การเปลี่ยนแปลงทางเคมีในสารละลายเตรียมเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการรอดชีวิตของโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* ในผลิตภัณฑ์น้ำทับทิมทางการค้า

CHEMICAL CHANGES IN CELL ADAPTED SOLUTIONS RELATED TO SURVIVAL OF PROBIOTIC STRAIN LACTOBACILLUS PLANTARUM IN COMMERCIAL POMEGRANATE JUICE

วรากร เกิดทรัพย์[1] และ ปรมาภรณ์ เกิดทรัพย์[2]

[1]คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษมบัณฑิต 1761 ถ.พัฒนาการ สวนหลวง กรุงเทพฯ 10250

[2]คณะเทคโนโลยีและนวัตกรรมผลิตภัณฑ์การเกษตร มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ 63 หมู่ 7 ต.องครักษ์ อ.องครักษ์ จ.นครนายก 26120

Warakorn Kerdsup[1] and Paramaporn Kerdsup[2]

[1]Faculty of Engineering, Kasem Bundit University 1761 Pattanakarn Rd. Suanluang, Bangkok 10250, Thailand

[2]Faculty of Agricultural Product Innovation and Technology, Srinakharinwirot University 63 Moo 7 Ongkharak, Nakhonnayok 26120, Thailand

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของสารละลาย minimal medium (MM) และสารละลาย MM ที่เติมสารสกัดชาเขียว (GTMM) ที่ใช้เตรียมเซลล์โพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* ก่อนนำจุลินทรีย์ดังกล่าวเติมลงในน้ำทับทิม โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ในน้ำทับทิมที่มีความเป็นกรดและมีสารประกอบฟีนอลิคซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์อยู่ในปริมาณสูง และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีในสารละลายที่ใช้เตรียมเซลล์และในน้ำทับทิม เพื่ออธิบายปรากฏการณ์ที่พบ จากการทดลองเติม *L plantarum* ลงในน้ำทับทิม และเก็บรักษาในสภาวะ 4 ºC เป็นเวลา 14 วัน พบว่าแบคทีเรียรอดชีวิตในน้ำทับทิมได้สูงสุดเมื่อเตรียมเซลล์ 3 ชั่วโมง ด้วยสารละลาย MM ที่ pH 3.5 โดยพบเซลล์รอดชีวิตสูงกว่า 6 logCFU/ml เป็นเวลา 3 วัน จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่เปลี่ยนแปลงไปในสารละลายที่ใช้เตรียมเซลล์พบว่า เมื่อเตรียมเซลล์ใน GTMM เซลล์จะชะลอการใช้กลูโคสลงถึง 10 เท่าเปรียบเทียบกับการเตรียมด้วย MM และในสภาวะที่เป็นกรดแบคทีเรียจะมีการใช้กลูโคสในปริมาณที่สูงขึ้นด้วย

จากการตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิคในน้ำทับทิมพบว่า *L. plantarum* ที่ผ่านการเตรียมเซลล์ด้วย GTMM จะใช้สารคาเทชินและพีคูมาลิคในน้ำทับทิมได้ดีขึ้น ซึ่งเป็นการลดปริมาณสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพลง งานวิจัยนี้จึงเป็นงานแรกที่มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบโพลีฟีนอลในน้ำทับทิมเสริมโพรไบโอติกที่ผ่านการเตรียมเซลล์ด้วยสภาวะเครียดรูปแบบต่างๆ และค้นพบว่าการเตรียมเซลล์ด้วยสารละลายที่มีคาเทชินและพีคูมาลิคเป็นองค์ประกอบไม่ทำให้การรอดชีวิตสูงขึ้น แต่ทำให้แบคทีเรียใช้สารโพลีฟีนอลทั้งสองนี้ในผลิตภัณฑ์น้ำทับทิมได้เร็วขึ้น
คำสำคัญ: น้ำทับทิม, โพลีฟีนอล, โพรไบโอติก

ABSTRACT

This research was studied the change of chemical composition of minimal medium (MM) and MM supplemented with green tea extract (GTMM) which were used to adapted the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* before they were added to pomegranate juice. The aim was to enhance viability of the microorganism in pomegranate juice which consisted of high acid and polyphenol compounds. Determination the change of chemical compositions in the adapted solutions and in the probiotic supplemented pomegranate juice could be used to explain the survival of the cells. In the experiment, the treated cells were added into pomegranate juice and stored at 4 ºC for 14 days. The results showed the highest survival cell number when the cells were treated with MM at pH 3.5 and the viable cells remained above 6 logCFU/ml for 3 days. The study of the change of chemical composition in the adapted solution indicated that using GTMM as adapted solution reduced glucose consumption of the cell at 10 times compared to MM adapted cells and the cells consumed higher amount of glucose when they were adapted in acid conditions. Evaluation of polyphenol compounds in pomegranate juice reviewed the higher consumption of catechin and p-coumalic by GTMM adapted *L. plantarum* compared to the MM adapted cells and this reduced the amount of healthy substances. This research became the first study of the change of polyphenol compounds in pomegranate juice supplemented with probiotic cells which were adapted by different stress conditions. It was found that preparation of the cells by the solution that composed with green tea extract did not increase cell viability in pomegranate juice but increased rate of consumption of some polyphenol compounds in the juice.
KEYWORDS: pomegranate juice, polyphenol, probiotic

1. บทนำ

สารประกอบฟีนอลิกจากพืชส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบที่ดี จึงนำสารประกอบดังกล่าวมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเป็นจำนวนมาก โดยมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการบริโภคสารประกอบฟีนอลกับสุขภาพออกมาอย่างต่อเนื่อง มีการประมาณการไว้ว่าร่างกายมนุษย์ควรได้รับสารประกอบฟีนอลิกจากพืชประมาณ 150-1000 mg ต่อวัน ซึ่งจากปริมาณการรับประทานผักและผลไม้ในชีวิตประจำวันจะทำให้ได้รับสารประกอบโพลีฟีนอลอยู่ที่ระดับร้อยละ 28 ของปริมาณที่ควรได้รับต่อวัน [1] เชื่อว่ามีความเป็นไปได้ที่สารประกอบโพลีฟีนอลที่พบในผลไม้และผักบางชนิดจะเป็นตัวแปรสำคัญที่มีผลลดความเสี่ยงในการพัฒนาเซลล์มะเร็ง มีการศึกษาพบว่าผักและผลไม้ที่มีสารโพลีฟีนอลสูงมีผลช่วยป้องกันการพัฒนาเซลล์มะเร็งในลำไส้ใหญ่ได้ [2] กลไกของสารประกอบโพลีฟีนอลในการช่วยต้านเซลล์มะเร็งมีอยู่หลายกลไก ได้แก่ ช่วยกำจัดสารก่อมะเร็ง ปรับการส่งสัญญาณการสร้างเซลล์มะเร็งในระหว่างการแบ่งเซลล์ให้ปกติ กระตุ้นกระบวนการสลายตัวของเซลล์มะเร็ง และปรับการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ให้เป็นปกติ เช่น การกระตุ้นและปรับการทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase, catalase หรือ cytochrome P450 โดยสารโพลีฟีนอลซึ่งช่วยลดความเป็นพิษของสารก่อมะเร็งได้ [3] กลไกของสารประกอบโพลีฟีนอลต่อสุขภาพเกี่ยวข้องกับความสามารถในการปรับระดับและการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลง signal pathway ที่กระตุ้นกระบวนการสร้างเลือดใหม่ให้อยู่ในระดับปกติ เนื่องจากหากอยู่ในระดับที่สูงเกินไปจะเป็นสาเหตุให้เกิดโรคหลอดเลือดอุดตัน และความดันโลหิตสูงได้ [4] นอกจากนี้ยังพบว่าการดื่มน้ำผักและผลไม้ที่มีความเข้มข้นของสารโพลีฟีนอลสูงอย่างน้อย 3 ครั้งต่อสัปดาห์ สามารถชะลอสภาวะเริ่มต้นของของการเกิดอัลไซเมอร์ได้อย่างมีนัยสำคัญ จึงเป็นที่สรุปได้ว่าสารประกอบโพลีฟีนอลจากพืชน่าจะเป็นสารที่มีศักยภาพในการปรับสภาวะระดับเซลล์และการส่งสัญญาณรวมถึงปรับสมดุลของสภาวะเครียดจากออกซิเดชันภายในเซลล์สมองได้เป็นอย่างดี [5]

