การเหลือรอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการช็อคด้วยกรดและตรึงเซลล์บนวุ้นที่เกิดจากการหมักด้วยน้ำสับปะรด

Survival of acid shocked and Nata De Pina immobilized probiotic bacteria

ตรี วาทกิจ[1*], บวรศักดิ์ ลีนานนท์[2] และ สนั่น จันทร์หอม[1]

Tree Vatakit[1], Borwonsak Leenanon[2] and Sanan Chanhom[1]

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเหลือรอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์น้ำสับปะรดด้วยวิธีการช็อคด้วยกรดและตรึงเซลล์ เชื้อโพรไบโอติกที่นำมาศึกษาได้แก่ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344, *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 และเชื้อผสมอัตราส่วน 1:1 การทดลองที่ 1 ศึกษากราฟการเติบโต พบว่า *L. lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344 และ *L. acidophilus* TISTR 1338 มีการเจริญเข้าสู่ช่วงเฟสคงที่ โดยมีจำนวนเซลล์ 8.5-9.0 logCFU/ml ใช้ระยะเวลาในการบ่ม 21 ชม. การทดลองที่ 2 พบว่า *L. lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344 ที่ผ่านการช็อคด้วยกรด (pH 4.5) มีจำนวนเหลือรอดสูงสุดเท่ากับ 5.72 logCFU/ml การทดลองที่ 3 ศึกษาวิธีการตรึงเซลล์บนแผ่นวุ้นเซลลูโลสที่ผลิตได้จาก *Acetobacter xylinum* TISTR 893 โดยใช้น้ำสับปะรดเป็นสับสเตรท พบว่าวุ้นที่มีลักษณะปั่นเป็นชิ้นเล็ก (flake) ทำให้เชื้อโพรไบโอติกมีจำนวนเหลือรอดสูงสุดเท่ากับ 7.29 logCFU/ml ส่วนการทดลองที่ 4 ศึกษาการเหลือรอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกรูปแบบต่างๆ พบว่าเซลล์ที่ผ่านการช็อคด้วยกรดร่วมกับการตรึงเซลล์ด้วยเซลลูโลสมีจำนวนเหลือรอดสูงสุดเท่ากับ 7.77 logCFU/ml โดยผลิตภัณฑ์น้ำสับปะรดเสริมโพรไบโอติกด้วยวิธีดังกล่าวมีคะแนนความชอบโดยรวมเฉลี่ยเท่ากับ 7.92

คำสำคัญ: โพรไบโอติก, การช็อคด้วยกรด, เซลล์ที่ถูกตรึง, วุ้นที่เกิดจากการหมักด้วยน้ำสับปะรด

ABSTRACT: The aim of this research was to study the survival of probiotic bacteria in pineapple juice after acid shocked and immobilized cell application. The probiotics consisted of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344, *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 and mixed cultures at a ratio of 1:1. For experiment 1, the bacterial growth curves of those probiotics were investigated. It was found that *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344 and *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 exhibited the stationary phase of growth with cell numbers of 8.5-9.0 logCFU/ml after incubated for 21 h. For experiment 2, it was found that acid shocked (pH 4.5) *L. lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344 cells had the highest number as 5.72 logCFU/ml. Then, for experiment 3, the selected probiotic cells were immobilized on bacterial cellulose produced by *Acetobacter xylinum* TISTR 893 using pineapple juice as substrate. It was revealed that the flake ones had the highest survival numbers of probiotic cells as 7.29 logCFU/ml. Furthermore, for experiment 4, the survivals of probiotic cells with different treatments in pineapple juice were determined. The results showed that the acid shocked plus bacterial cellulose immobilized cells had the highest numbers as 7.77 logCFU/ml. In addition, the pineapple juice supplemented with the above treatment had the average overall liking score of 7.92.

Keywords: probiotic bacteria, acid shock, immobilized cell, Nata De Pina

[1] สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเกษตรและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนครพนม จ.นครพนม 48000
Program in Food Technology, Faculty of Agriculture and Technology, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000

[2] ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002
Associate Professor, Department of Food Technology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Corresponding author: treevatakit@npu.ac.th

