacillus in simulated stomach condition. The sugar content in the adapted solution was determined and found that in hydrochloric acid adjusted solution, sugar utilization of the cells was significantly lower than in the organic acid adjusted solution. This indicates the cell adaption process and the response mechanism of the cell to organic and inorganic acid were not the same.

KEYWORDS: probiotics, model fruit juice

1. บทนำ

โพรไบโอติกส์ หมายถึงจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่มีความสามารถในการทนกรดในกระเพาะอาหารและผ่านเข้าสู่ลำไส้เล็กได้ และช่วยปรับสมดุลในระบบลำไส้ของผู้บริโภค [1] สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ถือว่าเป็นโพรไบโอติกส์ที่ดีโดยทั่วๆ ไป ได้แก่ Lactobacilli และ Bifidobacteria [2] โพรไบโอติกส์แบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่ก่อประโยชน์ให้กับเจ้าบ้านเมื่อรับประทานเข้าไปในปริมาณที่มากเพียงพอ [3] ส่วนใหญ่แล้วโพรไบติกส์แบคทีเรียจะถูกประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์นมโดยใช้ในรูปของทั้งหัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการหมักหรือเพียงแต่เติมลงไปในผลิตภัณฑ์ก็ได้

เดิมทีนั้นเชื้อโพรไบโอติกส์มักจะถูกเติมหรือใช้เป็นส่วนประกอบของหัวเชื้อในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์นมหมัก เช่น โยเกิร์ต เนยแข็ง รวมทั้ง เนย [4] ซึ่งผู้บริโภคที่แพ้นมหรือมีอาการ lactose intolerant ไม่สามารถรับประทานผลิตภัณฑ์จากนมได้เนื่องจากอาการดังกล่าวเกิดจากการขาดเอนไซม์ย่อยแลคโตส และยังไม่มีการค้นพบวิธีการรักษาที่ได้ผลแน่นอน การดูแลผู้ที่มีอาการดังกล่าวจึงต้องอาศัยการควบคุมอาหารเป็นหลัก [5] ต่อมาจึงได้มีการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโพรไบโอติกส์มากขึ้นโดยใช้วัตถุดิบหลักอื่นๆ นอกเหนือจากนมในการผลิตโพรไบโอติกส์บางสายพันธุ์

ในทางอุตสาหกรรม *Lactobacillus casei* ได้ถูกนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกส์อย่างแพร่หลาย โดยใช้เติมลงในอาหารหลากหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งผลิตภัณฑ์จากนม อย่างไรก็ดียังมี

ผู้บริโภคส่วนหนึ่งที่มีอาการแพ้นมวัวและไม่สามารถรับประทานนมได้ โดยเฉพาะในประเทศไทยซึ่งประชากรบางส่วนไม่ดื่มนม โดยวัยกลางคนและผู้สูงอายุของไทยไม่ดื่มนมถึงร้อยละ 77.7 ในจำนวนนี้มีผู้ที่ดื่มนมเป็นประจำมีต่ำกว่าร้อยละ 10 และประชากรไทยส่วนใหญ่บริโภคนมต่ำกว่าระดับมาตรฐานที่แนะนำ [6] น้ำผลไม้จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ผู้ผลิตส่วนใหญ่หันมาให้ความสนใจ เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถรับประทานได้ทุกเพศทุกวัย อย่างไรก็ดีปัญหาหลักของการใช้น้ำผลไม้เป็นผลิตภัณฑ์หลักในการเสริมโพรไบโอติกส์คือความเป็นกรดที่สูงในน้ำผลไม้ ทำให้เซลล์โพรไบโอติกส์ที่มีชีวิตตายลงอย่างรวดเร็วระหว่างการเก็บรักษา จึงมีผู้วิจัยศึกษาความสามารถในการทนกรดและการเตรียมเซลล์โพรไบโอติกส์รูปแบบต่างๆ เพื่อให้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์นี้สามารถอยู่รอดในผลิตภัณฑ์ได้นานขึ้น

จุลินทรีย์ในกลุ่ม Lactobacillus มีความสามารถในการทนกรดได้มากกว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ โดยส่วนใหญ่ เนื่องจากมีกลไกธรรมชาติที่หลากหลายซึ่งสามารถป้องกันตัวเองจากการถูกทำลายจากกรด ได้แก่ กลไกในการรักษาสมดุลของ pH ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งการเคลื่อนย้ายโปรตอนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ ATPase หรือ H^+-ATPase นั้นเป็นกลไกสำคัญอย่างหนึ่งที่จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการหมักหลายๆ ชนิดใช้ในการควบคุม pH ภายในเซลล์ด้วย [7-8] โดยสมบัติเอนไซม์ดังกล่าวนี้ที่พบใน *L. casei* และ *L. plantarum* จะทำงานได้ดีที่สุดที่ pH ประมาณ 5.0-5.5 ซึ่งต่ำกว่า pH ที่เหมาะสำหรับการทำงานของ H^+-ATPase ที่พบในแบคทีเรียอื่นๆ โดยพบว่าใน pH ที่เหมาะสมในการทำงานของ H^+-ATPase ใน *E. coli* และ *L. lactis* subsp. *lactis* อยู่ที่ 6.0 และ 7.0 ตามลำดับ [9-10] ซึ่งความสามารถในการทำงานของ H^+-ATPase นี้จะส่งผลต่อการขนส่งโปรตรอนออกจากไซโตพลาสซึมโดยรวม สำหรับ pH ที่ต่ำที่สุดที่ H^+-ATPase ยังทำงานได้ใน *L. casei* และ *L. plantarum* ตรวจพบที่ pH 4.0 [11] ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนกรดต่ำ เช่น *Actinomyces viscosus* ที่พบการขับ pH ออกจากเซลล์ได้ต่ำสุดอยู่ที่ 6.0 [12] กลไกอย่างที่สองที่ทำให้เซลล์ของ Lactobacillus ทนต่อกรดได้ดีคือ Glutamate decarboxylation เป็นกระบวนการเปลี่ยนกรดอะมิโนกลูตาเมท (glutamate) ให้เป็น γ-aminobutyric acid (GABA) โดยการทำงานของเอนไซม์ glutamate decarboxylase (GAD) ซึ่งในกระบวนการจะมีการใช้โปรตอน (H^+) ร่วมด้วย เอนไซม์ GAD สามารถพบได้ทั่วไปในเซลล์ยูคาริโอตและโปรคาริโอต แต่จะมีหน้าที่แตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของเซลล์ที่พบ สำหรับในจุลินทรีย์ GAD จะทำหน้าที่สำคัญในการต้านทานสภาวะที่เป็นกรดภายนอกเซลล์ โดยการเปลี่ยนกลูตาเมทซึ่งมีความเป็นกรดให้กลายเป็น GABA ที่มีความเป็นกรดต่ำกว่าจะเป็นการลดความเป็นกรดในระบบอีกทางหนึ่งนอกเหนือจากการดึงโปรตอนมาใช้ในปฏิกิริยา [13-14] ส่วนกลไกอย่างที่สามได้แก่ Arginine Deiminase Pathway (ADI) เป็นกระบวนการที่พบบ่อยในจุลินทรีย์ Lactobacillus โดยจะเกิดปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการแตกของโมเลกุล arginine