เป็นที่ทราบกันดีว่าปฏิกิริยาย่อยสลายสารโพลีฟีนอลที่มนุษย์รับประทานเข้าไปส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่บริเวณลำไส้ใหญ่ กระบวนการเหล่านี้ทำให้เกิดสารเมตาบอไลท์ที่สามารถถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ง่ายขึ้น จากการศึกษาพบว่าการดูดซึมสารโพลีฟีนอลในลำไส้เล็กมีประสิทธิภาพต่ำเนื่องจากสารโพลีฟีนอลส่วนใหญ่เชื่อมต่ออยู่กับโมเลกุลของน้ำตาลซึ่งส่วนมากจะเป็นน้ำตาลกลูโคสหรือแรมโนส (rhamnose) ปฏิกิริยาย่อยสลายสารโพลีฟีนอลในขั้นแรกจึงเกี่ยวข้องกับการตัดโมเลกุลของน้ำตาลออกไป โดยใช้เอนไซม์ glycosidases และ esterases ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ยังช่วยทำให้เกิดการแตกตัวของสารประกอบโพลีฟีนอลออกจากน้ำดีซึ่งมักจะเกิดการรวมตัวกันเมื่อสารโพลีฟีนอลเคลื่อนผ่านลำไส้เล็ก เป็นผลให้การดูดซึมสารโพลีฟีนอลเป็นไปได้ง่ายขึ้น สำหรับหมู่ sulfate ที่เชื่อมอยู่กับ phenolic hydroxyl group ก็สามารถถูกสลายได้โดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์เช่นกัน ด้วยเหตุนี้จุลินทรีย์ต่างๆ

จึงเข้ามามีส่วนเกี่ยวข้องในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบโพลีฟีนอล ทำให้เกิดสารประกอบที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่ดีต่อสุขภาพที่หลากหลายขึ้น [6]

ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการเสริมจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้หรือโพรไบโอติก (probiotic) มีโพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ที่พบได้ทั่วไปในลำไส้ของมนุษย์มีความสามารถในการลดปัญหาระบบทางเดินอาหารและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ โดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะผลิตสารในกลุ่ม short chain fatty acid ออกมาช่วยกระตุ้นการเคลื่อนตัวของลำไส้ ทำให้ลดอาการท้องอืดและท้องผูก [7] ในประเทศไทยนั้นศักยภาพในการผลิตอาหารที่มีโพรไบโอติกจากวัตถุดิบที่เป็นของเหลวมีพร้อมแล้วคือการผลิตโยเกิร์ตในระดับอุตสาหกรรม อย่างไรก็ดีความหลากหลายของผลิตภัณฑ์อาหารที่มีโพรไบโอติกเป็นส่วนประกอบในประเทศไทยยังมีอยู่น้อยและเกือบทั้งหมดผลิตมาจากนมทำให้มีผู้บริโภคอีกหลายกลุ่มที่ไม่สามารถรับประทานผลิตภัณฑ์อาหารดังกล่าวได้ เช่น ผู้บริโภคที่รับประทานเจ หรือผู้ที่แพ้โปรตีนในนม ผลไม้และผลิตภัณฑ์จากผลไม้เช่น น้ำผลไม้จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจากเป็นอาหารที่เหมาะกับคนทุกวัย รวมถึงผู้ที่แพ้โปรตีนในนมและผู้ที่รับประทานมังสวิรัติ อย่างไรก็ดียังมีข้อจำกัดในการใช้น้ำผลไม้เป็นตัวพาจุลินทรีย์โพรไบโอติก เนื่องจากสารประกอบหลายชนิดที่มีอยู่ในผลไม้ตามธรรมชาติมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ ได้แก่ กรดอินทรีย์ และสารประกอบโพลีฟีนอล จึงมีการวิจัยศึกษาเกี่ยวกับวิธีการต่างๆ ที่จะทำให้จุลินทรีย์โพรไบโอติกสามารถทนต่อสภาวะในระบบน้ำผลไม้ได้นานขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคได้อย่างเต็มที่ งานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาการเตรียมโพรไบโอติกในสภาวะกรดที่มีสารประกอบฟีนอลิกร่วมด้วยต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในสภาวะน้ำทับทิม ซึ่งเป็นผลไม้ที่กำลังได้รับความนิยมในด้านการมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง เนื่องจากมีสารประกอบโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง โดยเน้นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการปรับตัวของโพรไบโอติกในสภาวะกรดและการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิกในน้ำทับทิมที่เสริมโพรไบโอติก ผลการทดลองที่ได้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อการต่อยอดงานวิจัยไปสู่การศึกษากลไกทางชีวเคมีและกลไกระดับยีนที่ทำให้จุลินทรีย์อยู่รอด และใช้ในการต่อยอดการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ไม่มีนมเป็นส่วนประกอบ เป็นการเพิ่มความหลากหลายของผลิตภัณฑ์และเพิ่มทางเลือกให้แก่ผู้ที่สนใจผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการเสริมจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ

2. วิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์โพรไบโอติกและสภาวะการเพาะเลี้ยง

ผู้วิจัยเลือกใช้เชื้อจุลินทรีย์ในตระกูล Lactobacilli 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* ที่ได้รับการรับรองว่ามีความสามารถเป็นโพรไบโอติก อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยง

เชื้อสำหรับสายพันธุ์ Lactobacilli [8] เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตลอดการทดลอง น้ำผลไม้ที่ใช้ในการทดลองเป็นน้ำผลไม้ที่มีสีออกม่วงและแดงที่มีสารในกลุ่มโพลีฟีนอลที่ค่อนข้างสูง ได้แก่ น้ำทับทิม โดยใช้น้ำผลไม้ทางการค้า

2.2 การเตรียมหัวเชื้อด้วยกรด

เลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth โดยใช้เชื้อ 1 loop ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเขย่าเบาๆ ตลอดเวลา ทำการวัดค่าความขุ่นของเชื้อที่ ความยาวคลื่น 600 nm และปรับค่าให้ได้ 1.0 ± 0.1 แล้วจึงถ่ายเซลล์ปริมาตร 10 mL ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ปริมาตร 100 mL และบ่มที่ 37 ºC เป็นเวลา 16 ชั่วโมงเพื่อให้ได้เซลล์จุลินทรีย์ในช่วง late exponential phase จากนั้นเก็บเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และล้างเซลล์ด้วย 200 mM PBS buffer (pH 7.5) 2 ครั้ง จุลินทรีย์ที่ผ่านการล้างจะนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