บทนำ

แบคทีเรียโพรไบโอติก (probiotic bacteria) เป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย โดยเมื่อบริโภคเข้าไปในปริมาณที่พอเหมาะจะช่วยควบคุมสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ (Fuller, 1992) จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่จัดเป็นโพรไบโอติกได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. immunitus*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *Bifidobacterium lactis* และ *B. longum* เป็นต้น โดยจะต้องยังคงความมีชีวิต (viability) และสามารถมีกิจกรรม (activity)ได้ การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มโดยเฉพาะน้ำผลไม้ (fruit juices) เริ่มมีบทบาทเพิ่มมากขึ้นในตลาดอาหารเพื่อสุขภาพ (Mattila-Sandholm et al., 2002) ซึ่งเหมาะสมกับทุกเพศทุกวัย รวมทั้งยังมีคุณค่าจากเกลือแร่และวิตามิน (ปราณี, 2541) มีรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกร่วมกับน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ เช่น *L. salivarius*, *B. lactis*, *L. casei*, *L. rhamnosus* และ *L. paracasei* ในน้ำส้ม, น้ำสับปะรด และน้ำแครนเบอร์รี่ เป็นต้น (Sheehan et al., 2007; Ding and Shah, 2008) นอกจากนี้ สวามินี และ Dimitris (2556) ได้รายงานว่า นวัตกรรมอาหารของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในตลาดช่วงปีที่ผ่านมาเป็นเครื่องดื่มที่ผลิตจากผลไม้และธัญพืช ซึ่งมีสภาวะแวดล้อมที่แย่ต่อการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกมากกว่านมหมัก เพราะมีค่าความเป็นกรดและสารประกอบฟีนอลอยู่ในระดับสูง โดยทั่วไปน้ำผลไม้มีองค์ประกอบเป็นกรดอินทรีย์ได้แก่ กรดซิตริกและ กรดมาลิกและมีค่า pH อยู่ระหว่าง 2.6-3.9 (Saarela et al., 2006) และผู้บริโภคมีความคาดหวังต่อปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ที่ระบุไว้ในฉลากตามเวลาที่กำหนด ดังนั้นหากสามารถประยุกต์ใช้สับปะรด ซึ่งเป็นผลไม้เศรษฐกิจของประเทศไทยที่มีผลผลิตในปริมาณมาก โดยนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำสับปะรดเสริมแบคทีเรียโพรไบโอติกก็จะช่วยเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ได้ทางหนึ่งพร้อมทั้งยังช่วยเพิ่มความหลากหลายของผลิตภัณฑ์สับปะรดแปรรูปให้มากยิ่งขึ้นอีกด้วย อย่างไรก็ตาม การที่จะได้รับประโยชน์จากแบคทีเรียโพรไบโอติกนั้น จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่ในผลิตภัณฑ์ที่บริโภคควรมีจำนวนอย่างน้อย 6 logCFU/ml ซึ่งถือว่าเป็นระดับต่ำสุดที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย (minimum therapeutic dose) (Lee and Salminen, 1995) และแนวทางหนึ่งในการป้องกันการลดจำนวนของแบคทีเรีย จึงมีแนวคิดในการประยุกต์ใช้วิธีการช็อคด้วยกรด (acid shock) (Foster and Hall, 1990) และเทคนิคการตรึงเซลล์แบคทีเรีย (immobilized bacteria cells) บนวุ้นเซลลูโลส (cellulose) ซึ่งผลิตได้จากเชื้อ *A. xylinum* เพื่อเพิ่มโอกาสในการอยู่รอดมากยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเหลือรอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการช็อคด้วยกรดและตรึงเซลล์บนเซลลูโลสในผลิตภัณฑ์น้ำสับปะรดรวมทั้งประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสเพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำผลไม้เสริมโพรไบโอติกต่อไป

วิธีการศึกษา

1. ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อโพรไบโอติก ได้แก่ *L. lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344 และ *L. acidophilus* TISTR 1338 โดยเจือจางเชื้อด้วย peptone water (Himedia, India) และใช้ MRS broth (Himedia, India) ในระดับความเจือจางสุดท้าย จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชม. โดยจะสุ่มตรวจสอบทุก 1 ชม. เพื่อตรวจนับจำนวนเชื้อด้วยวิธีเทเพลตด้วย MRS agar โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 48 ชม. จากนั้นนำจำนวนเชื้อที่นับได้ (log CFU/ml) และเวลาที่ใช้ในการสุ่มตัวอย่าง (ชม.) มาสร้างกราฟการเจริญเติบโต