ได้เป็นแอมโมเนีย (NH_3) และสารประกอบอื่นๆ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ arginine deiminase, ornithine transcarbamoylase และ carbamate kinase โดยมีลำดับขั้นของการเกิดปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน ตามลำดับของเอนไซม์ทั้งสาม โดย arginine 1 โมเลกุลจะทำให้เกิดแอมโมเนีย 2 โมเลกุล ซึ่งแอมโมเนียมีฤทธิ์เป็นด่าง จึงทำให้กลไกนี้เป็นกลไกสำคัญอันหนึ่งที่จะช่วยในการต้านทานต่อสภาวะกรดของจุลินทรีย์ได้ [15] จากงานวิจัยหลายๆ งานจะพบกระบวนการ ADI ใน Lactobacillus หลายสายพันธุ์ เช่น *L. sanfranciscensis*, *L. brevis* AM1, AM8, 10A, *L. hilgradii* 51B และ *L. fructivoran* [16] และกลไกสุดท้ายที่สำคัญและพบมากใน Lactobacillus ทุกสายพันธุ์ ได้แก่ การปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียเป็นส่วนสำคัญในการอยู่รอดของจุลินทรีย์ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ โดยเฉพาะสภาวะที่ทำให้เซลล์เกิดความเครียด เช่น อุณหภูมิ แรงดันออสโมติก หรือค่า pH ที่ไม่เหมาะสม การที่จุลินทรีย์ต้องอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมจะพบการเปลี่ยนแปลงการสังเคราะห์โปรตีนบางชนิดที่ส่งผลถึงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย [17] กลไกการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวประกอบด้วยการเปลี่ยนอัตราส่วนไขมันอิ่มตัว ความยาวของสายคาร์บอน ตำแหน่งของกิ่งก้าน cis-trans isomerisation และการปรับเปลี่ยนกรดไขมันไม่อิ่มตัวไปเป็นกรดไขมันที่มีไซโคลโพรเพนเป็นส่วนประกอบในโมเลกุล (cyclopropane fatty acid) โดยการทำงานของเอนไซม์ cyclopropane fatty acid (CFA) synthase [18] แม้ว่ายังไม่มีคำอธิบายที่ชัดเจนเกี่ยวกับการทำงานหรือลักษณะทางเคมีกายภาพที่เปลี่ยนแปลงไปของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ประกอบด้วย CFA ปริมาณสูง แต่มีรายงานวิจัยหลายงานยืนยันเป็นที่แน่ชัดว่าการสร้าง CFA เพิ่มขึ้นมีส่วนเกี่ยวข้องในการช่วยให้จุลินทรีย์หลายชนิดรอดชีวิตในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีขึ้น เช่น *Escherichia coli* [19] *Samonella* [20] และแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* เป็นต้น จากรายงานของ Zavaglia และคณะในปี 2000 [21] พบว่าการเพิ่มขึ้นของ CFA ช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์มีเสถียรภาพที่ดีขึ้นในด้านการเป็นเยื่อเลือกผ่าน แต่ยังไม่สามารถอธิบายกลไกได้แน่ชัด อย่างไรก็ดี CFA เป็นสารประกอบที่มีความเสถียรต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีมากกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งพบว่า CFA สามารถต้านทานต่อ ozonolysis และ oxidation ที่ไม่รุนแรงมากได้ดี จึงคาดว่าคุณสมบัติทางเคมี ของ CFA น่าจะเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยเสริมการรอดชีวิตมากกว่าสมบัติทางกายภาพ [18]

จากกลไกต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนกรดของจุลินทรีย์ในกลุ่ม Lactobacillus ได้มีการศึกษาเพิ่มเติมจำนวนมากถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ และพบว่ามียีนที่หลากหลายที่เกี่ยวข้อง ซึ่งยีนส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องนั้นจะไม่ทำงานหากจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม หรือในสภาวะที่ไม่มีความเป็นกรดสูงเกินไป อย่างไรก็ตามเมื่อจุลินทรีย์เริ่มอยู่ในภาวะที่เป็นกรด มันจะเริ่มปรับตัวและเริ่มเตรียมพร้อมในการต้านทานสภาวะดังกล่าว ในปี 1999 Rowbury และ Goodson [22] ได้ศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตรวจจับค่าความเป็นกรดของเชื้อ *E. coli* และพบว่าโปรตีนดังกล่าวจะทำงานโดยการตรวจวัด pH ภายนอกเซลล์ มิใช่ภายในเซลล์ ทำให้

จุลินทรีย์ที่มีระบบดังกล่าวสามารถตอบสนองต่อสภาวะที่เป็นกรดได้รวดเร็ว ส่งผลให้สามารถทนกรดได้ดีขึ้นด้วย ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะกระตุ้นจุลินทรีย์ให้มีความพร้อมในการทนกรดมากขึ้นด้วยการปรับ pH ภายนอกเซลล์ ต่อมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับเซลล์ที่อยู่ในสภาวะกรด ทั้งในด้านการสังเคราะห์โปรตีนและกรดไขมันที่เปลี่ยนแปลงไป และพบว่าโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นโดย Lactobacillus ที่เจริญในสภาวะที่เป็นกรดจะมีความแตกต่างจากการเจริญที่สภาวะปกติเป็นอย่างมาก โดยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ H^+-ATPase และเอนไซม์ในระบบเมทาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตจะเปลี่ยนแปลงไป [23-24] นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงที่เยื่อหุ้มเซลล์โดยใน *L. casei* จะพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้นและมีความยาวเฉลี่ยของสายคาร์บอนหลักมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของ CFA อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพาะเลี้ยงที่ pH 3.5 ซึ่งหากทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในลักษณะที่เพิ่มความสามารถในการสังเคราะห์ CFA จะทำให้เซลล์ทนกรดได้ดีขึ้นอีกด้วย [25] ในปี 2012 Zhang และคณะ [26] ได้ทดลองเตรียมเชื้อ *L. casei* ในสภาวะที่เป็นกรดที่ช่วงเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่เตรียมด้วย pH ที่เหมาะสมกับเชื้อ (pH 6) และพบว่าเชื้อที่ผ่านการเตรียมในสภาวะกรดในช่วงเวลาสั้นๆ แล้วนำไปเติมลงในอาหารอื่นที่มีค่า pH ต่ำๆ จะมีความสามารถในการรอดชีวิตได้ดีกว่าเชื้อที่ไม่ผ่านการเตรียมในสภาวะกรดถึง 318 เท่า

แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* นี้ จะพบการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว รวมถึงปริมาณ CFA ในเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่เป็นกรด โดยใน *L. coryniformis* Si3 จะพบ CFA ชนิด 18:1Δ9cis เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพาะเลี้ยงที่ pH 4.5 [27] และใน *L. casei* จะพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้นและมีความยาวเฉลี่ยของสายคาร์บอนหลักมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของ CFA อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพาะเลี้ยงที่ pH 3.5 ซึ่งหากทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในลักษณะที่เพิ่มความสามารถในการสังเคราะห์ CFA จะทำให้เซลล์ทนกรดได้ดีขึ้นอีกด้วย [25] อย่างไรก็ดียังมีข้อขัดแย้งจากการศึกษาของ Broadbent และคณะในปี 2010 [28] ที่ได้ทำการศึกษาใน *L. casei* ATCC334 ที่ pH 4.5 กลับพบการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิ่มตัวแทน ในงานวิจัยหลายๆ งานได้ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับ CFA ใน *Lactobacillus* และพบว่า ยีน CFA ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ cyclopropane fatty acid synthase จะถูกกระตุ้นได้ด้วยค่า pH ต่ำๆ จากการศึกษาใน *L. rhamnosus* อธิบายการทำงานของยีนดังกล่าวว่าไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อ pH ในระบบสูงกว่า 5.0 [29] นอกจากการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องแล้ว สภาพแวดล้อมอื่นๆ ที่จุลินทรีย์อาศัยอยู่ยังมีส่วนในการสังเคราะห์ CFA เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่เป็นกรด จากการศึกษาใน *L. helveticus* ที่เลี้ยงในอาหารที่มีกรด oleic และ linoleic อยู่มากจะมีผลให้การสังเคราะห์ CFA สูงขึ้นเมื่อเชื้ออยู่ในสภาวะกรด [30] และใน *L. sanfranciscensis* จะสังเคราะห์ CFA ผ่านกระบวนการที่มีออกซิเจนได้ดี ในขณะที่ *L. helveticus* จะใช้กระบวนการที่ไม่

มีออกซิเจนได้ดีกว่า ส่งผลให้ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีความสามารถในการทนกรดได้ต่างกันเมื่อปริมาณออกซิเจนในระบบต่างกัน [31]