สารละลาย minimal medium (MM) ประกอบด้วย กลูโคส 20 g/L, Tween80 1 g/L, Magnesium sulphate 0.2 g/L, Manganese sulphate 0.04 g/L และ di-potassium phosphate 2.0 g/L สารละลาย MM ที่เตรียมได้จะมี pH ประมาณ 7.0 ± 0.1 และการเตรียมสารละลาย MM pH 3.5 ทำโดยเติมกรดซิตริกจนได้ค่า pH ที่ต้องการ จากนั้นทำการเติมสารสกัดชาเขียว (GT) ลงในสารละลาย MM ที่ได้ในอัตราส่วน MM : GT เท่ากับ 75 : 25

สารสกัดชาเขียวทำโดยนำใบชาเขียวบดละเอียดทางการค้าที่มีขายในประเทศไทย มาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที โดยกวนตลอดเวลาที่ 200 รอบต่อนาที จากนั้นนำไปทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง และกรองเอากากชาเขียวออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 สารสกัดชาเขียวที่ได้นำไปใช้เป็นส่วนผสมในสารละลายสำหรับการเตรียมเซลล์โพรไบโอติก

การเตรียมเซลล์โพรไบโอติกเพื่อให้ทนต่อสภาวะกรดได้ดีขึ้นทำโดย เติมเชื้อ *L. plantarum* ที่ผ่านการล้างลงในสารละลาย MM pH 7.0, MM pH 3.5, MM pH 7.0 ที่เติมสารสกัดชาเขียว 25% (GTMM pH 7.0) และ MM pH 3.5 ที่เติมสารสกัดชาเขียว 25% (GTMM pH 3.5) แล้วนำไปบ่มที่ 25 ºC เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจวัดปริมาณน้ำตาล กรดอินทรีย์ และสารประกอบฟีนอลิกที่เปลี่ยนแปลงไปในน้ำที่ใช้ในการเตรียมเซลล์

2.3 ผลของการเติมโพรไบโอติกต่อการเปลี่ยงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำทับทิม

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารในกลุ่มโพลีฟีนอลในน้ำทับทิมที่มีการเติมโพรไบโอติก ทำโดยเติมหัวเชื้อที่ผ่านการเตรียมด้วยสารละลายทั้ง 4 ชนิดลงในน้ำทับทิมทางการค้าในปริมาณ 10% แล้วนำไปเก็บรักษาที่ 4 ºC เป็นเวลา 14 วัน ทำการตรวจวัดการรอดชีวิตของเชื้อ *L.*

plantarum และตรวจวัดค่าการเปลี่ยนแปลงทางเคมีโดยตรวจวัดค่าต่างๆ ในน้ำผลไม้ ได้แก่ ค่า pH ปริมาณกรดซิตริก ปริมาณกรดแลกติก น้ำตาล และปริมาณสารโพลีฟีนอลที่พบมากในชาเขียวและชนิดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ gallic, chlorogenic, vanillic, ellagic, ferulic, catechin, epicatachin, p-coumaric และ caffeic โดยการทดลองแต่ละชุดทำซ้ำชุดละ 3 ครั้ง

2.3.1 การตรวจวัดการรอดชีวิตของ *L. plantarum*

ตรวจวัดการรอดชีวิตของเชื้อ *L. plantarum* โดยทำ serial dilution และ spread plating ลงบน MRS agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตจากโคโลนีเดี่ยวที่ขึ้นเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ และรายงานผลเป็น logCFU/mL

2.3.2 การตรวจสอบปริมาณน้ำตาลและกรดในน้ำทับทิม

การตรวจสอบปริมาณน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส ใช้วิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ดัดแปลงจากวิธีของ Nualkaekul และ Charalampopoulos [9] โดยใช้ column Carbo (Phenolmenex, USA) ปริมาตรตัวอย่าง 0.5 ไมโครลิตร ใช้สารตัวพาเป็นสารผสมระหว่างน้ำและอะซิโตไนไตรท (acetonitrile) เท่ากับ 25:75 อัตราการไหล 1.4 mL/min ใช้เวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 10 นาที สำหรับการตรวจวัดปริมาณกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดซิตริก และกรดแลคติก ทำโดยวิธี HPLC ใช้ ion exclusion column มีสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.0064 M เป็นตัวพา ตรวจวัดด้วย UV detector เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

2.3.3 การตรวจสอบสารประกอบโพลีฟีนอล

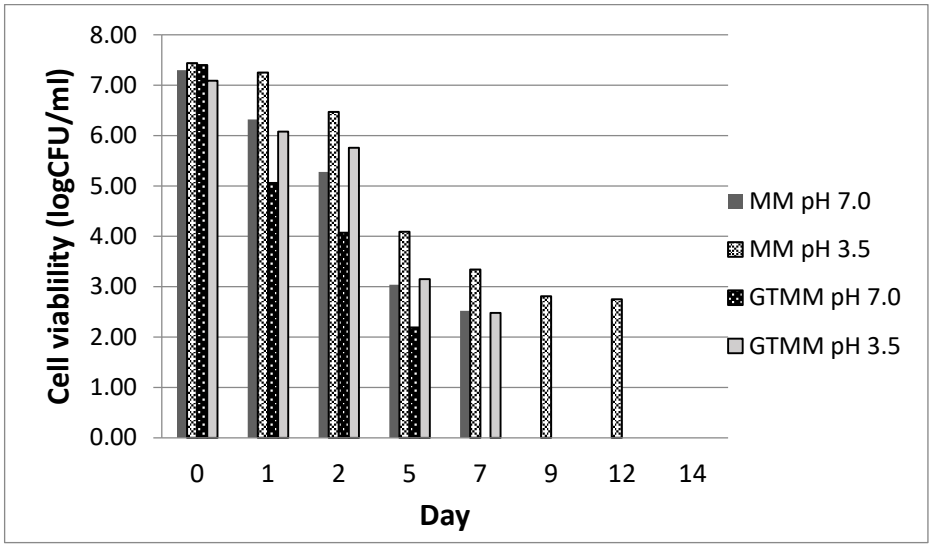
การตรวจสอบชนิดของสารโพลีฟีนอลในน้ำทับทิมเสริมโพรไบโอติกที่ผ่านการเตรียมด้วยสารละลายทั้ง 4 ชนิด ใช้วิธี HPLC ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Castro และคณะ [10] โดยใช้ column C18 สารละลายตัวพาใช้กรดฟอร์มิค 0.1% กับน้ำ เป็นสารละลาย A และอะซิโตไนไตร์ท (acetonitrite) เป็นสารละลาย B การชะทำโดยให้สารละลายตัวพามีอัตราเร็วคงที่ 0.5 mL/min ในการชะสารละลาย B จะเปลี่ยนอัตราส่วนจาก 0% ไปถึง 100% ในช่วง 60 นาที จากนั้นในช่วงของการล้าง สารละลาย B จะเปลี่ยนอัตราส่วนกลับไปเป็น 0% ภายในเวลา 2 นาที