2. ศึกษาผลของการช็อคด้วยกรดต่อการเหลือรอดของโพรไบโอติก ได้แก่ *L. lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344 และ *L. acidophilus* TISTR 1338 และเชื้อผสมอัตราส่วน 1:1 ที่เจริญเติบโตในช่วงเฟสคงที่ (stationary phase) โดยการปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยกรดซิตริก (citric acid) ให้เท่ากับ 4.5 ใน MRS

broth โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 7 วัน แล้วตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียโดยการนับบนเพลตด้วยอาหาร MRS agar เปรียบเทียบการเหลือรอดกับตัวอย่างควบคุม

3. ศึกษาผลของการตรึงเซลล์ด้วยแบคทีเรียเซลลูโลสต่อการเหลือรอดของโพรไบโอติกดัดแปลงจากวิธีของ พัฒนพงษ์ (2543) โดยนำน้ำสับปะรดที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบางมาปรับปริมาณของแข็งให้มีค่าเท่ากับ 10 ^{0} Brix ด้วยน้ำตาลซูโครส และเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 % กรองให้สะอาดด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 °ซ นาน 15 นาที ทำให้เย็นทันทีที่อุณหภูมิ 10-14 °ซ แล้วเติมเอธิลแอลกอฮอล์ 2 % ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดอะซิติกให้ได้เท่ากับ 4.5 เติมกล้าเชื้อ *A. xylinum* จำนวน 10 % จากนั้นเทใส่ลงในภาชนะสแตนเลสปลอดเชื้อ ปิดด้วยผ้าขาวบางสะอาด หมักไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 32°ซ) นาน 10-14 วัน จากนั้นนำเซลลูโลสที่ได้มาผ่านการล้างให้สะอาด แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±1 °ซ เมื่อได้แผ่นเซลลูโลสแล้วจะนำไปเตรียมเพื่อใช้ในการตรึงเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ 1) ลูกบาศก์ขนาด 0.5 ซม^3, 2) ลูกบาศก์ขนาด 1.0 ซม^3 และ 3) ปั่นแผ่นเซลลูโลสด้วยเครื่องปั่น (blender) นาน 10 นาที ให้เป็นปั่นชิ้นเล็ก (flakes) จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยของโพรไบโอติกที่ผ่านการคัดเลือกแล้วใน MRS broth ปริมาตร 500 มล. ในขวดแก้วรูปชมพู่ปลอดเชื้อ ขนาด 1 ลิตร เติมเซลลูโลสแต่ละทรีตเมนต์จำนวน 200 กรัม จากนั้นนำไปที่บ่มอุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชม. ตรวจสอบการเหลือรอดของเซลล์ด้วยวิธีเทเพลทด้วย MRS agar และรายงานในรูป logCFU/ml

4.ศึกษาผลของการช็อคด้วยกรดและตรึงเซลล์ร่วมกันต่อการเหลือรอดของโพรไบโอติกในน้ำสับปะรด โดยการนำเนื้อสับปะรด ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นและกรองด้วยผ้าขาวบาง ปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ให้ได้ 10^0 Brix นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 72 °ซ นาน 15 วินาที ด้วยเครื่องพาสเจอไรส์ (FT 43 pasteurizer) จากนั้นบรรจุใส่ขวด polyethylene terephthalate (PET) ขนาด 500 มล. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำให้เย็นทันทีที่อุณหภูมิ 10-14 °ซ แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±1 °ซ จากนั้นเติมโพรไบโอติก 10 % ตามทรีตเมนต์ดังนี้ 1) เซลล์ควบคุม 2) เซลล์ที่ผ่านการปรับด้วยกรดซิตริก 3) เซลล์ที่ผ่านการตรึงด้วยเซลลูโลส และ 4) เซลล์ที่ผ่านการช็อคด้วยกรดและตรึงด้วยเซลลูโลส โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±1 °ซ เก็บรักษานาน 21 วัน ตรวจสอบค่าต่างๆ ได้แก่ จำนวนเซลล์ที่เหลือรอด (log CFU/ml), ปริมาณของแข็งที่ละลายได้, ค่าความเป็นกรด-ด่าง, ร้อยละความเป็นกรด (กรดซิตริก) (AOAC, 1999) จากนั้นนำสภาวะที่เหมาะสมเพื่อนำมาผลิตและประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยทดสอบความชอบด้านลักษณะปรากฏ, สี, เนื้อสัมผัส, กลิ่น, ความเปรี้ยว, ความหวาน และความชอบโดยรวม โดยใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝนจำนวน 30 คน ทดสอบด้วยวิธี 9-point hedonic scale (Meilgaard et al, 1999) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) สำหรับผลการวิเคราะห์คุณภาพทุกด้าน ยกเว้นการประเมินด้านประสาทสัมผัสวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ในบล็อค (Randomized Complete Block Design: RCBD) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากผลการทดลองพบว่า *L. acidophilus* TISTR 1338 จะเข้าสู่ช่วงแล็กเฟส (lag phase) ในชั่วโมงที่ 0-3 และมีจำนวนเซลล์อยู่ประมาณ 2.30 logCFU/ml และเริ่มเข้าสู่ช่วงล็อคเฟส (log phase) ในชั่วโมงที่ 4 และหลังจากชั่วโมงที่ 19 จะเข้าสู่ช่วงเฟสคงที่ (stationary phase) ซึ่งเป็นระยะที่มีจำนวนแบคทีเรียสูงที่สุดและคงที่ โดยมีค่าประมาณ 9.00 log CFU/ml จนถึงชั่วโมงที่ 48 ส่วนเชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344 จะเข้าสู่ช่วงแล็กเฟสในชั่วโมงที่ 0-6 โดย