จากที่กล่าวมาทั้งหมดจะเห็นได้ว่า แบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacillus สามารถป้องกันตัวเองจากสภาวะภายนอกที่เป็นกรดได้ด้วยกลไกที่หลากหลาย และการเตรียมเชื้อในสภาวะที่เป็นกรดก่อนนำมาใช้งาน จะทำให้เชื้อมีความสามารถในการทนกรดได้มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ดียังมีความแตกต่างของการใช้กรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ต่อการกระตุ้นความสามารถในการทนกรดนี้ เนื่องจากความสามารถในการผ่านเข้าสู่เซลล์ของกรดแต่ละชนิดไม่เท่ากัน ในกรณีของกรดแลคติกซึ่งเป็นกรดอินทรีย์อย่างอ่อน จะสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายในลักษณะที่เป็น protonated form [7] สำหรับกรดซิตริกจุลินทรีย์ในกลุ่ม Lactobacillus สามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารจำพวก acetoin และ diacetyl ได้ [32] และกรดมาลิกจะเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการ malolactic fermentation [33] กรดอินทรีย์เหล่านี้จะมีผลกระทบต่อเซลล์น้อยกว่ากรดอนินทรีย์ งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาความแตกต่างระหว่างการใช้กรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ในการเตรียมหัวเชื้อ ต่อความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* ในสภาวะกรดชนิดต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลสำคัญในการนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มโพรไบโอติกส์ที่ทำจากน้ำผลไม้ ซึ่งจะมีค่า pH ค่อนข้างต่ำโดยธรรมชาติ

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 จุลินทรีย์และการเพาะเลี้ยง

คณะผู้วิจัยเลือกใช้เชื้อจุลินทรีย์ในตระกูล Lactobacilli 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus casei* LC1 ที่ได้รับการรับรองว่ามีความสามารถเป็นโพรไบโอติกส์ จากบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทย อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับสายพันธุ์ Lactobacilli [34] เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตลอดการทดลอง การเพาะเลี้ยงหัวเชื้อจุลินทรีย์ใช้ *L. casei* ที่เป็นผงแห้ง (freezed-dry) ปริมาณ 0.05 กรัม เติมลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 30 mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 1 mL ลงอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ขวดใหม่ปริมาตร 30 mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลองขั้นต่อๆ ไป

2.2 การเตรียมหัวเชื้อด้วย pH ต่ำ

นำหัวเชื้อ *L. casei* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาตร 10 mL มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer 2 ครั้ง และนำมากระจายตัวอีกครั้งใน MRS broth ปริมาตร 10 mL แล้วจึงเติมลงใน MRS broth ปริมาตร 100 mL ที่ปรับ pH ให้เป็น 3.5, 4.5 และ 5.5 โดยใช้กรดซิตริค หรือกรดมาลิค หรือกรด

ไฮโดรคลอริค (HCl) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการกรองด้วยเมมเบรน ขนาด 0.2 µm (ไม่ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนเพราะจะทำให้กรดซิตริคเปลี่ยนรูปและสลายตัว) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อบ่มครบตามเวลาแล้วจะทำการล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer 2 ครั้ง และนำเซลล์ของ *L. casei* มากระจายตัวอีกครั้งใน phosphate buffer pH 6.5 แล้วจึงนำเซลล์ที่ได้ไปตรวจสอบความสามารถของเชื้อในการทนกรดรูปแบบต่างๆ

2.3 การเตรียมหัวเชื้อด้วย pH ต่ำต่อการรอดชีวิตของ *L. casei* ในสภาวะกรด

นำเชื้อ *L. casei* ที่ผ่านการเตรียมที่สภาวะ pH ต่ำรูปแบบต่างๆ ปริมาตร 3 mL มาเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 30 mL ที่ปรับ pH ให้เป็น 3.5, 4.5 และ 5.5 โดยใช้กรดซิตริคหรือกรดมาลิค และผ่านการฆ่าเชื้อโดยกรองด้วยเมมเบรน ขนาด 0.2 µm นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 วัน เก็บตัวอย่างมาตรวจวัดการรอดชีวิตของเชื้อทุกวัน โดยทำการ spread plate ลงบน MRS agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 – 72 ชั่วโมง

2.4 การเตรียมหัวเชื้อด้วย pH ต่ำต่อการรอดชีวิตของ *L. casei* ในสภาวะน้ำผลไม้จำลอง

เตรียมน้ำผลไม้จำลองโดยผสมซูโครส 2% กลูโคส 1% และฟรุกโตส 1% ด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH เป็น 3.5 ด้วยกรดซิตริก จากนั้นฆ่าเชื้อโดยกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.2 µm แล้วนำเชื้อ *L. casei* ที่ผ่านการเตรียมที่สภาวะ pH ต่ำรูปแบบต่างๆ มาเติมลงในน้ำผลไม้จำลอง ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *L. casei* ในน้ำผลไม้จำลองที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C โดยตรวจวัดการรอดชีวิตของเชื้อทุก 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยทำการ spread plate ลงบน MRS agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 – 72 ชั่วโมง และทำการวัดปริมาณกรดทั้งหมด รวมถึงปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดที่เหลืออยู่ในน้ำผลไม้จำลอง

2.5 การศึกษาผลของ pH ที่ใช้เตรียมหัวเชื้อต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus casei* ในระบบทางเดินอาหารจำลอง

นำเชื้อ *L. casei* ที่ผ่านการเตรียมที่สภาวะ pH ต่ำ ซึ่งให้ผลการรอดชีวิตในสภาวะกรดดีที่สุด ปริมาตร 3 mL เติมลงในสารละลายเปปโตน ปริมาตร 30 mL ที่ปรับ pH เป็น 2.0 ด้วยกรด HCl และผ่านการฆ่าเชื้อโดยการกรองด้วยเมมเบรน ขนาด 0.2 µm นำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เก็บตัวอย่างและวัดการรอดชีวิตของเชื้อทุกชั่วโมงเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.6 การวิเคราะห์ทางเคมี

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (ซูโครส, กลูโคส, ฟรุกโตส) โดยใช้ HPLC นำตัวอย่างประมาณ 1mL ใช้หลอดฉีดยาดูดขึ้นมาจนหมด นำมาฉีดลงใน vial โดยผ่านหัวกรอง ปิดฝาแล้วนำเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้ column carbohydrate ปริมาณตัวอย่างที่ใช้เท่ากับ 0.5 µL ใช้ mobile phase เป็นสารผสม อัตราส่วนระหว่าง น้ำ : Acetonitrile เป็น 25 : 75 มีอัตราการไหล 1.4 mL/min ใช้เวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 10 นาที

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริคและกรดแลคติคด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมม์ C-18 มีกรดซัลฟิว ริคเข้มข้น 0.1 M เป็น mobile phase ปริมาตรตัวอย่าง 10 µL ใช้อัตราเร็วในการชะ 1 mL/min ระยะเวลาการวิเคราะห์ 30 นาที ใช้ detector ชนิด DAD ที่ความยาวคลื่น 210 nm และตรวจวัดปริมาณกรดทั้งหมดด้วยวิธีการไตเตรท โดยปิเปตตัวอย่างมา 2 mL ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ หยด 1% ฟีนอฟธาลีน 2 – 3 หยด ไทเทรตกับ 0.01 N NaOH จนถึงจุดยุติแล้วนำมาคำนวณหาปริมาณกรดด้วยสมการ

$$\%\text{Acidity} = \frac{\text{ความเข้มข้น(Normal)ของNaOH} \times \text{ปริมาตรของNaOH ที่ใช้ (mL)} \times \text{น้ำหนักสมมูลของกรด}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (mL)} \times 10} \quad (1)$$

3. ผลและการวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 ผลของการเตรียมหัวเชื้อด้วย pH ต่ำต่อการรอดชีวิตของ *L. casei* ในสภาวะกรด