3. ผลการทดลอง

3.1 การรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* ในน้ำทับทิม

เมื่อเติมจุลินทรีย์โพรไบโอติกสายพันธุ์ *L. plantarum* ที่ผ่านการเตรียมเซลล์ด้วยสารละลายที่มีและไม่มีสารสกัดชาเขียวเป็นส่วนประกอบ ลงในน้ำทับทิมทางการค้าที่มีความเป็นกรดและมี

สารประกอบโพลีฟีนอลเป็นส่วนประกอบในปริมาณสูงพบว่า โพรไบโอติกมีการรอดชีวิตได้แตกต่างกัน โดยโพรไบโอติกที่ผ่านการเตรียมด้วยสารละลาย MM pH 3.5 สามารถรอดชีวิตในน้ำทับทิมได้ดีที่สุด ตามด้วยโพรไบโอติกที่เตรียมด้วยสารละลาย GTMM pH 3.5, MM pH 7.0 และ GTMM pH 7.0 ตามลำดับ โดยเฉพาะช่วงแรกของการเก็บรักษาจะเห็นความแตกต่างของการรอดชีวิตค่อนข้างชัดเจน (รูปที่ 1) จนกระทั่งในวันที่ 14 เซลล์ของ *L. plantarum* ที่รอดชีวิตจะลดลงจนเข้าใกล้ 0 ทั้งนี้จะสังเกตเห็นได้ว่าการเตรียมจุลินทรีย์ในสภาวะที่เป็นกรดช่วยให้จุลินทรีย์รอดชีวิตได้ดีกว่าในสภาวะที่เป็นกลาง ส่วนการเติมสารสกัดชาเขียวที่มีสารประกอบโพลีฟีนอลจำพวกคาเทชินและอิพิคาเทชิน ไม่ช่วยให้โพรไบโอติก รอดชีวิตได้ดีขึ้นเมื่ออยู่ในน้ำทับทิม แม้จะพบสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งสองชนิดนี้อยู่มากในน้ำทับทิมด้วยก็ตาม



รูปที่ 1 การรอดชีวิตของ *L. plantarum* ที่ผ่านการเตรียมเซลล์ในสภาวะต่าง ๆ เมื่อเติมลงในน้ำทับทิมและเก็บรักษาที่ 4 ºC เป็นเวลา 14 วัน

3.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีในสารละลายที่ใช้เตรียมเซลล์

จากการทดลองเตรียมเซลล์จุลินทรีย์โพรไบโอติกสายพันธุ์ *L. plantarum* ในสภาวะกรดที่ pH 3.5 (ปรับสภาวะด้วยกรดซิตริก) และสภาวะเป็นกลางที่ pH 7.0 ทั้งที่มีและไม่มีการเติมสารสกัดชาเขียว พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลกลูโคสระหว่างการเตรียมเซลล์ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งพบการลดลงของน้ำตาลกลูโคสมากถึงประมาณ 34% ในสารละลาย minimal media (MM) ที่มีค่า pH 3.5 และ pH 7.0 หลังจากใช้เตรียมเซลล์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แต่ในสารละลาย MM ที่มีการเติมสารสกัดชาเขียว (GTMM) กลับพบการลดลงของปริมาณกลูโคสเพียงประมาณ 3% แสดงให้เห็นถึง

การชะลอการใช้กลูโคสของ *L. plantarum* ในสภาวะที่มีชาเขียวเป็นส่วนประกอบ ทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและเป็นกลาง ส่วนการศึกษาปริมาณกรดซิตริกที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างการเตรียมเซลล์ในสารละลาย MM และ GTMM (ตารางที่ 2) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดซิตริกหลังจากใช้สารละลายในการเตรียมเซลล์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง อย่างไรก็ดีพบการสร้างกรดแลคติกในสารละลายที่ใช้เตรียมเซลล์ โดยพบการสร้างกรดแลคติกสูงสุดในสารละลาย GTMM pH 7.0 ที่ปริมาณ 3.36 g/L ตามด้วยสารละลาย GTMM pH 3.5 และ MM pH 7.0 ที่ปริมาณ 1.50 และ 0.15 g/L ตามลำดับ ส่วนสารละลาย MM pH 3.5 ไม่พบการสร้างกรดแลคติกแต่อย่างใด (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ปริมาณกลูโคสที่เปลี่ยนแปลงในสารละลายระหว่างการเตรียมเซลล์

Treated solution	0 hour	3 hours	
	Glucose (g/L)	Glucose (g/L)	Remaining glucose (%)
MM media pH 7.0	15.40 ± 2.07	10.08 ± 2.19	65.45
MM media pH 3.5	19.79 ± 2.48	13.13 ± 2.52	66.35
GTMM media pH 7.0	12.62 ± 0.11	12.28 ± 0.41	97.31
GTMM media pH 3.5	11.92 ± 0.06	11.47 ± 0.54	96.22

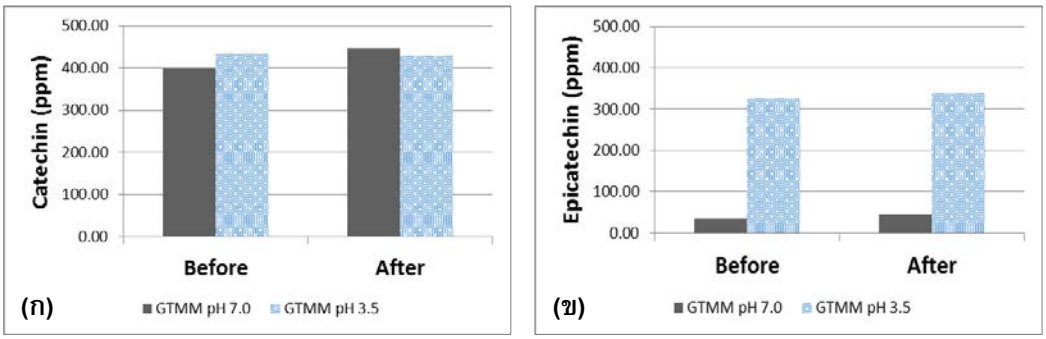
ตารางที่ 2 ปริมาณกรดซิตริกและกรดแลคติกที่เปลี่ยนแปลงในสารละลายระหว่างการเตรียมเซลล์

Treated solution	Citric acid (g/L)		Lactic acid (g/L)	
	0 hour	3 hours	0 hour	3 hours
MM media pH 7.0	ND	ND	0	0.15 ± 0.05
MM media pH 3.5	3.70 ± 0.26	3.39 ± 0.24	0	0
GTMM media pH 7.0	ND	ND	0	3.36 ± 0.21
GTMM media pH 3.5	3.43 ± 0.04	3.41 ± 0.18	0	1.50 ± 0.07

ND = not detected

ในสารละลายที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ใช้เป็นสูตร minimal medium (MM) เพื่อให้ส่วนประกอบไม่มีกรดอะมิโน เนื่องจากกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่มีผลอย่างมากต่อกระบวนการทนกรดของ Lactobacillus จุลินทรีย์ที่ผ่านการเตรียมในสารละลายที่เป็นกรดและมีกรดอะมิโนเป็น