มีจำนวนของแบคทีเรียโพรไบโอติกอยู่ประมาณ 2.00 logCFU/ml และเริ่มเข้าสู่ช่วงล็อคเฟส ในชั่วโมงที่ 7 และหลังจากชั่วโมงที่ 21 จะเข้าสู่ช่วงเฟสคงที่ ซึ่งเป็นระยะที่มีจำนวนแบคทีเรียสูงที่สุดและคงที่ คือมีประมาณ 8.50 logCFU/ml จนถึงชั่วโมงที่ 48 การศึกษาครั้งนี้จะพิจารณาใช้ช่วงระยะเฟสคงที่ของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้งสองชนิดในชั่วโมงที่ 21 เพื่อใช้ในการทดลองถัดไปโดยจำนวนเซลล์เริ่มต้นของแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีประมาณ 8.50-9.00 logCFU/ml (**Figure 1**)

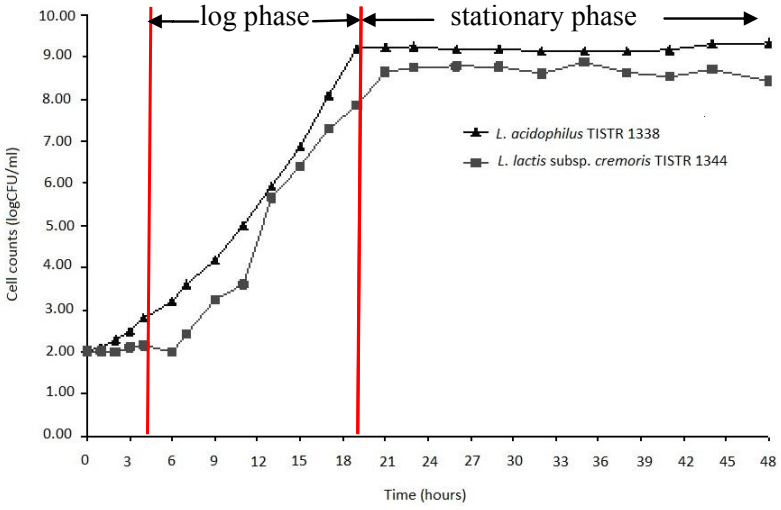

Figure 1 Bacterial growth curves of *L. acidophilus* TISTR 1338 and *L. lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344

เมื่อพิจารณาการผ่านการช็อคด้วยกรดพบว่าจำนวนการเหลือรอดของโพรไบโอติกที่ผ่านการช็อคด้วยกรดมีจำนวนเหลือรอดมากกว่าเชื้อที่ไม่ได้ผ่านกรรมวิธี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Foster and Hall (1990) ที่อธิบายถึงผลของการปรับตัวต่อสภาวะกรดที่ไม่สูงมากนัก ซึ่งจะส่งผลต่อความทนทานของเซลล์ให้มากยิ่งขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการปรับตัว อย่างไรก็ตาม ในวันสุดท้ายของการเก็บรักษา (7 วัน) พบว่าโพรไบโอติกที่ผ่านการช็อคด้วยกรดทั้ง 3 ทรีตเมนต์มีจำนวนเหลือรอดมากกว่าระดับต่ำสุดที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย (6 log CFU/ml) (Lee and Salminen, 1995) โดย *L. lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344 มีจำนวนเหลือรอดมากที่สุด เท่ากับ 5.72 logCFU/ml รองลงมาคือเชื้อผสมระหว่าง *L. acidophilus* TISTR 1338 และ *L. lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344 ซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 5.39 และ 5.37 logCFU/ml (**Table 1**) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Helge et al. (1991); Jesus และ Rufino (2013) โดยได้รายงานว่า เกิดจากผลของการเจริญแบบแข่งขันทำลายกัน (Antagonistic) ของแบคทีเรียกลุ่มแลคติกและการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus plantarum* NC8C และ *Enterococcus faecium* 6T1a จะมีผลให้การผลิตสารแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า *L. lactis* subsp. *cremoris* สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินคือ Lactococcin A (LCN-A) ได้ด้วย ดังนั้นจึงคัดเลือก *L. lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344 ที่ผ่านการช็อคด้วยกรดไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