ในการเตรียมหัวเชื้อด้วยสภาวะกรด (pH ต่ำ) ใช้กรด 3 ชนิด ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริค (เป็นตัวแทนของกรดอนินทรีย์ที่นิยมใช้ในการปรับสภาวะเลียนแบบระบบทางเดินอาหารจำลอง) กรดซิตริค และกรดมาลิค (เป็นตัวแทนของกรดอินทรีย์ที่พบมากในน้ำผลไม้) โดยใช้ระดับความเข้มข้นของกรดทั้ง 3 ชนิด ที่ 3 ระดับ คือที่ pH 3.5, 4.5, และ 5.5 ซึ่งค่า pH ที่ 4.5 เป็นค่าที่นิยมใช้ในสารละลายสำหรับเตรียมเซลล์เพื่อให้ทนต่อสภาวะที่เป็นกรด เนื่องจากเป็นสภาวะที่ไม่รุนแรงเกินไปและสามารถกระตุ้นให้จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ปรับตัวได้ อีกทั้งยังไม่ทำให้สูญเสียเซลล์จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ที่มีชีวิตไป เนื่องจากที่ pH 4.5 ไม่ทำให้ pH ภายในเซลล์ของ Lactobacillus ลดต่ำลงมากเกินไป ซึ่งหาก pH ภายในเซลล์ยังอยู่ในช่วง 4.6 – 4.8 จะทำให้ Lactobacillus บางสายพันธุ์ชะลอการเจริญ และทำให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนกรดของเซลล์ถูกกระตุ้นให้ทำงาน แต่เป็นสภาวะที่ไม่ทำให้เซลล์ตาย [35] ในการทดลองนี้คาดหวังผลในการพัฒนาหัวเชื้อโพรไบโอติกส์ด้วยสภาวะที่เป็นกรด เพื่อให้จุลินทรีย์เกิดการปรับตัวและทนสภาวะกรดในน้ำผลไม้ได้มากขึ้น และเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมโพรไบโอติกส์ได้ต่อไป

จากการทดลองเตรียมเซลล์โพรไบโอติกส์สายพันธุ์ *Lactibacillus casei* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ปรับ pH ด้วยกรดทั้ง 3 ชนิดข้างต้น พบว่าการใช้กรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ใน

การเตรียมเซลล์โพรไบโอติกส์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะส่งผลต่อการทนกรดในสภาวะต่าง ๆ ไม่เหมือนกัน โดยการเตรียมเซลล์ด้วยกรดไฮโดรคลอริคทำให้ *L. casei* สามารถทนสภาวะกรดซิตริคได้ดีที่สุดเมื่อทำการทดลองเป็นเวลา 2 วัน ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยมีจำนวนเซลล์ลดลงเพียงประมาณ 1.5 logCFU/mL ในขณะที่การเตรียมเซลล์ด้วยกรดซิตริกและกรดมาลิกจะพบจำนวน *L. casei* ที่รอดชีวิตลดลงในช่วง 2 – 5 logCFU/mL แต่การเตรียมเซลล์ด้วยกรดมาลิค จะทำให้เชื้อทนต่อสภาวะเครียดในกรดมาลิคได้ดีกว่าการเตรียมเซลล์ด้วยกรดไฮโดรคลอริค (ตารางที่ 2) โดยเมื่อทำการทดลองเป็นเวลา 2 วัน จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *L. casei* ที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดมาลิคที่ pH 4.5 จะลดลงเพียงประมาณ 2 logCFU/mL แต่เซลล์ที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดไฮโดรคลอริคที่ pH 4.5 มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงถึงประมาณ 5 logCFU/mL ทั้งนี้หากพิจารณาจากค่า pH ที่เท่ากัน กรดไฮโดรคลอริคที่เป็นกรดแก่จะแตกตัวได้ 100% ในขณะที่กรดอินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ กรดซิตริคและกรดมาลิคจะแตกตัวได้แตกต่างกันตามค่า pKa ของกรดแต่ละชนิด ดังนั้นเมื่อพิจารณาที่ค่า pH ที่เท่ากันโดยใช้กรดที่แตกต่างกัน 3 ชนิดนี้ปรับค่า จะทำให้ในสารละลายมีปริมาณโมเลกุลของกรดในสารละลายแตกต่างกัน

ตารางที่ 1 การรอดชีวิตของ *L. casei* ในสภาวะกรดซิตริค pH 3.5 เมื่อเตรียมเชื้อด้วยกรดไฮโดรคลอริก กรดมาลิค และกรดซิตริคที่ pH ต่าง ๆ

สภาวะการเตรียมเซลล์	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (logCFU/mL)		
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2
ไม่ผ่านการเตรียมเซลล์	7.17 ± 0.05	ND	ND
HCl (pH 5.5)	7.26 ± 0.03	6.60 ± 0.15	6.52 ± 0.07
HCl (pH 4.5)	7.08 ± 0.25	6.78 ± 0.20	6.67 ± 0.20
HCl (pH 3.5)	7.31 ± 0.37	6.78 ± 0.31	6.46 ± 0.11
Malic acid (pH 5.5)	7.44 ± 0.07	6.00 ± 0.30	4.40 ± 0.46
Malic acid (pH 4.5)	7.48 ± 0.40	4.48 ± 0.24	2.52 ± 0.77
Malic acid (pH 3.5)	7.59 ± 0.29	3.13 ± 0.13	ND
Citric acid (pH 5.5)	7.47 ± 0.05	6.22 ± 0.11	5.94 ± 0.26
Citric acid (pH 4.5)	7.52 ± 0.04	6.03 ± 0.03	4.91 ± 0.13
Citric acid (pH 3.5)	7.45 ± 0.07	3.23 ± 0.23	ND

ตารางที่ 2 การรอดชีวิตของ ***L. casei*** ในสภาวะกรดมาลิค pH 3.5 เมื่อเตรียมเชื้อด้วยกรดไฮโดรคลอริก กรดมาลิค และกรดซิตริคที่ pH ต่าง ๆ

สภาวะการเตรียมเซลล์	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (logCFU/mL)		
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2
ไม่ผ่านการเตรียมเซลล์	7.22 ± 0.11	3.35 ± 0.13	ND
HCl (pH 5.5)	7.49 ± 0.05	5.00 ± 0.25	ND
HCl (pH 4.5)	7.11 ± 0.17	3.08 ± 0.07	2.40 ± 0.90
HCl (pH 3.5)	7.30 ± 0.13	2.55 ± 0.11	ND
Malic acid (pH 5.5)	7.14 ± 0.23	6.89 ± 0.48	ND
Malic acid (pH 4.5)	6.97 ± 0.22	6.25 ± 0.19	5.68 ± 0.46
Malic acid (pH 3.5)	7.59 ± 0.29	3.13 ± 0.13	ND
Citric acid (pH 5.5)	7.53 ± 0.05	ND	ND
Citric acid (pH 4.5)	7.52 ± 0.04	2.15 ± 0.25	2.63 ± 0.13
Citric acid (pH 3.5)	7.53 ± 0.07	3.23 ± 0.23	ND

กลไกต่าง ๆ ที่เซลล์ใช้ในการป้องกันตนเองจากสภาวะหนึ่ง ๆ อาจส่งผลดีเมื่อเซลล์จุลินทรีย์ต้องเจอกับสภาวะเครียด เช่น สภาวะกรด แต่ในสภาวะเครียดแบบเดียวกัน (ในที่นี้คือสภาวะกรด) หากองค์ประกอบของสิ่งกระตุ้นความเครียดที่พบในระบบมีความแตกต่างกัน เช่นในกรณีนี้คือสภาวะกรดที่เกิดจากกรดซิตริคและกรดมาลิค จำทำให้ผลที่ได้มีความแตกต่างกันได้ เนื่องจากกรดแต่ละชนิดสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนได้ในระดับที่ต่างกัน [36] ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณประจุและขนาดโมเลกุลเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้กรดอินทรีย์แต่ละชนิดผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์จุลินทรีย์ได้ไม่เหมือนกัน ลักษณะโมเลกุลของกรดอินทรีย์ที่ยังไม่แตกตัวจะสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่ภายเซลล์ได้ง่ายและไปเกิดการแตกตัวภายในเซลล์ ในขณะที่กรดอนินทรีย์ซึ่งในที่นี้ได้แก่กรดไฮโดรคลอริคจะแตกตัวได้ทั้งหมด แม้ว่าเซลล์แบคทีเรียจะมีกระบวนการป้องกันการแพร่ของ H^+ ที่มากเกินไปเข้าสู่เซลล์ แต่ด้วยลักษณะโมเลกุลที่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้อย่างรวดเร็วจึงทำให้กรดไฮโดรคลอริคสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ต่อปริมาณ H^+ ภายในเซลล์ที่สูงขึ้นได้รวดเร็วกว่า [37] โดยการตอบสนองระดับยีนที่สำคัญของเซลล์แบคทีเรียต่อสภาวะที่เป็นกรดคือการปรับลดอัตราการผ่านเข้าออกของสารระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งก็คือการลด membrane fluidity ของเซลล์ลง กระบวนการสำคัญที่พบคือการปรับอัตราส่วนการสร้างกรดไขมันอิ่มตัวให้สูงขึ้นและลดปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ลง