ส่วนประกอบ เช่น MRS broth จะมีการใช้กรดอะมิโนไปเป็นจำนวนมากในการปรับตัว [11, 12] ดังนั้นการใช้ MM เพื่อศึกษาผลของการเตรียมเซลล์ด้วยสารประกอบโพลีฟีนอลในสารสกัดชาเขียว และสภาวะกรดโดยหลีกเลี่ยงผลของกรดอะมิโนต่อการปรับตัวของจุลินทรีย์ พบการเปลี่ยนแปลงสารประกอบโพลีฟีนอลบางตัวที่พบมากในสารละลาย MM ผสมสารสกัดชาเขียว (GTMM) ดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งทั้งคาเทชิน (catechin) และอิพิคาเทชิน (epicatechin) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณเมื่อใช้สารละลาย GTMM ที่ pH 7.0 และที่ pH 3.5 ในการเตรียมเซลล์ *L. plantarum* เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทั้งนี้พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณอิพิคาเทชินเพิ่มสูงขึ้นมากในสารละลาย GTMM pH 3.5 เมื่อเทียบกับ GTMM pH 7.0 และในส่วนของสารละลาย MM ที่ไม่มีการเติมสารสกัดชาเขียวตรวจไม่พบสารประกอบโพลีฟีนอลใดๆ



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอล Catechin (ก) และ Epicatechin (ข) ในสารละลายที่ใช้เตรียมเซลล์

3.3 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่พบในน้ำทับทิมเสริมโพรไบโอติกระหว่างการเก็บรักษา

เมื่อนำโพรไบโอติกสายพันธุ์ *L. plantarum* ที่ผ่านการเตรียมเซลล์ในสภาวะต่างๆ มาเติมลงในน้ำทับทิมทางการค้า ที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่ 3.4 และมีสารประกอบโพลีฟีนอลในปริมาณที่สูง พบว่าโพรไบโอติกที่ผ่านการเตรียมเซลล์ด้วยสภาวะที่เป็นกรด (pH 3.5) จะมีการใช้น้ำตาลในน้ำทับทิมได้มากกว่าเชื้อที่ผ่านการเตรียมด้วยสารละลายที่สภาวะเป็นกลาง (pH 7.0) โดยสารละลายที่มีสารสกัดชาเขียวเป็นส่วนประกอบใช้น้ำตาลในปริมาณที่มากกว่าสารละลายที่ไม่มีชาเขียวเป็นส่วนประกอบ (ตารางที่ 3 และ 4) ข้อมูลดังกล่าวขัดแย้งกับการใช้น้ำตาลของเซลล์ในสารละลายที่ใช้เตรียมเซลล์ (ตารางที่ 1) ในส่วนของปริมาณกรดซิตริกพบว่ามีการลดลงของปริมาณกรดซิตริกในน้ำทับทิมเสริมโพรไบโอติกในทุกสภาวะการเตรียมเชื้อ (ตารางที่ 5) อย่างไรก็ดีไม่พบการสร้างกรดแลคติกในทุกๆ สภาวะของน้ำทับทิมเสริมโพรไบโอติก

ตารางที่ 3 ปริมาณกลูโคสในน้ำทับทิมเสริมโพรไบโอติกที่ผ่านการเตรียมเซลล์ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4 ºC

Treatment for cell	0 day	7 day		14 day	
	Glucose (g/L)	Glucose (g/L)	Remaining glucose (%)	Glucose (g/L)	Remaining glucose (%)
MM media pH 7.0	77.71 ± 0.88	77.18 ± 3.91	99.32	76.13 ± 0.16	97.97
MM media pH 3.5	77.23 ± 0.98	73.69 ± 3.44	95.42	72.24 ± 0.15	93.54
GTMM media pH 7.0	78.06 ± 0.39	76.35 ± 0.66	97.81	72.57 ± 2.05	92.97
GTMM media pH 3.5	78.07 ± 0.56	76.21 ± 0.36	97.63	70.01 ± 0.08	89.69

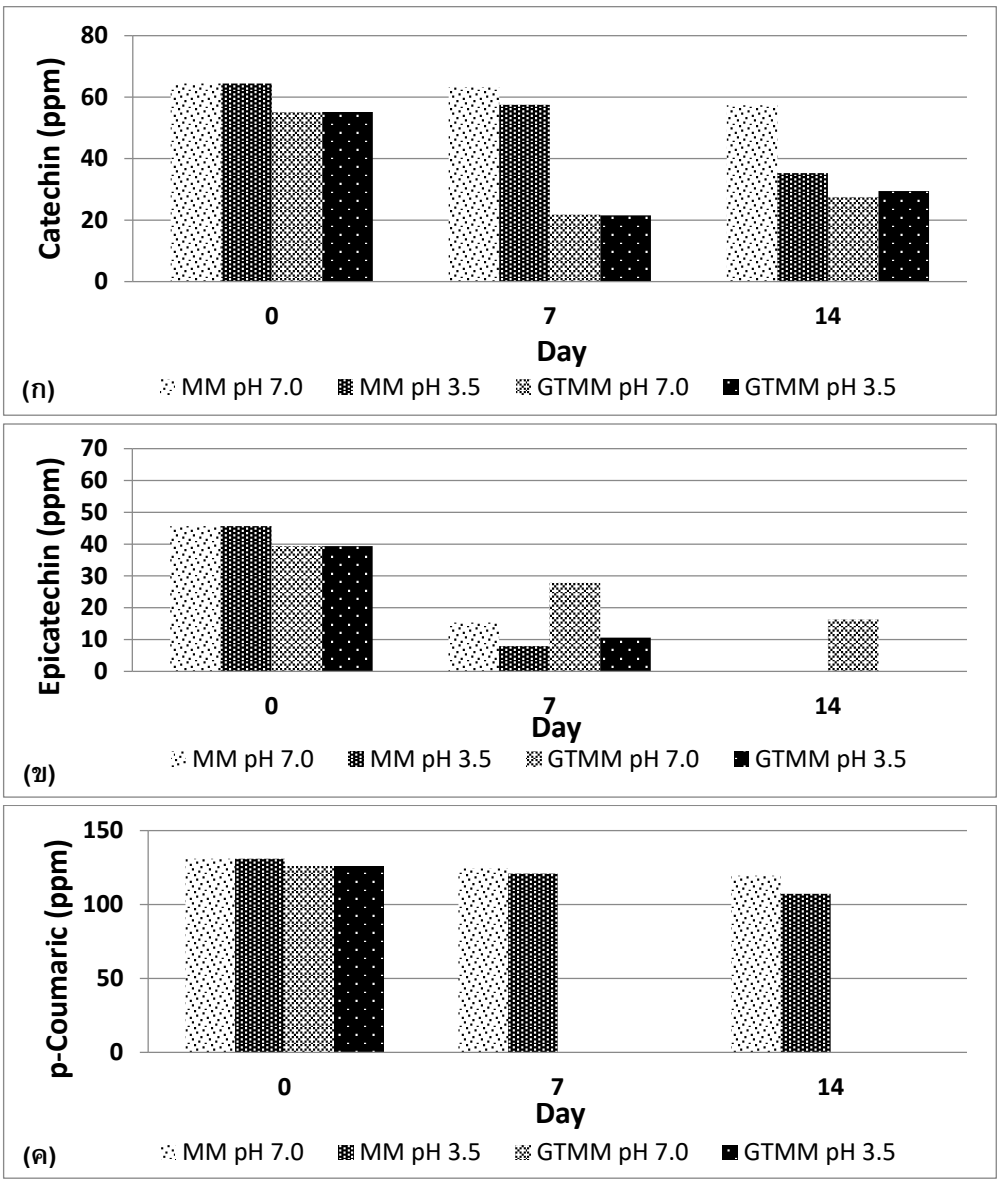
ตารางที่ 4 ปริมาณฟรุกโตสในน้ำทับทิมเสริมโพรไบโอติกที่ผ่านการเตรียมเซลล์ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4 ºC

Treatment for cell	0 day	7 day		14 day	
	Fructose (g/L)	Fructose (g/L)	Remaining fructose (%)	Fructose (g/L)	Remaining fructose (%)
MM media pH 7.0	77.71 ± 0.33	75.43 ± 2.52	97.07	71.97 ± 0.91	92.61
MM media pH 3.5	77.23 ± 0.45	70.39 ± 4.10	91.14	68.09 ± 0.46	88.17
GTMM media pH 7.0	70.38 ± 0.59	70.73 ± 1.42	100.50	70.95 ± 0.29	100.81
GTMM media pH 3.5	71.38 ± 0.33	71.4 ± 0.01	100.03	71.32 ± 0.27	99.92

ตารางที่ 5 ปริมาณกรดซิตริกในน้ำทับทิมเสริมโพรไบโอติกที่ผ่านการเตรียมเซลล์ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4 ºC

Treatment for cell	Citric acid (g/L)		
	0 day	7 day	14 day
MM media pH 7.0	7.39 ± 0.69	4.84 ± 0.26	4.63 ± 0.12
MM media pH 3.5	7.39 ± 0.69	4.86 ± 0.06	3.61 ± 0.30
GTMM media pH 7.0	7.36 ± 0.36	5.47 ± 0.10	4.49 ± 0.48
GTMM media pH 3.5	7.36 ± 0.36	4.99 ± 0.16	4.99 ± 1.01

สารประกอบโพลีฟีนอลที่พบมากในน้ำทับทิมมี 3 ชนิดได้แก่ คาเทชิน อิพิคาเทชิน และพีคูมาลิก (p-coumaric) จากการตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงพบว่า น้ำทับทิมที่เสริมด้วย *L. plantarum* ที่ผ่านการเตรียมด้วยสารละลายที่มีสารสกัดชาเขียวเป็นส่วนประกอบจะมีการลดลงของสารประกอบโพลีฟีนอลทั้ง 3 ชนิดมากกว่าโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารพีคูมาลิก พบการลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ 7 วันแรกของการเก็บรักษา (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารโพลีฟีนอลที่พบมากในน้ำทับทิมเสริมโพรไบโอติก **Catechin (ก) Epicatechin (ข) และ p-Coumaric (ค) ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4 ºC**

4. วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาผลของการเตรียมเซลล์ (cell adaptation) ด้วยสภาวะกรดเพื่อเพิ่มความสามารถในการทนกรดของจุลินทรีย์ในกลุ่มโพรไบโอติกสายพันธุ์ Lactobacillus มีมาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากโพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์เมื่อได้รับเข้าไปในปริมาณสูงเพียงพอ สำหรับประเทศไทยตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขเรื่องการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร [13] กำหนดให้ผลิตภัณฑ์ที่จะกล่าวอ้างว่าเป็นผลิตภัณฑ์เสริมโพรไบโอติก ได้จะต้องมีปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเหลืออยู่ไม่ต่ำกว่า 10^6 CFU ต่ออาหาร 1 กรัม ตลอดอายุการเก็บรักษาของอาหารนั้น เนื่องจากมีการพิสูจน์แล้วว่า โพรไบโอติกจะส่งผลดีต่อสุขภาพเมื่อยังมีชีวิตเท่านั้น [14] โพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารนอกจากจะต้องสามารถรอดชีวิตในสภาวะการเก็บรักษาแล้วจึงยังต้องรอดชีวิตในสภาวะกระเพาะอาหารเพื่อเข้าสู่ลำไส้ใหญ่ การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมโพรไบโอติกทำให้จุลินทรีย์ต้องพบกับสภาวะที่ไม่เหมาะสมที่หลากหลาย ได้แก่ ความเป็นกรด สารโพลีฟีนอลและสภาวะปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่ำ ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดอยู่ได้ไม่นาน การเตรียมเซลล์ด้วยสภาวะเครียดในระดับที่ไม่ทำให้เซลล์ตายหรือสภาวะที่ต่ำกว่า sublethal stress มักทำให้จุลินทรีย์สามารถปรับตัวและทนต่อสภาวะไม่เหมาะสมนั้นได้ดีขึ้น เช่น การเตรียมเซลล์ในสภาวะกรดในระดับที่ไม่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ จะทำให้จุลินทรีย์ปรับตัวและทนต่อสภาวะกรดในกระเพาะอาหารได้ดีขึ้น [15] อย่างไรก็ดีกลไกในการปรับตัวจำเป็นต้องมีกรดอะมิโนเข้ามาเกี่ยวข้อง เนื่องจากในสภาวะที่เป็นกรดยีนที่ควบคุมกระบวนการ glycolysis และการผลิต ATP ของ Lactobacillus จะถูกกระตุ้นให้ทำงานและสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งต้องใช้กรดอะมิโนเพื่อสังเคราะห์เอนไซม์ [16] การใช้สภาวะที่เป็นกรดและไม่มีกรดอะมิโนอยู่ในระบบจะเป็นการศึกษาความเป็นไปได้ในการปรับตัวของจุลินทรีย์ในรูปแบบอื่น เพื่อหาความเป็นไปได้ในการปรับให้จุลินทรีย์สามารถรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรดและมีกรดอะมิโนต่ำเช่นในน้ำผลไม้ได้

ในงานวิจัยนี้ศึกษาการเตรียมเซลล์ *L. plantarum* ในสารละลาย minimum medium (MM) ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว เปรียบเทียบกับสารละลาย MM เสริมสารสกัดชาเขียว (GTMM) พบว่าแบคทีเรียจะรอดชีวิตในน้ำทับทิมได้ดีที่สุดเมื่อผ่านการเตรียมเซลล์ด้วยสารละลาย MM ที่ pH 3.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตามด้วยสารละลาย GTMM pH 3.5, MM pH 7.0 และ GTMM pH 7.0 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าค่าความ pH ในสารละลายที่ใช้เตรียมเซลล์มีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่าสารประกอบฟีนอลิคจากชาเขียว ซึ่งสารประกอบฟีนอลิคที่พบมากในชาเขียวได้แก่ คาเทชิน (catechin), อิพิคาเทชิน (epicatechin) และอิพิคาเทชินแกลเลท (epicatechin gallate)

จากการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในสารละลายที่ใช้เตรียมเซลล์พบว่า เมื่อใช้สารละลาย MM pH 3.5 และ MM pH 7.0 เตรียมเซลล์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จุลินทรีย์มีการใช้กลูโคสสูงกว่าในสารละลาย GTMM pH 3.5 และ GTMM pH 7.0 ถึงประมาณ 10 เท่า แสดงให้เห็นถึงการ

ชะลอการใช้น้ำตาลเมื่อมีสารสกัดชาเขียวในระบบ ทั้งที่เมื่อเซลล์จุลินทรีย์แลคติกอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดและควรมีการเร่งการใช้น้ำตาล [16] ผลการทดลองครั้งนี้ขัดแย้งกับการศึกษาของ Alberto และคณะ [17] ที่พบว่า กรดแกลลิค (gallic acid) และคาเทชินในปริมาณเทียบเท่ากับที่พบในไวน์สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตและการใช้กลูโคสของ *Lactobacillu hilgardii* 5w ได้ดี อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Alberto และคณะ [17] ทำการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MRS broth ที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสูง แต่ในการวิจัยนี้ได้ใช้ minimal medium ซึ่งไม่มีแหล่งไนโตรเจนจากธรรมชาติเป็นองค์ประกอบ และปริมาณคาเทชินที่พบในไวน์มีปริมาณแตกต่างจากที่พบในชาเขียว จึงทำให้สภาวะในการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมาก

ความสามารถในการใช้กลูโคสที่ลดลงบ่งบอกถึงความสามารถในการทนกรดที่ลดลงด้วย เนื่องจากกลไกหนึ่งในการต่อต้านสภาวะที่เป็นกรดของจุลินทรีย์สายพันธุ์ Lactobacillus คือการใช้เอนไซม์ H^+-ATPase ขับโปรตรอน (H^+) ออกจากไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ซึ่งต้องใช้พลังงานจาก ATP ในการขับเคลื่อน [18] เมื่อจุลินทรีย์สามารถใช้น้ำตาลได้น้อยลงปริมาณ ATP สะสมที่ผลิตได้จึงน้อยลง และทำให้ความสามารถในการทนสภาวะกรดต่ำลงด้วย นอกจานี้สารสกัดชาเขียวอาจมีส่วนทำให้กลไกการปรับตัวในภาวะกรดของ *L. plantarum* แตกต่างไปจากเดิม โดยเมื่อพิจารณาจากรายงานของ Gaudreau และคณะ [19] ความสามารถของ *Lactobacillus helveticus* R0052 ในการต้านสภาวะ oxidative stress ลดลงเมื่อเติมสารสกัดชาเขียวลงในระบบ โดยพบการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการต้านทานต่อ oxidative stress ช้าลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเติมคาเทชินบริสุทธิ์ลงในระบบกลับไม่พบผลการเปลี่ยนแปลงในลักษณะดังกล่าว จึงสรุปได้ว่าองค์ประกอบบางชนิดในสารสกัดชาเขียวทำให้เกิดการชะลอการปรับตัวในสภาวะ oxidative stress ของ *L. helveticus* R0052 แต่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นกลไกแบบใด

สำหรับการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบโพลีฟีนอลในสารละลายที่ใช้เตรียมเซลล์ จากการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยไม่พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณคาเทชิน ในสารละลาย MM และ GTMM เมื่อใช้เตรียมเซลล์ L. plantarum เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แต่พบการเพิ่มขึ้นของอิพิคาเทชิน อย่างมากในสารละลาย GTMM ที่ปรับ pH เป็น 3.5 เทียบกับสารละลาย GTMM ที่ pH 7.0 เนื่องจากความเป็นกรดในสารละลายสามารถตัดพันธะระหว่างอิพิคาเทชินกับน้ำตาล ซึ่งการเชื่อมต่อกับน้ำตาลนี้เป็นลักษณะโมเลกุลปกติของอิพิคาเทชินในน้ำผลไม้โดยทั่วไป การตัดพันธะด้วยกรดดังกล่าวทำให้โมเลกุลของอิพิคาเทชินมีลักษณะใกล้เคียงกับสารมาตรฐานที่ใช้ทั่วไปในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ทำให้ตรวจพบอิพิคาเทชินมากขึ้นในสภาวะที่เป็นกรด [20]

จากการศึกษาการรอดชีวิตของ *L. plantarum* ในน้ำทับทิม พบว่า ปริมาณกรดในสารละลายที่ใช้เตรียมเซลล์มีอิทธิพลต่อการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่าสารสกัดชาเขียว แม้ว่าในสารสกัดชาเขียวจะมีกรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบและกรดอะมิโนมีส่วนสำคัญที่ช่วยส่งเสริมการทนสภาวะกรด

ของโพรไบโอติก [21] นอกจากนี้การเติมสารสกัดชาเขียวลงในสารละลายที่ใช้เตรียมเซลล์ยังทำให้การปรับตัวของเซลล์เพื่อทนสภาวะในน้ำทับทิมลดลงอย่างมาก ซึ่งมีงานวิจัยที่ได้ทดสอบสมบัติของชาเขียวหรือสารประกอบในชาเขียว เพื่อช่วยกระตุ้นให้แบคทีเรียทนต่อสภาวะเครียดได้ดีขึ้น เช่นในปี 2010 Khalil [22] ได้อธิบายผลของการเตรียมเซลล์ *Streptococcus thermophilus* ต่อความสามารถในการทนกรดที่ระดับ pH ต่างๆ ไว้ว่า เซลล์ที่ผ่านการเตรียมด้วย MRS broth ผสมสารคาเทชินจะมีความสามารถในการทนกรดลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ผ่านการเตรียม ในทุกค่า pH ที่ทดสอบ เนื่องจากในสภาวะที่เป็นกรดแบคทีเรียแกรมบวกจะถูกกระตุ้นให้สร้าง H_2O_2 ออกมาได้มากกว่าสภาวะที่เป็นด่างซึ่งโมเลกุลของ H_2O_2 จะทำให้สมบัติความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของคาเทชินลดลง ลักษณะโมเลกุลคาเทชินที่เปลี่ยนไปนี้อาจส่งผลกระตุ้นเซลล์แบคทีเรียให้ไวต่อสภาวะกรดมากขึ้น สำหรับการทดลองในน้ำทับทิมเสริมโพรไบโอติกครั้งนี้ ผู้วิจัยพบการลดลงของสารประกอบโพลิฟีนอล 3 ชนิดในน้ำทับทิม ได้แก่ คาเทชิน อิพิคาเทชิน และพีคูมาลิก โดยเมื่อเตรียมเซลล์โพรไบโอติกด้วยสารละลาย GTMM จะตรวจพบการลดลงของสารประกอบโพลิฟีนอลทั้ง 3 ชนิดในน้ำทับทิมเร็วกว่าเทียบกับในน้ำทับทิมเสริมโพรไบโอติกที่เตรียมเซลล์ด้วยสารละลาย MM แสดงให้เห็นถึงการใช้สารประกอบโพลีฟีนอลทั้ง 3 ชนิดนี้ได้มากขึ้นเมื่อเซลล์ผ่านการเตรียมในสภาวะที่มีชาเขียวเป็นส่วนประกอบ ผลที่เกิดขึ้นนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกับการทดลองใน *Lactobacillus hilgardii* 5w เมื่อผ่านการเตรียมเซลล์ด้วย MRS broth ที่มีการเติมสารประกอบฟีนอลิก จุลินทรีย์จะสามารถใช้คาเทชินและกรดแกลลิก ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มีผลต่อเมทาบอลิซึมของสารประกอบโพลีฟีนอลด้วย [17]

สารประกอบโพลิฟีนอลที่ลดลงมากที่สุดในน้ำทับทิมเสริมโพรไบโอติกได้แก่ พีคูมาลิก ซึ่งอธิบายได้จากการที่ *L. plantarum* มียีน pdc ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ p-coumaric acid decarboxylase (PDC) และยีนดังกล่าวจะถูกกระตุ้นให้ทำงานเมื่อมีสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดอยู่ในระบบเท่านั้น [23] จึงเป็นไปได้ว่าสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดในสารสกัดชาเขียวสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนดังกล่าว ทำให้เกิดการสลายของสารพีคูมาลิกในน้ำทับทิมได้เร็วขึ้น เมื่อเติมโพรไบโอติกที่ผ่านการเตรียมเซลล์ด้วยสภาวะที่มีชาเขียวสกัดเป็นส่วนประกอบ อย่างไรก็ดีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่สามารถทำให้โพรไบโอติกรอดชีวิตได้ดีขึ้นในน้ำทับทิม ทั้งนี้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ที่อาจช้าลงจากอิทธิพลของสารสกัดชาเขียวดังที่อธิบายไว้ข้างต้น และความเป็นพิษต่อเซลล์ที่สูงของสารพีคูมาลิก [20] ซึ่งสามารถทำให้เกิดการรั่วของเยื่อหุ้มเซลล์ Lactobacillus ได้อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด [24]

จากการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลกลูโคสในน้ำทับทิมเสริมโพรไบโอติกที่เก็บรักษาที่ 4 ºC เป็นเวลา 14 วัน พบว่าเซลล์ที่ผ่านการเตรียมด้วย GTMM จะทำให้กลูโคสในน้ำทับทิมลดลงได้เร็วกว่าเซลล์ที่เตรียมด้วย MM แต่ยังพบการลดลงของกลูโคสอย่างต่อเนื่องแม้จำนวนเซลล์ของ *L. plantarum* ที่รอดชีวิตจะลดลงจนเข้าใกล้ 0 การลดลงของปริมาณกลูโคสจึงไม่ได้มาจากจุลินทรีย์

ที่เติมลงไปแต่เพียงอย่างเดียว แต่อาจมาจากการเกิดปฏิกิริยากับสารอื่นๆ ในน้ำทับทิม เช่น ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (maillard reaction) กับโปรตีนที่มาจากการสลายของเซลล์จุลินทรีย์ที่ตายแล้วเป็นต้น [25] จึงยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดถึงความสามารถในการใช้น้ำตาลในน้ำทับทิมของ *L. plantarum* ที่ผ่านการเตรียมเซลล์ด้วยสภาวะต่างๆ ที่กำหนดขึ้นในการทดลองนี้

จากการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า การเตรียมเซลล์ *L. plantarum* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal medium ที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ไม่ช่วยให้จุลินทรีย์ดังกล่าวรอดชีวิตได้ดีขึ้นในน้ำทับทิม แม้ว่าจะใช้ค่า pH ที่ต่ำและใช้สารสกัดชาเขียวที่มีสารโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบร่วมด้วยก็ตาม ทั้งนี้เมื่อมีสารสกัดชาเขียวอยู่ในระบบ จะทำให้ความสามารถในการใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์ลดลงอย่างยิ่ง และเมื่อนำ *L. plantarum* ที่ผ่านการเตรียมด้วยสภาวะที่มีสารสกัดชาเขียวเติมลงในน้ำทับทิม เชื้อจะใช้สารคาเทชินและพีคูมาลิกในน้ำทับทิมได้เร็วกว่าเชื้อที่ไม่ผ่านการเตรียม งานวิจัยนี้จึงเป็นงานแรกที่รายงานผลการวิจัยลักษณะดังกล่าว ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาต่อเชิงลึกด้านชีวเคมีและเทคโนโลยีชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของยีนด้วยสารสกัดชาเขียวกับความสามารถในการสลายสารโพลีฟีนอลของจุลินทรีย์ และอาจสามารถใช้ในการอธิบายปรากฏการณ์ต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระบบที่มีจุลินทรีย์ *L. plantarum* และสารโพลีฟีนอลเป็นส่วนประกอบได้ต่อไป

References

[1] Brat P, Georgé S, Bellamy A, Du Chaffaut L, Scallbert A, Mennen L, et al. Nutritional epidermology daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. The Journal of Nutrition 2006;136(9):2368-73.

[2] Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ, Spencer JPE. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. Nutrients 2010;2:1106-31.

[3] Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C. Dietary polyphenols and the prevention of disease. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2005;45:287-306.

[4] Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, et al. Vascular protection by dietary polyphenols. European Journal of Phamacology 2004;500: 299-313.

[5] Singh M, Arseneault M, Sanderson T, Murthy V, Ramassamy C. Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: Bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2008;56:4844-73.

[6] Celep GS, Rastmanesh R, Marotta F. Microbial metabolism of polyphenol and health. In: Watson RR, Preedy VR, Zibadi S, editors. Polyphenols in Human Health and Disease. USA: Elsevier Inc; 2014. p.577-89.

[7] Meance S, Cayuela C, Turchet P, Raimondi A, Lucas C, Antoine JM. A fermented milk with a Bifidobacterium probiotic strain DN-173 010 shortened oro-fecal gut transit time in elderly. Microbial Ecology in Health and Disease 2001;13(4):217–22.

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

[9] Nualkaekul S, Charalampopoulos D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. International Journal of Food Microbiology 2011;146:111-7.

[10] Castro C, Mura F, Valenzuela G, Figueroa C, Salinas M, Zuniga C, et al. Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis. Food Research International 2014;64:873-9.

[11] Lorca GL, Raya RR, Taranto MP, de Valdez GF. Adaptive acid tolerance response in Lactobacillus acidophilus. Biotechnology Letters 1998;20(3):239-41.

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

[13] Ministry of Public Health. Notification of Ministry of Public Health Re: Use of Probiotic in Food. Government Gazette 2011;128:21-25. (In Thai)

[14] Perricone M, Corbo MR, Sinigaglia M. Viability of *Lactobacillus reuteri* in fruit juices. Journal of Functional Food 2014;10:421-6.

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

[16] 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 2015;99:1002-10.

[17] Alberto MR, Farías ME, Manca de Nadra MC. Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w growth and metabolism of organic compounds. Journal of Agricultural Food Chemistry 2001;49:4359-63.

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

[19] Gaudreau H, Champagne CP, Remondetto GE, Bazinet L, Subirade M. Effect of catechin on the growth of oxygen-sensitive probiotic bacteria. Food Research International 2013; 53:751-7.

[20] Rodríguez H, Criel JA, Landete JM, de las Rivas B, de Felipe FL, Gómez-Cordovés C, et al. Food phenolics and lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology 2009;132(2-3):79-90.

[21] Teixeira JS, Seeras A, Sanchez-Maldonado AF, Zhang C, Su MSW, Ganzle MG. Glutamine, glutamate, and arginine-based acid resistance in *Lactobacillus reuteri*. Food Microbiology 2014;42:172-180.

[22] Khalil BKS. Influence of gallic acid and catechin polyphenols on probiotic properties of *Streptococcus thermophilus* CHCC 3534 strain. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2010;26:2069-79.

[23] Barthelmebs L, Divies C, Cavin JF. Knockout of the p-coumadin decaboxylase gene from *Lactobacillus plantarum* reveals the existence of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism. Applied and Environmental Microbiology 2000;66(8) :3368-75.

[24] Campos FM, Couto JA, Figueiredo AR, Toth IV, Rangel AOSS, Hogg TA. Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology 2009;135:144-51.

[25] Kurtmann L, Skibsted LH, Carlson CU. Browning of freeze-dried probiotic bacteria cultures in relation to loss of viability during storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2009;57:6736-41.

ประวัติผู้เขียนบทความ

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

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