Table 1 Cell survival of probiotic after acid shocked (pH 4.5) (log CFU/ml)

Probiotics	Treatments	
	Control	Acid shocked cells
L. acidophilus	4.94 ± 0.08[c]	5.37 ± 0.03[b]
L. lactis subsp. *cremoris*	5.21 ± 0.16[b]	5.72 ± 0.18[a]
L. acidophilus + *L. lactis* subsp. *cremoris*	5.51 ± 0.01[a]	5.39 ± 0.11[b]

[a,b,c] Different letters in both rows and columns indicated significant differences (p≤0.05)

หลังจากการตรึงเซลล์ของเชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344 ลงบนแผ่นเซลลูโลสที่มีลักษณะแตกต่างกัน 3 ทรีตเมนต์ใน MRS broth และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. พบว่า แผ่นเซลลูโลสแบบเป็นปั่นชิ้นเล็ก (flakes) นั้นมีปริมาณเชื้อเหลือรอดมากที่สุดโดยมีจำนวนเท่ากับ 7.29 logCFU/g (**Table 2**) ทั้งนี้เพราะมีพื้นที่ผิวสัมผัสมากกว่า ทรีตเมนท์อื่นๆ รองลงมาได้แก่ แผ่นเซลลูโลสลูกบาศก์ขนาด 1.0 ซม^3 และ 0.5 ซม^3 โดยมีปริมาณเชื้อที่เหลือรอดเท่ากับ 6.45 และ 6.37 logCFU/g ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Karol et al. (2016) ได้รายงานว่า การใช้เซลลูโลสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Gluconacetobacter xylinus* ในการตรึงเซลล์ *Lactobacillus* spp. ในรูปแบบ (form) ที่แตกต่างกันมีผลต่อจำนวนการเหลือรอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.05) นอกจากนี้ Hornung et al. (2006); Yao et al. (2011) ได้อธิบายว่า เนื่องจากโครงสร้างที่มีความเป็นรูพรุน (porous structure) ของเซลลูโลสช่วยเพิ่มพื้นที่ในการตรึงเซลล์และการแพร่ผ่านของสารอาหารรวมทั้งรักษาความชื้นและสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการเจริญของเซลล์ ดังนั้น แผ่นเซลลูโลสที่ตรึงเซลล์โพรไบโอติกและมีจำนวนเซลล์เหลือรอดมากที่สุด คือ แผ่นเซลลูโลสแบบที่ปั่นเป็นชิ้นเล็ก (flakes) ซึ่งจะนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

Table 2 The survival of *L. lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344 after immobilized on cellulose with different formations

Formations	Total cell counts (logCFU/g)
T1: Cube 0.5 cm^3	6.37 ± 0.02[b]
T2: Cube 1.0 cm^3	6.45 ± 0.05[b]
T3: Flakes	7.29 ± 0.08[a]

[a,b,c] Different letters in the same column indicated significant differences (p≤0.05)

จาก **Table 3** การเหลือรอดของ *L. lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344 ที่ผ่านการช็อคด้วยกรดร่วมกับการตรึงเซลล์บนเซลลูโลสในน้ำสับปะรดด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ 1) ทรีตเมนต์ควบคุม 2) การช็อคด้วยกรด 3) การตรึงเซลล์ด้วยเซลลูโลส และ 4) การช็อคด้วยกรดและตรึงเซลล์ด้วยเซลลูโลส จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 21 วัน แล้วตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในด้านต่างๆ ได้แก่ ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (log CFU/ml), ค่าความเป็นกรด-ด่าง, ค่าร้อยละความเป็นกรด (กรดซิตริก) และ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยจำนวนเซลล์เริ่มต้น มีค่าเท่ากับ 8.12 logCFU/ml (วันที่ 0) จากการทดลองพบว่า ทุกทรีตเมนต์มีจำนวนเซลล์ลดลงเมื่อเก็บรักษาไว้นานขึ้น (วันที่ 21) โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.05) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ศริสา และคณะ (2548) ได้รายงานว่า จำนวนโพรไบโอติกที่เหลือรอดในน้ำผลไม้มีแนวโน้มลดลง เมื่อเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น การลดลงของปริมาณเชื้อโพรไบโอติกอาจเกิด