โดยกรดแต่ละชนิดจะกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้ไม่เท่ากัน ส่วนหนึ่งขึ้นกับค่า pKa ของกรดนั้นๆ และโดยส่วนมากกรดที่กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เยื่อหุ้มเซลล์ได้มากเมื่อนำมาใช้เตรียมเซลล์จะทำให้จุลินทรีย์รอดชีวิตในสภาวะกรดได้ดีขึ้น แต่หลักการดังกล่าวยังไม่สามารถใช้อธิบายการทำงานของกรดบางชนิด เช่น กรดเบนโซอิค ที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อสูงแม้ว่าจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนกรดไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ดีก็ตาม ดังนั้นเมื่อใช้กรดต่างชนิดกันในการเตรียมเซลล์จึงให้ผลที่แตกต่างกันไป [38] ทั้งนี้ผลที่ได้ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ ชนิดของกรด และค่า pH ที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ [39]

3.2 ผลของการเตรียมหัวเชื้อด้วย pH ต่ำต่อการรอดชีวิตของ *L. casei* ในสภาวะน้ำผลไม้จำลอง

น้ำผลไม้จำลองที่ใช้ในงานวิจัยทำการปรับ pH ด้วยกรดซิตริค ซึ่งเป็นกรดอ่อนที่พบทั่วไปในน้ำผลไม้ และทำการฆ่าเชื้อด้วยการกรองได้ด้วยเมมเบรนขนาด 0.2 µm ซึ่งเป็นการไม่ผ่านความร้อน ทำให้โครงสร้างโมเลกุลของกรดซิตริคไม่เกิดการเปลี่ยนสภาพ ผลการศึกษาการรอดชีวิตของ *L. casei* ที่ผ่านการเตรียมเซลล์ด้วยสภาวะกรดแบบต่างๆ ในน้ำผลไม้จำลองแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งพบว่าการเตรียมเซลล์ด้วยกรดไฮโดรคลอริคที่ pH 3.5, 4.5 และ 5.5 ทำให้ *L. casei* รอดชีวิตในน้ำผลไม้จำลองได้ดีที่สุดในทุกค่า pH ที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ โดยมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงเพียงประมาณ 1.5 logCFU/mL ในเวลา 14 วันของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C และการเตรียมเซลล์ด้วยกรดซิตริคที่ pH 3.5 ให้ผลในการรอดชีวิตดีเป็นลำดับถัดมาโดยมีเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงประมาณ 2 logCFU/mL ในเวลา 14 วัน ซึ่งผลที่ได้มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกับผลการทดลองในตารางที่ 1 ซึ่งใช้ MRS broth เป็นสารละลายกรดในการทดสอบการรอดชีวิต

ตารางที่ 3 การรอดชีวิตของ *L. casei* ในสภาวะน้ำผลไม้จำลองที่ pH 3.5 เก็บรักษาที่ 4 °C เป็นเวลา 14 วัน

สภาวะการเตรียมเซลล์	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (logCFU/mL)		
	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14
ไม่ผ่านการเตรียมเซลล์	7.21 ± 0.06	ND	ND
HCl (pH 5.5)	7.03 ± 0.53	5.82 ± 0.20	5.52 ± 0.24
HCl (pH 4.5)	7.01 ± 0.47	6.23 ± 0.24	5.58 ± 0.14
HCl (pH 3.5)	7.18 ± 0.03	6.03 ± 0.11	5.50 ± 0.18

ตารางที่ 3 การรอดชีวิตของ *L. casei* ในสภาวะน้ำผลไม้จำลองที่ pH 3.5 เก็บรักษาที่ 4 °C เป็นเวลา 14 วัน (ต่อ)

สภาวะการเตรียมเซลล์	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (logCFU/mL)		
	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14
Malic acid (pH 5.5)	7.52 ± 0.22	3.17 ± 0.19	1.34 ± 0.26
Malic acid (pH 4.5)	7.02 ± 0.28	3.20 ± 0.20	3.01 ± 0.77
Malic acid (pH 3.5)	7.59 ± 0.29	3.13 ± 0.13	2.20 ± 0.17
Citric acid (pH 5.5)	7.03 ± 0.43	5.80 ± 0.09	3.74 ± 0.12
Citric acid (pH 4.5)	7.47 ± 0.67	5.95 ± 0.24	4.95 ± 0.06
Citric acid (pH 3.5)	7.22 ± 0.33	5.66 ± 0.40	5.14 ± 0.17

การใช้น้ำผลไม้จำลองให้ข้อสังเกตุของความแตกต่างระหว่างการผลการทดลองเทียบกับการใช้ MRS broth โดยการใช้น้ำผลไม้จำลองเป็นระบบที่มีเพียงน้ำตาลและกรด ไม่มีองค์ประกอบที่เป็นกรดอะมิโน ซึ่งแม้การทดลองในน้ำผลไม้จำลองจะให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองในสารละลาย MRS broth แต่การเตรียมเซลล์ด้วยกรดอินทรีย์ คือ กรดซิตริกและกรดมาลิคโดยใช้ pH ที่ต่ำกว่าในการเตรียมเซลล์ส่งผลให้การรอดชีวิตดีกว่า ซึ่งสวนทางกับการทดสอบใน MRS broth ที่การเตรียมเซลล์ที่ pH สูงกว่าให้ผลการรอดชีวิตที่ดีกว่า อย่างไรก็ดีจำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตในน้ำผลไม้ในวันที่ 14 จะมีจำนวนต่ำกว่าการรอดชีวิตในการทดสอบด้วย MRS broth จึงเป็นข้อสังเกตุอย่างหนึ่งว่า เมื่อทำการเตรียมเซลล์ด้วย MRS broth ในสภาวะกรดเป็นสภาวะที่มีกรดอะมิโนจำนวนมากอยู่ในระบบ ซึ่ง *L. casei* จะปรับตัวโดยใช้ทั้งกลไกที่มีและไม่มีการใช้กรดอะมิโนเข้าร่วมในกลไก แต่เมื่อนำมาทดสอบการรอดชีวิตในสภาวะที่ไม่มีกรดอะมิโน เช่น ในน้ำผลไม้ ทำให้กลไกที่ใช้กรดอะมิโนเข้าร่วมไม่สามารถใช้งานได้ คงเหลือแต่บางกลไกที่ไม่จำเป็นต้องใช้กรดอะมิโนเข้าร่วมยังสามารถทำหน้าที่ลดสภาวะเครียดในเซลล์ และยังคงทำให้เซลล์รอดชีวิตได้ดีระดับหนึ่ง

กลไกหลักที่มีกรดอะมิโนเข้ามาเกี่ยวข้องซึ่งจุลินทรีย์ในกลุ่ม Lactobacillus ทั่วไปใช้ในการลดสภาวะเครียดจากกรดในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ Glutamate Decarboxylation system (GDS) และ Arginine Deiminase pathway (ADP) ซึ่งใช้กรดอะมิโนกลูตาเมท (glutamate) และอาร์จินีน (arginine) ร่วมในระบบตามลำดับ โดยระบบ ADP จะสามารถลดความเป็นกรดในไซโตพลาสซึมได้มากกว่าเนื่องจากมีการสร้างแอมโมเนียซึ่งเป็นด่างออกมา ส่วนกลไกที่ไม่เกี่ยวข้องกับการใช้กรดอะมิโนได้แก่ การทำงานของเอนไซม์ H^+-ATPase ซึ่งทำหน้าที่ขนส่งโปรตอนออกนอกเซลล์ และกลไกการปรับเปลี่ยนโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการสร้าง cyclopropane