จากโครงสร้างไฮโดรเจล-เมตริกซ์ (hydrogel-matrix) ของเซลลูโลส ซึ่งเป็นวัสดุโพลิเมอร์ที่สามารถเกิดการเสื่อมสลายได้ (biodegradable polymeric material) เกิดการเปลี่ยนแปลง (Corcoran et al, 2005) เนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเก็บรักษา ทำให้พันธะ β-1,4 glycosidic ที่เชื่อมต่อกันระหว่างโพลิเมอร์ของเซลลูโลสอ่อนแอลง ส่งผลต่อความแข็งแรงของโครงสร้างเซลลูโลส ซึ่งเชื้อโพรไบโอติกใช้เป็นแหล่งในการยึดเกาะเพื่อช่วยในการเจริญเติบโต (food matrix) มีผลทำให้ปริมาณเชื้อโพรไบโอติกทั้งหมดที่เหลือรอดลดลง นอกจากนี้ การปรับตัวต่อกรด (acid adaptation) ของเชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344 ที่ผ่านการช็อคด้วยกรด นอกจากนี้ Corcoran et al. (2005) ได้อธิบายว่าการเหลือรอดของแบคทีเรียกลุ่ม lactobacilli เกิดจากผลของสภาวะที่เป็นกรดจะช่วยเพิ่มความสามารถในการนำน้ำตาลที่สามารถนำมาใช้ได้ในกระบวนการเมตะบอลิสม (metabolizable sugar) เพื่อช่วยในการทำงานของปั๊มโปรตอน (proton pump) บริเวณเยื่อหุ้มผนังเซลล์ (cell membrane) ให้มากขึ้น และช่วยป้องกันการ ลดต่ำลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) บริเวณภายในของเซลล์ (intracellular cell) อย่างไรก็ตามพบว่า การช็อคด้วยกรดและตรึงเซลล์ด้วยเซลลูโลสมีจำนวนเหลือรอดสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับทรีตเมนต์อื่นๆ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.77 logCFU/ml ซึ่งมีจำนวนเซลล์สูงกว่าระดับต่ำสุดที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย (Lee and Salmen, 1995; Dave and Shah,1996).

Table 3 The Characteristics of probiotic pineapple juice with different treatments

Treatments	Total cell count (log CFU/ml)	pH	TA (%)	TSS (°Brix)
T1: Control	6.25±0.49^{c}	3.78±0.02^{b}	0.72±0.03^{ns}	10.94±0.41^{a}
T2: Acid shocked cells	7.27±0.48^{b}	3.78±0.03^{b}	0.72±0.03^{ns}	10.91±0.39^{b}
T3: Cellulose immobilized cells	7.22±0.54^{b}	3.83±0.04^{a}	0.73±0.03^{ns}	10.13±0.24^{c}
T4: Acid shocked + Cellulose immobilized cells	7.77±0.55^{a}	3.83±0.04^{a}	0.73±0.04^{ns}	9.91±0.41^{c}

^{a,b,c} Different letters in the same column indicated significant differences ($p \leq 0.05$)

^{ns}not significant difference ($p > 0.05$)

เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น (วันที่ 21) ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำสับปะรดโพรไบโอติกมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (วันที่ 0 เท่ากับ 3.67) อย่างไรก็ตาม ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดจากกระบวนการย่อยโปรตีน (proteolysis) โดยเอนไซม์โบรมิเลน (bromelain) ที่พบมากในน้ำสับปะรด (Moore and Caygill, 1979) เมื่อย่อยสลายชั้นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลและกรดอะมิโนที่พบได้มากบริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid) และหมู่อะมิโน (amino group; $-NH_2$) ที่เกิดจากการดึงโปรตอนออกจากแอมโมเนียมอิออน ($-NH_3^+$) จาก zwitterion ซึ่งทำให้ประจุสุทธิเป็นลบ (pH>pI) จึงทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีค่าเพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tran et al. (2009) ได้รายงานว่า เอนไซม์โบรมิเลน สามารถเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ได้ที่ค่า pH อยู่ระหว่าง 3.5 ถึง 3.8 แม้ว่าอุณหภูมิจะเพิ่มสูงถึง 70°ซ การเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ยังคงเกิดขึ้นโดยมีค่าประมาณ 80 % นอกจากนี้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการเกิดกิจกรรมเอนไซม์โบรมิเลน คือ pH เท่ากับ 7.1 และอุณหภูมิ 55 °ซ

(14.9 TU/ml) ส่วนค่าร้อยละความเป็นกรด (กรดซิตริก) ของทรีตเมนต์ทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) การใช้เซลล์ปกติและการช็อคด้วยกรด ส่งผลให้การตรึงเซลล์ด้วยเซลลูโลสและการช็อคด้วยกรดร่วมกับการตรึงด้วยเซลลูโลสต่อปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.05) ซึ่งปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำผลไม้ส่วนใหญ่จะมีองค์ประกอบของน้ำตาล ได้แก่ น้ำตาลซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคส ดังนั้นในน้ำสับปะรดที่มีการตรึงเซลล์ด้วยเซลลูโลสซึ่งมีโครงสร้างภายในแบบไฮโดรเจลเมตริกซ์ (hydrogel matrix) และความแตกต่างของความดันออสโมติก (osmotic pressure) ทำให้สารละลายน้ำตาลเคลื่อนเข้าสู่โครงสร้างดังกล่าว มากกว่าทรีตเมนต์ที่ไม่ได้เติมวุ้นเซลลูโลส มีผลทำให้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดลดลง

Table 4 Sensorial characteristics of probiotic supplemented pineapple juice

Sensorial characteristics	Treatments	
	T1: Control	T2: Acid shocked + cellulose immobilized cells
Appearance	6.23±1.27[b]	6.82±0.99[a]
Color	6.82±1.04[a]	6.40±1.15[b]
Texture	6.52±1.89[b]	7.63±1.35[a]
Odor	6.82±1.26[ns]	6.90±1.19[ns]
Sourness	6.42±1.52[ns]	6.63±1.57[ns]
Sweetness	6.62±1.26[ns]	6.43±1.56[ns]
Overall liking	6.88±1.55[b]	7.92±1.13[a]

[a,b,c] Difference letters in the same row indicated significant differences (p≤0.05)

[ns]not significant difference (p>0.05)

เมื่อทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์น้ำสับปะรดเสริมโพรไบโอติก (Table 4) พบว่า ตัวอย่างน้ำสับปะรดที่เสริมด้วยโพรไบโอติกที่ผ่านการช็อคเซลล์ด้วยกรดร่วมกับการตรึงบนเซลลูโลสให้ค่าคะแนนความชอบเฉลี่ย ในด้านลักษณะปรากฏ, สี, ลักษณะเนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมแตกต่างกันทางสถิติ จากทรีตเมนต์ควบคุม (control) โดยมีค่าคะแนนความชอบโดยรวมที่สูงกว่า คือ มีค่าเท่ากับ 7.92 และ 6.88 ตามลำดับ (p≤0.05)

สรุป

แบคทีเรียโพรไบโอติกที่เหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์น้ำสับปะรดเสริมโพรไบโอติก คือ *L. lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344 ซึ่งมีช่วงเฟสการเจริญคงที่ ที่ระยะเวลา 21 ชม. โดยมีจำนวนเหลือรอดสูงสุดเมื่อผ่านการช็อคด้วยกรด (pH 4.5) นอกจากนี้ยังพบว่า วิธีการตรึงเซลล์บนแผ่นวุ้นเซลลูโลสแบบปั่นชิ้นเล็ก (flakes) เป็นวิธีที่เหมาะสมในการเสริมการเหลือรอดของเซลล์ให้สูงสุดอีกด้วย และเมื่อมีการใช้วิธีการช็อคด้วยกรดร่วมกับวิธีการตรึงเซลล์ด้วยเซลลูโลสในผลิตภัณฑ์น้ำสับปะรดเสริมโพรไบโอติกพบว่ามีจำนวนเซลล์เหลือรอดสูงสุดเท่ากับ 7.77 logCFU/ml เมื่อเก็บไว้นาน 21 วัน ที่อุณหภูมิ 4±1°ซ โดยมีค่าคะแนนความชอบโดยรวมสูงสุดเท่ากับ 7.92 ดังนั้น ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำสับปะรดเสริมด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติก จึงจัดเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพที่สามารถเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์กลุ่มเครื่องดื่มโพรไบโอติกได้แนวทางหนึ่ง นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มความหลากหลายของผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสับปะรดให้มากยิ่งขึ้นอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2541. ทฤษฎีการผลิตน้ำผลไม้บรรจุขวดพร้อมดื่ม และความรู้เกี่ยวกับการขอขึ้นทะเบียน ตำหรับอาหารและใบอนุญาตตั้งโรงงานผลิตอาหาร. วารสารอาหาร. 28(3): 157-167.

พัฒนพงษ์ วันจันทึก. 2543. การผลิตเซลลูโลสจากน้ำคั้นจากเปลือกสับปะรดโดยเชื้อ *Acetobacter* sp. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศริสา ทวีแสง, บวรศักดิ์ ลีนานนท์, สิงหนาท พวงจันทน์แดง. 2548. การเหลือรอดของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ . วารสารวิจัย มข. (บัณฑิตศึกษา). 5: 77-88.

สวามินี นวลแขกุล และ Dimitris Charalampopous. 2556. การรอดชีวิตของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในน้ำผลไม้. วารสารวิทยาศาสาตร์ มศว. 29(2): 237-262.

AOAC. 1999. Official Methods of Analysis Association of Official Analytical Chemist. 16th Edition, Marryland.

Corcoran, B. M., C. Stanton., G. F. Fitzgerald, and R. P. Ross. 2005. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. Appl. Environ. Microbiol. 71: 3060–3067.

Dave, R. I., and N. P. Shah. 1996. Evaluation of Media for Selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and Bifidobacteria. J. Dairy Sci. 79: 1529-1536.

Ding, W. K., and N. P. Shah. 2008. Survival of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria in Orange and Apple Juices. Int Food Res J. 15: 219-232.

Foster, J. W., and H. K. Hall. 1990. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 172(2): 771-778.

Fuller, R. 1992. Probiotic The scientific basis. Chapmen & Hall, London.

Helge, H., N. Oivind, and F. N. Ingolf. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: Isolation and characterization of the protein and its gene. J. Bacteriol. 173(12): 3879-3887.

Hornung, M., M. Ludwig., A. M. Gerrard, and H. P. Schmauder. 2006. Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: evaluation of substrate mass transfer influences on the bioreaction (Part 1). Engineering in Life Sciences. 6: 537-545.

Jesus, D. M., and J. D. Rufino. 2013. Suppression of bacteriocin production in mixed-species cultures of lactic acid bacteria. Food Control. 30(2): 474-479.

Karol, F., P. Dorota., R. Rafal, and Z. Anna. 2016. Survival of probiotic lactic acid bacteria immobilized in different forms of bacterial cellulose in simulated gastric juices and bile salt solution. LWT- Food Sci Technol. 68(5): 322-328.

Lee, Y. K, and S. Salminen. 1995. The coming of age of probiotic. Trends Food Sci Technol. 6: 241-245.

Mattila-Sandholm, T., P. Myllarinen., R. Crittenden., G. Mogensen., R. Fonden, and M. Saarela. 2002. Technological challenges for future probiotic foods. Int. Dairy. J. 12: 173-182.

Meilgaard, M., C. V. Cille, and B. T. Carr. 1999. Sensory Evaluation Techniques. 3rd Edition. CRC press, Boca Raton, Florida.

Moore, D. J, and J. C. Caygill. 1979. Proteolytic activity of Malaysian pineapples. Trop Sci. 21(2): 97–103.

Saarela, M., I. Virkajarvi., L. Nohynek., A. Vaari, and J. Matto. 2006. Fibres as Carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during Freeze-drying and Storage in Apple Juice and Chocolate-coated breakfast Cereals. Int J Food Microbiol. 112: 171-178.

Sheehan, V. M., P. Ross, and G. F. Fitzgerald. 2007. Assessing the Acid Tolerance and the Technological Robustness of Probiotic Cultures for Fortification in Fruit Juices. Innov Food Sci Emerg Journal 8: 279-284.

Tran, T. T., T. Le Kim, and M. V. Nguyen. 2009. Effect of pH and temperature on the activity of bromelain in pineapple fruit. pp. 458-463. In: Proceedings in 11th Asean Food Conference, October 21-23, 2009, Brunei.

Yao, W., X. Wu., J. Zhu, B. Sun., Y. Y. Zhang, and C. Miller. 2011. Bacterial cellulose membrane - a new support carrier for yeast immobilization for ethanol fermentation. Process Biochem. 46: 2054-2058.