fatty acid ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายยากด้วยกรดได้ยากขึ้น [40] ดังนั้นจากผลการทดลองในตารางที่ 2 (น้ำผลไม้จำลอง) จึงพบการรอดชีวิตโดยรวมที่ต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับตารางที่ 1 (acidify MRS broth) อาจเนื่องมาจากระดับปริมาณกรดอะมิโนที่แตกต่างกันในสภาวะที่ใช้สภาวะที่ใช้ทดสอบ ในส่วนของปริมาณกรดในน้ำผลไม้หลังจากเติมโพรไบโอติกส์และเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 14 วัน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดซิตริกในน้ำผลไม้ (ตารางที่ 4) แสดงให้เห็นถึงสภาวะความเป็นกรดที่ไม่เปลี่ยนแปลงในตัวอย่างน้ำผลไม้จำลองตลอดระยะเวลาการทดลอง ส่วนปริมาณกรดแลคติกในน้ำผลไม้จำลองตรวจไม่พบตลอดระยะเวลา 14 วันของการทดลองในทุกสภาวะที่ทดสอบ (ไม่แสดงผลการทดลอง) สำหรับการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลในน้ำผลไม้จำลองเป็นที่น่าสนใจว่าไม่เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลที่แน่นอนในน้ำผลไม้จำลองทั้งในระบบที่เติม *L. casei* ที่ผ่านการเตรียมเซลล์และไม่ผ่านการเตรียมเซลล์ (ไม่แสดงผลการทดลอง) จึงเป็นเป็นไปได้ว่ากลไกการใช้น้ำตาลของเซลล์เน้นเพื่อการสร้างพลังงานเพื่อสร้างโปรตีนและกรดไขมันที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวจากสภาวะกรด ดังนั้นเมื่อไม่มีกรดอะมิโนในระบบซึ่งทำให้ขาดสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โปรตีนการใช้น้ำตาลจึงช้าลงด้วย

ตารางที่ 4 ปริมาณกรดซิตริคในน้ำผลไม้เมื่อมีการเติมจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ที่ผ่านการเตรียมที่สภาวะต่าง ๆ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 14 วัน

สภาวะการเตรียมเซลล์	วันที่	ปริมาณกรดซิตริกในน้ำผลไม้ (g/L)
ไม่ผ่านการเตรียมเซลล์	0	0.68 ± 0.12
	7	0.71 ± 0.09
	14	0.79 ± 0.10
เตรียมเชื้อด้วยกรดซิตริค pH 3.5	0	0.74 ± 0.05
	7	0.71 ± 0.02
	14	0.75 ± 0.15
เตรียมเชื้อด้วยกรดไฮโดรคลอริค pH 4.5	0	0.74 ± 0.09
	7	0.82 ± 0.06
	14	0.85 ± 0.10

3.3 การศึกษาผลของ pH ที่ใช้เตรียมหัวเชื้อต่อการรอดชีวิตของ *L. casei* ในระบบทางเดินอาหารจำลอง

ในการศึกษาผลของ pH ที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ในระบบทางเดินอาหารจำลอง ผู้วิจัยเลือกสภาวะการเตรียมเซลล์ที่ใช้กรดไฮโดรคลอริคที่ pH 4.5 และกรดซิตริคที่ pH 3.5 ซึ่งให้การรอดชีวิตของเซลล์ในน้ำผลไม้ดีที่สุดมาใช้ในการเตรียมเซลล์ และศึกษาการรอดชีวิตของ *L. casei* ในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองที่ pH 2.0 (ปรับโดยใช้กรดไฮโดรคลอริค) บ่มตัวอย่างที่ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ได้ผลดังตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่าเมื่อทดสอบในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลองที่ pH 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง การรอดชีวิตของจุลินทรีย์ที่ผ่านการเตรียมเซลล์ด้วยกรดจะสูงขึ้นอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ผ่านการเตรียม อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างกันระหว่างการเตรียมเซลล์ด้วยกรดซิตริคและกรดไฮโดรคลอริค โดยการรอดชีวิตของเซลล์จะลดลงประมาณ 3 logCFU/mL เมื่ออยู่ในระบบทางเดินอาหารจำลองที่ pH 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เป็นที่ทราบกันดีว่าการเตรียมเซลล์ด้วยกรดจะช่วยเพิ่มความสามารถในการทนกรดของ Lactobacillus และมีงานวิจัยหลายงานที่ศึกษาผลของการเตรียมเซลล์ Lactobacillus ด้วยกรดต่อการรอดชีวิตในสภาวะระบบทางเดินอาหารจำลอง ซึ่งพบว่าการเตรียมเซลล์ด้วยกรดที่ pH ต่างกันส่งผลอย่างมากต่อการรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารจำลอง เนื่องจากการอัตราการสร้างกรดไขมันอิ่มตัวและ cyclopropane fatty acid ที่ไม่เท่ากันในสภาวะการเตรียมเซลล์ที่ pH ต่างกัน ดังนั้นสภาวะการเตรียมเซลล์ที่เหมาะกับ Lactobacillus สายพันธุ์หนึ่งอาจไม่ใช่สภาวะที่เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์อื่นๆ [28]

ตารางที่ 5 การรอดชีวิตของ *L. casei* ในสภาวะทางเดินอาหารจำลองที่ pH 2.0

สภาวะการเตรียมเซลล์	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (logCFU/mL)
ไม่ผ่านการเตรียมเซลล์	0	7.23 ± 0.12
	1	3.23 ± 0.16
	2	ND
	3	ND
กรดไฮโดรคลอริค (pH 4.5)	0	7.25 ± 0.22
	1	5.82 ± 0.02
	2	5.18 ± 0.11
	3	4.14 ± 0.12

ตารางที่ 5 การรอดชีวิตของ *L. casei* ในสภาวะทางเดินอาหารจำลองที่ pH 2.0 (ต่อ)

สภาวะการเตรียมเซลล์	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (logCFU/mL)
กรดซิตริค (pH 3.5)	0	7.23 ± 0.01
	1	5.81 ± 0.03
	2	5.17 ± 0.05
	3	4.09 ± 0.04

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเตรียมเซลล์ที่สภาวะ pH ประมาณ 3.5 – 4.5 จะทำให้เซลล์รอดชีวิตในสภาวะกรดที่ pH ในช่วง 2.0 – 3.0 ได้ดีที่สุด โดยการทดลองลองใน *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 พบว่าเชื้อจะรอดชีวิตในน้ำแครนเบอร์รี่ (pH 2.7) ได้ดีที่สุดเมื่อเตรียมเซลล์ด้วย MRS broth pH 3.0 [41] และการศึกษาใน *Lactobacillus brevis* และ *Lactobacillus reuteri* พบว่าการเตรียมเซลล์ที่ pH 4.0 ทำให้แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้รอดชีวิตได้ดีขึ้นมากที่สุดในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง (pH 2.5) โดยรอดชีวิตได้มากกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านการเตรียมประมาณ 2.5 logCFU/mL [42] โดยทุกๆ การทดลองจะพบการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิ่มตัวและ cyclopropane fatty acid ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ทั้งสิ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ลักษณะดังกล่าวจะเป็นการลด cell membrane fluidity และ cell membrane permeability เพื่อลดการแพร่ของกรดเข้าสู่ภายในเซลล์ ในการทดลองนี้จึงมีความเป็นไปได้ว่าเมื่อเตรียมเซลล์ *Lactobacillus casei* ด้วยกรดไฮโดรคลอริคที่ pH 4.5 และกรดซิตริคที่ pH 3.5 เซลล์จะมีอัตราการสร้างกรดไขมันอิ่มตัวและ cyclopropane fatty acid ใกล้เคียงกัน จึงทำให้ทนต่อสภาวะกรดในทางเดินอาหารจำลองที่ pH 2.0 ได้ใกล้เคียงกัน

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในสารละลายที่ใช้ในการเตรียมเซลล์

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างสารละลายที่ใช้ในการเตรียมเซลล์โดยศึกษาเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสใน MRS broth ที่ปรับ pH เป็น 3.5 ด้วยกรดซิตริค กรดมาลิค และกรดไฮโดรคลอริค เพื่อวิเคราะห์ลักษณะการใช้น้ำตาลหรือลักษณะเมทาบอลิซึมของแหล่งคาร์บอน เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรดของ *L. casei* ได้ผลดังตารางที่ 6 โดยในสารละลายสำหรับเตรียมเซลล์ที่ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริคจะพบการใช้น้ำตาลต่ำกว่าในสารละลายที่ปรับ pH ด้วยกรดซิตริคและกรดมาลิคอย่างเห็นได้ชัด

ตารางที่ 6 ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไปในสารละลายกรดที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ ***L. casei*** เมื่อบ่มเซลล์ใน **MRS broth** เป็นเวลา **1** ชั่วโมง

สภาวะการเตรียมเซลล์	ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป (g/L)
กรดไฮโดรคลอริค (pH 3.5)	2.92 ± 1.34
กรดซิตริค (pH 3.5)	12.02 ± 2.50
กรดมาลิค (pH 3.5)	12.57 ± 0.30

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ในสภาวะเครียดจากกรดแลคติคพบว่ามีการแสดงออกของยีน 2 กลุ่มที่เพิ่มขึ้น ได้แก่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง surface protein และยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีกระบวนการหมัก (fermentation pathway) ซึ่งวิถีการหมักนี้เกี่ยวข้องกับการใช้กลูโคสและเปลี่ยนเป็นไพรูเวท (pyruvate) ทั้งนี้กรดอินทรีย์แต่ละชนิดจะกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้มากน้อยต่างกัน เนื่องจากรูปแบบที่เป็นพิษต่อเซลล์เป็นรูปแบบของกรดที่ไม่แตกตัว (undissociated form) ซึ่งสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียไปได้ง่าย ดังนั้นความสามารถในการแตกตัวที่ pH ต่างๆ และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์แต่ละชนิดจึงส่งผลต่อการทำงานของยีนกลุ่มต่างๆ ของแบคทีเรียไม่เท่ากันด้วย [43] นอกจากนี้จากการทดลองของ Koponen และคณะ [24] แสดงให้เห็นชัดเจนว่าในสภาวะที่เป็นกรด *Lactobacillus rhamnosus* GG จะมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ glycolysis และ phosphorylation เพื่อการเร่งใช้กลูโคสเมื่อมีกรดแลคติกซึ่งเป็นกรดอินทรีย์อยู่ในระบบ และในงานวิจัยของ Chen และคณะ [44] แสดงให้เห็นว่าการเตรียมเซลล์ *Lactobacillus Kefiranofaciens* ด้วยกรดไฮโดรคลอริคซึ่งไม่ใช่กรดอินทรีย์สามารถกระตุ้นการใช้คาร์โบไฮเดรตในเซลล์ได้เช่นกัน จะเห็นได้ว่าการกระตุ้นการใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นกลไกสำคัญกลไกหนึ่งในการปรับตัวในสภาวะกรดของเซลล์ อย่างไรก็ดีแม้ว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการใช้คาร์โบไฮเดรตจะถูกกระตุ้น แต่วิถีการใช้คาร์โบไฮเดรตหลังจากได้เป็นไพรูเวทแล้วมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างการเตรียมเซลล์ด้วยกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ โดยการใช้กรดแลคติคซึ่งเป็นกรดอินทรีย์จะพบการปรับวิถีเมทาบอลิซึมในการใช้ไพรูเวทให้เปลี่ยนไปเป็นกรดไขมันเพื่อใช้ในปรับโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ [45] ในขณะที่การใช้กรดไฮโดรคลอริคในการเตรียมเซลล์จะพบวิถีการปรับตัวที่เกี่ยวข้องกับ pH homeostasis มากขึ้น แต่พบวิถีที่เกี่ยวข้องกับการปรับโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์น้อยกว่า [44, 46] อย่างไรก็ดีผลการทดลองที่ผ่านมาใช้ Lactobacillus คนละสายพันธุ์และวิธีการทดลองที่แตกต่างกัน การเทียบเคียงอัตราการใช้น้ำตาลที่แตกต่างกันของระบบที่เตรียมเซลล์ด้วยกรดต่างชนิดกันจึงเป็นไปได้ยาก

จากการทดลองนี้จะเห็นว่าเมื่อเตรียมเซลล์ด้วยกรดอินทรีย์จะพบการใช้น้ำตาลกลูโคสที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ อาจเป็นผลมาจากกรดอินทรีย์ที่อยู่ในรูปแบบที่ไม่แตกตัวสามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของ *L. casei* ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับ H^+ จากกรดไฮโดรคลอริค เนื่องจากเซลล์ของ Lactobacillus มีกลไกป้องกันการผ่านเข้าออกของ H^+ ที่มากเกินไปอยู่แล้วตามธรรมชาติ เมื่อกรดอินทรีย์สามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ได้เร็วกว่าทำให้เซลล์เริ่มการปรับตัวเร็วกว่าและเร่งการใช้กลูโคสเพื่อปรับโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ จะเห็นได้ว่าการแสดงออกของเซลล์เมื่ออยู่ในสภาวะกรดของแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันและเป็นเรื่องที่ละเอียดอ่อน จึงควรมีการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลหรือการศึกษาระดับยีนของแต่ละสายพันธุ์เพิ่มเติมต่อไป

4. สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของการเตรียมเซลล์ด้วยกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์พบว่า การเตรียมเซลล์ด้วยกรดไฮโดรคลอริคเพิ่มความสามารถในการทนต่อกรดซิตริคและความสามารถในการรอดชีวิตในระบบน้ำผลไม้จำลองของ *L. casei* ได้ดีที่สุด เมื่อพิจารณาถึงการทดลองที่ผ่านมาซึ่งระบุถึงกลไกการปรับตัวที่ต่างกันเมื่อจุลินทรีย์ Lactbacillus อยู่ในสภาวะเครียดจากกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ โดยในสภาวะกรดอินทรีย์เซลล์จะปรับตัวโดยเน้นการปรับเปลี่ยนโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ ในขณะที่ในสภาวะกรดอนินทรีย์เซลล์จะเน้นระบบ pH homeostasis ภายในเซลล์ ทั้งนี้จากการทดลองนำเซลล์ที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดอินทรีย์หรือกรดอนินทรีย์มาทดสอบการทนกรดในรูปแบบต่างๆ จึงสรุปได้ว่า การกระตุ้นเซลล์ของ *L. casei* ไปในทิศทางที่เน้นการเพิ่มการทำงานของระบบ pH homeostasis ส่งผลดีต่อการทนกรดมากกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากต้องการนำเซลล์ไปใช้ประโยชน์ต่อในระบบที่ขาดกรดอะมิโน เช่น ในน้ำผลไม้ เป็นต้น

จากการศึกษาความสามารถในการทนกรดในระบบทางเดินอาหารจำลองที่ pH 2.0 พบว่าการเตรียมเซลล์ *L. casei* ด้วยกรดไฮโดรคลอริคที่ pH 4.5 ให้ผลใกล้เคียงกับการเตรียมเซลล์ด้วยกรดซิตริคที่ pH 3.5 แสดงให้เห็นว่าการใช้กรดแต่ละชนิดในการเตรียมเซลล์จะให้ผลแตกต่างกันไปหาใช้ที่ pH ต่างกัน ดังนั้นการเตรียมเซลล์ด้วยกรดต่างชนิดกันจึงต้องมีการศึกษาถึงค่า pH ที่เหมาะสมควบคู่กันไปด้วยเสมอ

References

[1] Charalampopoulos D, Wang R, Pandiella SS, Webb C. Application of cereal and cereal components in functional foods: a review. International Journal of Food Microbiology 2002;79:131-41.

[2] Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the colonic microflora: Introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition 1995;25:1401-12.

[3] Fuller R. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology 1989;66:365-78.

[4] Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology 2000;84:197-215.

[5] Schaafsma G. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. International Dairy Journal 2008;18:458-65.

[6] Warapone Satheannoppakao, Wichai Aekplakorn, Ratchada Kasemsup, Hathaichanok Pakcharein. Report of the food consumption survey of Thai people. BKK, Thailand: Thai Health Survey Office; 2011. (In Thai)

[7] Hutkins RW, Nannen NL. pH homeostasis in lactic acid bacteria. Journal of Dairy Science 1993;76: 2354-65.

[8] Konings WN, Lolkema JS, Bolhuis H, Van Veen HW, Poolman B, Driessen AJM. The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 1997;71:117-28.

[9] Nannen NL, Hutkins RW. Proton-translocating adenosine triphosphatase activity in lactic acid bacterial. Journal of Dairy Science 1991;74(3):747-51.

[10] Senior AE, Wise JG. The proton-ATPase of bacteria and mitochondria. The Journal of Membrane Biology 1983;73:105-24.

[11] Hong SI, Kim YJ, Pyum YR. Acid tolerance of Lactobacillus plantarum from Kimchi. Lebensm.-Wiss. u.-Technol 1998;32:142-8.

[12] Bender GR, Marquis RE. Membrane ATPases and Acid Tolerance of Actinomyces viscous and Lactobacillus casei. Applied and Environmental Microbiology 1987;53(9):2124-8.

[13] Cotter PD, Gahan CGM, Hill C. A glutamate decarboxylase system protects Listeria monocytogenes in gastric fluid. Molecular Microbiology 2001;40(2):465-75.

[14] Huang J, Mei L, Sheng Q, Shanjing Y, Lin D. Purification and characterization of glutamate decarboxylase of Lactobacillus brevis CGMCC 1306 isolated from fresh milk. Chinese Journal of Chemical Engineering 2007;15(2):157-61.

[15] Rollan G, Lorca GL, De Valdez F. Arginine catabolism and acid tolerance response in Lactobacillus reuteri isolated from sourdough. Food Microbiology 2003;20:313-9.

[16] De Angelis M, Mariotti L, Rossi J, Servili M, Fox PF, Rollán G, Gobbetti M. Arginine catabolism by sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of the arginine deiminase pathway enzymes from Lactobacillus sanfranciscensis CB1. Applied and Environmental Microbiology 2002;68(12):6193-201.

[17] Wouters JA, Frenkiel H, De Vos WM, Kuipers OP, Abee T. Cold shock proteins of Lactobacillus lactis MG1363 are involved in cryoprotection and in the production of cold-induced proteins. Applied and Environmental Microbiology 2001;67:5171-8.

[18] Grogan DW, Cronan JE. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews 1997;61:429-41.

[19] Flahaut S, Tierny Y, Watier D, Hornez JP, Jeanfils J. Impact of thermal variations on biochemical and physiological traits in Pectinatus sp. International Journal of Food Microbiology 2000;55:53-61.

[20] Shabala L, Roos T. Cyclopropane fatty acids improve Escherichia coli survival in acidified minimal media by reducing membrane permeability to H+ and enhanced ability to extrude H+. Research in Microbiology 2008;159:458-61.

[21] Zavaglia GA, Disalvo AE, De Antoni LG. Fatty acid composition and freeze-thaw resistance in Lactobacilli. Journal of Dairy Research 2000;67:241-7.

[22] Rowbury RJ, Goodson M. An extracellular acid stress-sensing protein needed for acid tolerance induction in Escherichia coli. FEMS Microbiology Letters 1999;174:49-55.

[23] De Angelis M, Gobbetti M. Environmental stress responses in Lactobacillus: a review. Proteomics 2004;4:106-22.

[24] Koponen J, Laakso K, Koskenniemi K, Kankainen M, Savijoki K, Nyman TA, et al. Effect of acid stress on protein expression and phosphorylation in Lactobacillus rhamnosus GG. Journal of Proteomics 2012;75:1357-74.

[25] Wu C, Zhang J, Wang M, Du G, Chen J. Lactobacillus casei combats acid stress by maintaining cell membrane functionality. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 2012;39:1030-9.

[26] Zhang J, Wu C, Du G, Chen J. Enhanced acid tolerance in Lactobacillus casei adaptive evolution and compared stress response during acid stress. Biotechnology and Bioprocess Engineering 2012;17:283-9.

[27] Schoug A, Fischer J, Hermann JH, Schnürer J, Håkansson S. Impact of fermentation pH and Temperature on freeze-drying survival and membrane lipid composition of Lactobacillus coryniformis Si3. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 2008;35:175-81.

[28] Broadbent JR, Larsen RL, Deibel V, Steele JL. Physiological and transcriptional response of Lactobacillus casei ATCC3 3 4 to acid stress. Journal of Bacteriology 2010;192(9):2445-58.

[29] Wallenius J, Unksulainen T, Salonen K, Rautio J, Eerikäinen T. The effect of temperature and pH gradients on Lactobacillus rhamnosus gene expression of stress related genes. Bioprocess and Biosystems Engineering 2011;34:1169-76.

[30] Gurezoni ME, Lanciotti R, Cocconcelli PS. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in Lactobacillus helveticus. Microbiology 2001;147: 2255-64.

[31] Montanari C, Sado KSL, Serrazanetti DI, Etoa FX, Guerzoni ME. Synthesis of cyclopropane fatty acid in Lactobacillus helveticus and Lactobacillus sanfranciscensis and their cellular fatty acids changes following short term acid and cold stresses. Food Microbiology 2010;27:493-502.

[32] Drinan DF, Robin S, Cogan, TM. Citric acid metabolism in hetero-and homofermetative acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology 1976;31(4):481-6.

[33] Davis CR, Wibowo DJ, Lee TH, Fleet GH. Growth and metabolic of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. Applied and Environmental Microbiology 1986;51(3):539-45

[34] Holzapfel WH, Schillinger U. Introduction to prebiotic and probiotics. Food Research International 2002; 35:109-16.

[35] McDonald LC, Fleming HP, Hassan HM. Acid tolerance of Leuconostoc mesenteroides and Lactobacillus plantarum. Applied and Environmental Microbiology 1990:56(7):2120-4.

[36] Foster JW. When proton attack: microbial strategies of acid adaptation. Current Opinion in Microbiology 1999;2:170-4.

[37] Lambert RJ, Stratford M. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. Journal of Applied Microbiology 1999;86:157-64.

[38] Arvizu-medrano SM, Escartín, EF. Effect of acid shock with hydrochloric, citric, and lactic acids on the survival and growth of Salmonella Typhi and Salmonella Typhinurium in acidified media. Journal of Food Protection 2005;68(10): 2047-53.

[39] Diakogiannis I, Berberi A, Siapi E, Arkoudi-Vafea A, Giannopoulou L, Mastromicolis SK. Growth and membrane fluidity of food-borne pathogen Listeria monocytogenes in the presence of weak acid preservatives and hydrochloric acid. Frontiers in Microbiology 2013;4:1-6.

[40] Paramaporn Kerdsup. Acid Stress Responses of Probiotic Lactobacillus. Srinakarinwirot University (Journal of Science and Tecnology) 2016;8(16):70-86 (In Thai)

[41] Srisukchayakul P, Charalampopoulos D, Karatzas KA. Study on the effect of citric acid adaptation toward the subsequent survival of Lactobacillus plantarum NCIMB 8826 in low pH fruit juices during refrigerated storage. Food Research International 2018;111:98-204.

[42] Saarela M, Rantala M, Hallamaa K, Nohynek L, Virdajärvi I, Mättö J. Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. Journal of Applied Microbiology 2004;96:1205-14.

[43] Pieterse B, Leer RJ, Schuren FHJ, Mariët J, Van Der Werf J. Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on Lactobacillus plantarum by transcription profiling. Microbiology 2005;151:3881-94.

[44] Chen MJ, Tang HY, Chiang ML. Effect of heat, cold, acid and bile salt adaptations on stress tolerance and protein expression of kefir-isolated probiotic Lactobacillus kefiranofacien M1. Food Microbiology 2017;66:20-7.

[45] Fernandez A, Ogawa J, Penaud S, Boudebbouze S, Ehrlich D, Van De Guchte M, et al. Rerouting of pyruvate metabolism during acid adaptation in Lactobacillus bulgaricus. Proteomics 2008;8:3154-63.

[46] Huang R, Pan M, Wan C, Shah NP, Tao X, Wei H. Physiological and transcriptional responses and cross protection of Lactobacillus plantarum ZDY2013 under acid stress. Journal of Dairy Science 2016;99:1002-10.

ประวัติผู้เขียนบทความ

ปรมาภรณ์ เกิดทรัพย์ หัวหน้าสาขาเทคโนโลยีชีวภาพและผลิตภัณฑ์การเกษตร คณะเทคโนโลยีและนวัตกรรมผลิตภัณฑ์การเกษตร มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ E-mail paramapornk@g.swu.ac.th สนใจงานวิจัยด้านการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร และการพัฒนาบรรจุภัณฑ์ที่ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร

วรากร เกิดทรัพย์ หัวหน้าหมวดคณิตศาสตร์และวิทยาศาสตร์สำหรับวิศวกรรม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษมบัณฑิต E-mail warakorn.ker@kbu.ac.th สนใจงานวิจัยด้านการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร