การปรับตัวในสภาวะกรดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์สายพันธุ์ Lactobacillus
ACID STRESS RESPONSES OF PROBIOTIC LACTOBACILLUS

*ปรมาภรณ์ เกิดทรัพย์**

Paramaporn Kerdsup*

คณะเทคโนโลยีและนวัตกรรมผลิตภัณฑ์การเกษตร มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

Faculty of Agricultural Product Innovation and Technology, Srinakharinwirot University.

***Corresponding author, E-mail:** paramapornk@g.swu.ac.th*

บทคัดย่อ

โพรไบโอติกส์แบคทีเรียคือแบคทีเรียที่มีชีวิตและมีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์ในหลายๆ ด้านเมื่อบริโภคในปริมาณที่มากเพียงพอ สายพันธุ์แบคทีเรียหนึ่งที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกส์ที่ดีและนิยมใช้เติมในผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ *Lactobacillus* ซึ่งโดยทั่วไปจะนิยมเสริมโพรไบโอติกส์ในผลิตภัณฑ์นม เช่น โยเกิร์ต แต่ในปัจจุบันมีผู้ป่วยที่แพ้น้ำตาลแลคโตสในนมมากขึ้น จึงมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมโพรไบโอติกส์ชนิดต่างๆ ที่ไม่มีส่วนผสมของนม น้ำผลไม้เสริมโพรไบโอติกส์จึงเป็นผลิตภัณฑ์หนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจากเป็นอาหารที่มีน้ำตาลอยู่มาก อย่างไรก็ดีน้ำผลไม้เป็นอาหารที่มีความเป็นกรดสูง ทำให้โพรไบโอติกส์ที่เสริมลงไปตายลงได้ง่ายระหว่างการเก็บรักษา จึงได้มีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับความสามารถในการเอาตัวรอดในสภาวะกรดของ *Lactobacillus* และพบว่ามีกระบวนการหลากหลายที่จุลินทรีย์นี้ใช้ในการปรับตัวทำให้แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการทนกรดไม่เหมือนกัน ตัวอย่างเช่น ความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ในไซโตพลาสซึม ระบบการขับโปรตรอนออกนอกเซลล์โดยเอนไซม์ H^+-ATPase ระบบ decarboxylation และ deamination ของกรดอะมิโน และการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของกรดไขมันที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ อีกทั้งยังมีปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบต่างๆ ดังกล่าวค่อนข้างมาก บทความนี้เป็นการรวบรวมความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับระบบต่างๆ ที่ *Lactobacillus* ใช้ในการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในภาวะที่เป็นกรด รวมถึงยีนและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับระบบอันจะเป็นการบ่งบอกความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์และเป็นประโยชน์ต่อการนำโพรไบโอติกส์สายพันธุ์ต่างๆ ไปประยุกต์ใช้ต่อไป

คำสำคัญ: สภาวะกรด *Lactobacillus* โพรไบโอติกส์

Abstract

Probiotics are live bacteria that are beneficial to human health when consumed daily in adequate doses. *Lactobacillus* is a probiotic bacterium widely used as a supplement in fermented milks and other dairy products such as yoghurt. However, a steady rise in lactose intolerant patients has prompted a surge in efforts to develop non-dairy probiotics. Fruit juices, with their high sugar content, are good vehicles for probiotics but high acidity reduces the cell count during storage. Many recent researches have focused on the survival of

Lactobacillus in acidic conditions and found a variety of mechanisms adopted by each species against low pH. These adaptations include buffering capacity of the cytoplasm, proton secretion by H^+-ATPase, amino acid decarboxylation and deimination, and alteration of cell membrane fatty acids. Factors related to these systems are also important for cell survival. This article compiles the latest findings on systems used by *Lactobacillus* to adapt and survive in acidic media. Genetic factors associated with the systems are also discussed. The knowledge of the mechanical differences of each species is useful for probiotic supplemented high acid food development.

Keywords: Acid Stress, *Lactobacillus*, Probiotic

บทนำ

จุลินทรีย์โพรไบโอติกส์คือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่มีประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน ซึ่งประโยชน์ที่ได้รับจะมีความเกี่ยวข้องกับสุขภาพของระบบทางเดินอาหารเป็นหลัก และเป็นผลต่อเนื่องไปยังการส่งเสริมให้สุขภาพด้านอื่นๆ ของเจ้าบ้านดีขึ้น แต่ทั้งนี้โพรไบโอติกส์จะมีประโยชน์ดังกล่าวได้นั้น ร่างกายจะต้องได้รับโพรไบโอติกส์ในจำนวนที่มากเพียงพอคือ ไม่ต่ำกว่า 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรและเป็นเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่เท่านั้น [1] การเสริมโพรไบโอติกส์ลงในผลิตภัณฑ์อาหารจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะทำให้ผู้บริโภคได้รับโพรไบโอติกส์ในปริมาณที่มากเพียงพอที่จะทำให้เกิดผลดี เนื่องจากโดยปกติแล้วในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์จะมีจุลินทรีย์อยู่กว่า 500 ชนิด ประกอบด้วยแบคทีเรียมากกว่า 10^{14} เซลล์ และยังมีสายพันธุ์ในตระกูลรา ยีสต์ ไวรัส และโปรโตซัว อีกเป็นจำนวนมาก ซึ่งบางสายพันธุ์เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อโรคให้กับมนุษย์ได้ เช่น กลุ่ม Streptococci และ Staphylococci เป็นต้น สายพันธุ์เหล่านี้เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร [2] การเพิ่มจำนวนโพรไบโอติกส์ในระบบทางเดินอาหารจึงเป็นการลดโอกาสที่จุลินทรีย์ก่อโรคจะแพร่กระจายได้ นอกจากนี้การศึกษาวิจัยที่ผ่านมาทำให้เกิดความเข้าใจในกลไกการส่งเสริมสุขภาพของโพรไบโอติกส์ว่าสามารถช่วยลดโอกาสการเป็นโรคและบรรเทาอาการไม่พึงประสงค์ต่างๆ [3, 4] ได้แก่

1. ช่วยในการย่อยน้ำตาลแลคโตส จึงช่วยลดอาการแพ้น้ำตาลแลคโตสในนมโดยโพรไบโอติกส์สามารถสร้างเอนไซม์ β-galactosidase ซึ่งมีบทบาทในการช่วยสลายแลคโตสได้ที่บริเวณลำไส้เล็ก [5] แต่อย่างไรก็ดีกลไกที่แท้จริงยังไม่สามารถสรุปได้แน่นอน [6]

2. ช่วยต่อต้านเชื้อโรคไม่ให้เข้าสู่กระแสเลือด ช่วยกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดี้ (Antibody) เพิ่มขึ้น [7] โดยกระตุ้นการทำงานของวัคซีนให้ได้ผลดีขึ้น [8] และโพรไบโอติกส์ยังรวมตัวกันเป็นกลุ่มและเกาะติดอยู่กับผนังลำไส้ใหญ่ ป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคสามารถเกาะติดกับเนื้อเยื่อลำไส้ และเพิ่มจำนวนได้นอกจากนี้โพรไบโอติกส์ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมภายในลำไส้ให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อโรคได้น้อยลง เช่น มีค่าพีเอชที่ต่ำลง หรือมีการสร้างแบคเทอริโอซิน [9] ซึ่งเป็นสารต้านจุลินทรีย์ออกมา เป็นต้น

3. ช่วยต่อต้านการเกิดมะเร็ง โดยช่วยลดโอกาสการเกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) ของเซลล์หรือยับยั้งสารตั้งต้นในการก่อมะเร็งในลำไส้ และยังสามารถกระตุ้นการทำงานของภูมิคุ้มกันซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการลดความเสี่ยงในการก่อตัวของมะเร็งอีกด้วย [10]

4. กระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งระบบที่มีมาแต่กำเนิด [11] และระบบที่เกิดขึ้นภายหลัง [12]

5. ช่วยบรรเทาอาการแพ้ต่างๆ โดยมีการศึกษาพบว่าโพรไบโอติกส์สามารถลดอาการแพ้อาหาร อาการหอบหืด และภูมิแพ้ที่ผิวหนังได้ ซึ่งโพรไบโอติกส์แต่ละสายพันธุ์จะให้ผลไม่เหมือนกัน ดังนั้นการได้รับจุลินทรีย์เหล่านี้เข้าไปในช่วงต้นของชีวิตจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้เกิดความหลากหลายของสายพันธุ์และป้องกันการเกิดอาการแพ้ได้อย่างแท้จริง [13]

6. ช่วยลดไขมันในเลือดและบรรเทาอาการของโรคหัวใจขาดเลือด โดยโพรไบโอติกส์จะสามารถดูดซึมคอเลสเตอรอลไปใช้ได้ซึ่งคาดว่าเกี่ยวข้องกับการนำไปผลิต Exopolysaccharide บางชนิด และยังทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยน้ำดีเปลี่ยนแปลงไป เป็นผลให้มีน้ำดีที่ถูกดูดซึมกลับไปใช้ใหม่น้อยลง ร่างกายจึงต้องดึงเอาคอเลสเตอรอลที่มีอยู่มาใช้ในการผลิตน้ำดีใหม่ [14, 15]

7. ช่วยป้องกันการเกิดอาการท้องเสียจากการได้รับยาปฏิชีวนะ [16, 17]

8. ช่วยเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิดในลำไส้ [18]

9. ช่วยป้องกันการอักเสบของลำไส้ใหญ่ที่เป็นผลมาจากการติดเชื้อ *Heticobacter pylori* ได้ โดยเพิ่มจำนวนและจับกลุ่มกันบนพื้นผิวของลำไส้ ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรครวมถึง *H. pylori* ไม่สามารถเกาะผนังลำไส้และเพิ่มจำนวนได้ [19]

จากคุณประโยชน์ที่หลากหลายของโพรไบโอติกส์จึงทำให้มีผู้สนใจศึกษาการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติกส์และผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกส์ในรูปแบบต่างๆ ออกมามากมาย เพื่อตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคที่ให้ความสำคัญของสุขภาพ นอกจากนี้การเติบโตของตลาดผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้งานวิจัยทางด้านโพรไบโอติกส์ได้รับความสนใจมากขึ้นอีกด้วย โดยในปี 2007 ตลาดสินค้าที่เกี่ยวข้องกับโพรไบโอติกส์ทั้งลักษณะที่เป็นสารเสริมลงในอาหาร (Ingredients) ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (supplements) และเป็นผลิตภัณฑ์อาหารมีมูลค่าสูงถึง 14.9 พันล้านเหรียญดอลลาร์สหรัฐ และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็น 16 พันล้านเหรียญดอลลาร์สหรัฐในปี 2008 และยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง [20] โดยสายพันธุ์ที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้มากที่สุดในท้องตลาด ได้แก่ *Lactobacillus* ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้ในผลิตภัณฑ์นม เช่น โยเกิร์ตและชีส โดยโยเกิร์ตจะได้รับความนิยมมากที่สุดเนื่องจากมีกลิ่นรสเป็นที่คุ้นเคยและได้รับการยอมรับในระดับสากล [21] นอกจากนี้ยังมีการนำโพรไบโอติกส์ไปผสมในไอศกรีม นมผงสูตรสำหรับทารก และอื่นๆ ที่ไม่มีส่วนผสมของนมเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคในกลุ่มที่รับประทานเจและผู้ที่มีอาการแพ้น้ำตาลแลคโตสในนม (Lactose Intolerance) อีกด้วย ซึ่งผลิตภัณฑ์ในกลุ่มที่ไม่มีส่วนผสมของนมได้แก่ น้ำผลไม้ ขนมหวาน และผลิตภัณฑ์จากธัญพืช เป็นต้น [22] อย่างไรก็ตาม การเสริมโพรไบโอติกส์ลงในอาหารไม่ว่าชนิดใด

สิ่งที่ต้องคำนึงถึงเป็นอันดับแรกคือความสามารถในการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ในตัวผลิตภัณฑ์ และเมื่อจุลินทรีย์นั้นเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร การสูญเสียของโพรไบโอติกส์ส่วนใหญ่ก่อนผ่านไปถึงลำไส้ใหญ่จะเกิดขึ้นที่บริเวณกระเพาะอาหาร ซึ่งเป็นส่วนที่มีความเป็นกรดสูงที่สุดในระบบทางเดินอาหาร การศึกษาความสามารถในการทนกรดของ *Lactobacillus* จึงเป็นส่วนสำคัญที่ต้องทำการตรวจสอบก่อนนำสายพันธุ์นั้นๆ มาใช้ในอาหาร เพื่อทราบจำนวนเริ่มต้นที่ควรเติมลงไปในผลิตภัณฑ์ที่จะทำให้เมื่อผู้บริโภคได้รับแล้วจะมีประโยชน์สูงสุดอย่างแท้จริง

บทความนี้จึงเป็นการรวบรวมความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับความสามารถในการทนกรดที่สภาวะต่างๆ และกลไกการเอาตัวรอดของสายพันธุ์ *Lactobacillus* ในสภาวะที่เป็นกรด ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการเลือกใช้สายพันธุ์ที่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ ต่อไป

โพรไบโอติกส์สายพันธุ์ Lactobacillus

จุลินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกส์ที่รู้จักกันดีมีอยู่ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* อย่างไรก็ดียังพบว่ายีสต์บางสายพันธุ์ก็มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกส์ที่ดีสำหรับ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ทั้งสองสายพันธุ์นี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและสามารถผลิตกรดแลคติกได้ ซึ่งรู้จักกันดีในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria) นอกจากนี้ยังเป็นแบคทีเรียที่พบเป็นปกติในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์อีกด้วย [23]

จุลินทรีย์กลุ่ม *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อน ไม่สร้างสปอร์ ต้องการสารอาหารหลากหลายชนิดในการเจริญเติบโต สามารถทนต่อสภาวะที่มีอากาศได้ และสามารถเจริญได้ในที่ไม่มีอากาศ โดยทั่วไปชอบสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดเล็กน้อย และมีความสามารถในการทนและรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรดได้ค่อนข้างดี สายพันธุ์ *Lactobacillus* สามารถพบได้ทั่วไปในที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูง เช่น บริเวณเยื่อเมือก (Mucosal Membrane) ของมนุษย์และสัตว์ ในพืชและผลิตภัณฑ์จากพืช และในอาหารหมักหลายชนิด เช่น นมเปรี้ยว ผลิตภัณฑ์หมักจากเนื้อสัตว์ ผักหมักดอง เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งที่เป็นสาเหตุของการเสียในอาหารหลายชนิด [3]

การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในไซโตพลาสซึมเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะกรด

ในสภาวะปกตินั้นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์หรือในไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) จะมีค่าพีเอชอยู่ค่าหนึ่งซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ในเซลล์ของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ เพื่อให้กระบวนการย่อยสลาย (Catabolism) และกระบวนการสร้าง (Anabolism) ของสารต่างๆ เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ดังนั้นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์โดยทั่วไปจะมีสมบัติเป็นบัฟเฟอร์อยู่ระดับหนึ่ง เพื่อช่วยรักษาระดับพีเอชและการทำงานอื่นๆ ภายในเซลล์ให้เป็นปกติ ในจุลินทรีย์บางสายพันธุ์เช่น *Bacillus* จะสามารถปรับความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ภายในเซลล์ได้หากต้องอยู่ในสภาวะที่มีค่าพีเอชภายนอกเซลล์ต่ำ โดยพบว่าภายในเซลล์จุลินทรีย์มีค่าความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์สูงขึ้นเมื่อค่าพีเอชภายนอกเซลล์ต่ำลง ในขณะที่บางสายพันธุ์ไม่มีความสามารถนี้หรือมีน้อยจึงทำให้ความสามารถในการทนกรดต่ำกว่า [24] อย่างไรก็ตามสำหรับสายพันธุ์ *Lactobacillus* มีการศึกษาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ *Listeria* ในด้านการปรับตัวในสภาวะกรดพบว่า *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* จะปรับตัวด้วยการปล่อยให้พีเอชภายในเซลล์ลดลงไปตามค่าพีเอชภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไป และมีความพยายามที่จะรักษาค่าพีเอชภายในเซลล์ไว้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับ *Listeria innocua* โดย *Listeria* จะมีความพยายามขับเอาโปรตอน (H^+) ออกนอกเซลล์สูงขึ้นเมื่อพีเอชภายนอกเซลล์ต่ำลง [25] ซึ่งการขับโปรตอนออกนอกเซลล์นี้จะต้องใช้พลังงานค่อนข้างสูง [26] จึงเป็นไปได้ว่าการที่ *L. delbruedkii* subsp. *bulgaricus* ไม่เร่งการขับโปรตอนออกเป็นการประหยัดการใช้พลังงานภายในเซลล์ได้เป็นจำนวนมากและทำให้มีพลังงานเพียงพอในการดำเนินกิจกรรมอื่นๆ ภายในเซลล์ นำไปสู่การรอดชีวิตที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ *Listeria Innocua* การที่จุลินทรีย์บางสายพันธุ์จำเป็นต้องเร่งขับโปรตอนออกหากมีโปรตอนผ่านเข้าสู่เซลล์เป็นมากเกินไปเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ภายในเซลล์จะหยุดชะงัก ทำให้เซลล์ไม่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ โดย McDonald และคณะ (1990) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการทนกรดของ *Leuconostoc Mesenteroides* และ *Lactobacillus Plantarum* พบว่าการเจริญเติบโตของ *Leuconostoc* จะหยุดลงเมื่อพีเอชภายในเซลล์ลดต่ำลงถึง 5.4–5.7 ในขณะที่ *L. plantarum* จะหยุดการเจริญเมื่อพีเอชภายใน

เซลล์ต่ำลงถึง 4.6–4.8 จึงเป็นที่แน่ชัดว่าเหตุใดสายพันธุ์ *L. plantarum* มีความสามารถในการทนกรดได้ดี [27] นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์ในตระกูลแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่จะพยายามปรับตัวในสภาวะที่เป็นกรดโดยเลือกวิธีที่ใช้พลังงานหรือ ATP น้อยที่สุด ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้สามารถรอดชีวิตในสภาวะที่เป็นกรดได้นานกว่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ [28]

ปัจจัยสำคัญที่ทำให้การเปลี่ยนแปลงพีเอชภายในเซลล์ของจุลินทรีย์เป็นไปได้เร็วเพียงใดนั้น ได้แก่ ความสามารถของโปรตอนที่จะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อเข้าสู่ภายในเซลล์ เนื่องจากเป็นด่านแรกที่โปรตอนจะผ่านเข้ามาและทำให้พีเอชในเซลล์เปลี่ยนแปลงไป โดยกรดอ่อนบางชนิดที่มีสมบัติไม่รวมตัวกับไขมันจะผ่านเข้าสู่เซลล์ทาง ionophore ได้โดยไม่เปลี่ยนรูปแม้แต่น้อย [29] ดังนั้นจุลินทรีย์บางชนิดเมื่ออยู่ในสภาวะกรดจะปรับตัวโดยเพิ่มระดับของโปรตีนและกลูตาเมทในไซโตพลาสซึมทำให้ของเหลวภายในเซลล์มีความเป็นบัฟเฟอร์มากขึ้นเพื่อป้องกันตัวจากโปรตอนจำนวนมากที่ผ่านเข้าสู่เซลล์ [30]

การทำงานของเอนไซม์ H^+-ATPase และความสามารถในการผ่านเข้าสู่เซลล์ของโปรตอน (H^+)

ในจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Lactobacillus* มีกลไกหลากหลายในการรักษาสมดุลของพีเอชระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งการเคลื่อนย้ายโปรตอนโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ ATPase หรือ H^+-ATPase นั้นเป็นกลไกสำคัญอย่างหนึ่งที่จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการหมักหลายๆ ชนิดใช้ในการควบคุมพีเอชภายในเซลล์ [31, 32] โดยเอนไซม์ดังกล่าวนี้ที่พบใน *L. casei* และ *L. plantarum* จะทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชประมาณ 5.0–5.5 ซึ่งต่ำกว่าพีเอชที่เหมาะสำหรับการทำงานของ H^+-ATPase ที่พบในแบคทีเรียอื่นๆ โดยพบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของ H^+-ATPase ใน *E. coli* และ *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* อยู่ที่ 6.0 และ 7.0 ตามลำดับ [33, 34] ซึ่งความสามารถในการทำงานของ H^+-ATPase จะส่งผลต่อการขนส่งโปรตอนออกจากไซโตพลาสซึม สำหรับค่าพีเอชที่ต่ำที่สุดที่ H^+-ATPase ยังทำงานได้ใน *L. casei* และ *L. plantarum* ตรวจพบที่ 4.0 [35] ซึ่งต่างจากสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนกรดต่ำ เช่น *Actinomyces Viscosus* ที่พบการขับโปรตอนออกจากเซลล์ได้ต่ำสุดอยู่ที่พีเอช 6.0 [36] โดยถ้าพีเอชต่ำกว่านี้ความสามารถในการกำจัดโปรตอนจะเสียไปนอกจากนี้แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* จะยังไม่ปรับตัวต่อค่าพีเอชภายในเซลล์ที่ลดลงหากพีเอชภายในเซลล์ยังไม่ลดลงจนถึงจุดที่จะเริ่มเป็นอันตรายต่อเซลล์ Siegumfeldt และคณะ (2000) ได้ทำการทดลองในสายพันธุ์ *Streptococcus* และ *Lactobacillus* พบว่า *Streptococcus* จะเริ่มปรับตัวทันทีที่อยู่ในสภาวะกรด อธิบายได้จากค่าพีเอชภายในเซลล์ของ *Streptococcus* ที่ยังคงที่อยู่เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 3 นาที หลังจากพีเอชภายนอกเซลล์ต่ำลงอย่างกะทันหัน แสดงถึงการปรับตัว (Homeostasis) ที่เกิดขึ้นในทันทีที่มีโปรตอนเข้าสู่เซลล์ แต่เมื่อเวลาผ่านไปเกือบ 5 นาที ค่าพีเอชภายในเซลล์จะลดลงอย่างรวดเร็วจนใกล้เคียงกับพีเอชภายนอกเซลล์ แสดงถึงความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์ ในทางกลับกันพีเอชภายในเซลล์ของ *Lactobacillus* จะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 2 นาทีแรกแสดงให้เห็นถึงการปล่อยให้โปรตอนเข้าสู่เซลล์อย่างอิสระ แต่เมื่อพีเอชภายในเซลล์ลดลงถึงระดับหนึ่งเซลล์จะเริ่มปรับตัวทำให้พีเอชภายในเซลล์ลดลงอย่างช้าๆ และคงที่ที่ค่าพีเอชสูงกว่าภายนอก [37]

นอกจากการตอบสนองที่พีเอชต่างกันในการขับโปรตอนออกนอกเซลล์แล้วยังพบว่าปริมาณเอนไซม์ H^+-ATPase ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของ *Lactobacillus* มีมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ไม่ทนกรดทั่วๆ ไป เช่น *Actinomyces*

และจุลินทรีย์กลุ่ม *Streptococcus* [38] อย่างไรก็ดีผลจากงานวิจัยในหลายๆ งานสรุปได้ว่า การสังเกตจากค่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของ H^+-ATPase เพียงอย่างเดียวไม่สามารถบอกได้แน่ชัดถึงความสามารถในการทนกรดที่สูงขึ้น เนื่องจากมักพบว่าเอนไซม์ H^+-ATPase ในจุลินทรีย์ที่ทนกรดได้มากกว่าจะมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงค่า พีเอชน้อยกว่า จึงทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่กว้างและทำให้จุลินทรีย์นั้นๆ ทนกรดได้ดีขึ้น [39] และสายพันธุ์ที่สามารถทนกรดได้ดีมากจะตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ H^+-ATPase ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์สูงมากขึ้นตามลำดับ [40] ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงปัจจัยใดๆ ก็ตามที่ส่งผลต่อการทำงานของ H^+-ATPase จะส่งผลต่อความสามารถในการทนกรดของจุลินทรีย์นั้นๆ ด้วย โดยไม่จำเพาะต่อสายพันธุ์ และปัจจัยใดๆ ที่ส่งเสริมการทำงานของ H^+-ATPase จะช่วยเพิ่มความสามารถในการทนกรดของจุลินทรีย์นั้นๆ ด้วย [41] จากการศึกษาทางชีวโมเลกุลสนับสนุนแนวคิดที่ว่ากิจกรรมของ H^+-ATPase มีส่วนสำคัญอย่างยิ่งในการรอดชีวิตของ *Lactobacillus* ในสภาวะที่เป็นกรด ชนิดของ ATPase ที่พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการปรับตัวในสภาวะกรดของ *Lactobacillus* จะเป็นชนิด F_1F_0-ATPase [42-43] โดยใน *L. acidophilus* เป็น H^+-ATPase ที่มีลักษณะเหมือนกับที่พบใน *Steptococcus* ซึ่งเป็นชนิดที่มีหน้าที่เฉพาะในการขับโปรตอนออกนอกเซลล์เพื่อรักษาระดับพีเอชในไซโตพลาสซึมเมื่อเซลล์ต้องอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดและพบโอเปอรอน (Pperon) *atpBEFHAGDE* ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของ H^+-ATPase [44] ซึ่งควบคุมการแสดงออกของหน่วยย่อย (Subunit) $\delta\alpha\gamma\beta\in$ ตามลำดับ โดยจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสไม่ได้เปลี่ยนแปลงแต่อย่างใดเมื่อแบคทีเรียอยู่ในสภาวะพีเอชที่แตกต่างกันตั้งแต่ช่วงพีเอช 5.6 ถึง 3.5 เป็นเวลา 0-45 นาที สำหรับใน *L. plantarum* Lp91 นั้น Chandran และคณะ (2013) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *atpD* ซึ่งควบคุมหน่วยย่อยสำคัญหน่วยหนึ่งในโอเปอรอนของ F_1F_0-ATPase โดยทำการศึกษาในหนู (Invivo) พบว่า ยีน *atpD* มีการแสดงออกมากขึ้น 2.0 2.4 และ 3.2 เท่า หลังจากแบคทีเรียผ่านเข้าสู่กระเพาะอาหารหนูเป็นเวลา 15 30 และ 60 นาที ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ายีนดังกล่าวสามารถใช้ในการจำแนก *Lactobacillus* สายพันธุ์ที่เป็นโพรไบโอติกส์ซึ่งทนกรดในกระเพาะอาหารได้ [45] และผลดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกับ Duary และคณะในปี 2010 ซึ่งทดสอบการแสดงออกของยีน *atpD*ใน *L. plantarum* 2 สายพันธุ์ ได้แก่ Lp9 และ Lp91 พบว่า Lp91 สามารถทนต่อสภาวะกรดที่พีเอช 3.5 และ 2.5 ได้ดีกว่า Lp9 อย่างมีนัยสำคัญ และจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *atpD* พบว่า สายพันธุ์ Lp91 มีการแสดงออกของยีนนี้มากกว่า Lp9 ถึง 4.7 เท่า เมื่ออยู่ในสภาวะพีเอช 2.5 เป็นเวลา 90 นาที [46] นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีน *atpA* ซึ่งควบคุมการสร้างหน่วยย่อย α ของเอนไซม์ H^+-ATPase มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อ *L. rhamnosus* GG อยู่ในสภาวะพีเอช 4.8 ซึ่งจะมีการแสดงออกของยีนนี้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับที่สภาวะพีเอช 5.8 [47] จึงเป็นข้อมูลสนับสนุนว่าหลายๆ หน่วยย่อยของ H^+-ATPase จะถูกสร้างมากขึ้นเมื่อสายพันธุ์ *Lactobacillus* อยู่ในสภาวะที่เป็นกรด อย่างไรก็ดีแต่ละหน่วยย่อยของ H^+-ATPase ใน *Lactobacillus* ต่างสายพันธุ์นั้น แม้จะมีการแสดงออกและหน้าที่เดียวกันแต่มีความแตกต่างกันเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้ความสามารถในการทนกรดของแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันไป [43]

ระบบ Glutamate Decarboxylation

Glutamate Decarboxylation เป็นกระบวนการเปลี่ยนกรดอะมิโนกลูตาเมท (Glutamate) ให้เป็น γ-aminobutyric acid (GABA) โดยการทำงานของเอนไซม์ Glutamate Decarboxylase (GAD) ซึ่งในกระบวนการจะมีการใช้โปรตอนร่วมด้วย เอนไซม์ GAD สามารถพบได้ทั่วไปในเซลล์ยูคาริโอตและโปรคาริโอต แต่จะมีหน้าที่แตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของเซลล์ที่พบ สำหรับในจุลินทรีย์ GAD จะทำหน้าที่สำคัญในการต้านทานสภาวะที่เป็นกรดภายนอกเซลล์ โดยการเปลี่ยนกลูตาเมทซึ่งมีความเป็นกรดให้กลายเป็น GABA ที่มีความเป็นกรดต่ำกว่าเป็นการลดความเป็นกรดในระบบอีกทางหนึ่งนอกเหนือจากการดึงโปรตอนมาใช้ในปฏิกิริยา กระบวนการนี้จะพบได้ในจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ เช่น *E. coli* [48] *Listeria monocytogenes* [49] และพบได้ในแบคทีเรียกรดแลคติกทั่วไป โดยมีงานวิจัยหลายงานได้ทดสอบความสามารถในการต้านทานกรดของสายพันธุ์ *Lactobacillus* ในสภาวะที่มีและไม่มีกลูตาเมทร่วมด้วย และได้ศึกษาพีเอชที่เอนไซม์ GAD ทำงานได้ดีที่สุด พบว่ามีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1 นอกจากนี้การทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในลักษณะที่ยับยั้งการผลิตเอนไซม์ GAD จะทำให้ความสามารถในการทนกรดของแบคทีเรียลดลงอย่างมาก [50]

ตารางที่ 1 ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของ Glutamate decaboxylase ใน *Lactobacillus* สายพันธุ์ต่างๆ

Species	Optimum pH of GAD	Loss activity of GAD	References
L. brevis	4.0 – 5.0	7.0	[51]
L. brevis CGMCC 1306	4.4	5.2	[50]
L. brevis NCL912	4.0	6.5	[52]
L. reuteri	2.5	-	[53]

กลูตาเมทเป็นโมเลกุลของกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็นและเป็นสารที่มีความสำคัญในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เนื่องจากเกี่ยวข้องในกระบวนการเมทาบอลิซึมหลายกระบวนการ เช่น การสังเคราะห์โปรตีน และไกลโคไลซิส (glycolysis) เป็นต้น [54] สำหรับความสำคัญในด้านการทนกรดของจุลินทรีย์กลุ่ม *Lactobacillus* จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ decaboxylation ให้เกิดเป็น GABA ซึ่งทำให้เกิดการใช้โปรตอนและลดความเป็นกรดในไซโตพลาซึมได้ โดยกระบวนการดังกล่าวเริ่มจากการขนส่งกลูตาเมทจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ผ่านทาง glutamate/GABA antiport ซึ่งจะเป็นการแลกเปลี่ยนกลูตาเมทเข้าสู่เซลล์พร้อมกับขนส่ง GABA ออกนอกเซลล์กลูตาเมทที่เข้ามาในเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็น GABA โดยโปรตอน 1 โมเลกุลจะเข้าทำปฏิกิริยาที่บริเวณคาร์บอนที่ตำแหน่งอัลฟ่า (α-canbon) ของหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ในโมเลกุลของกลูตาเมท และทำให้เกิดโมเลกุลของ GABA ขึ้นดังสมการ

$$\text{Glutamate} \xrightarrow{\text{Glutamate decarboxylase}} \text{Gamma-aminobutyrate (GABA)} + CO_2$$

พันธะที่เกิดขึ้นใหม่นี้มีความแข็งแรงมากกว่าพันธะเดิมของกลูตาเมท ทำให้โมเลกุลของ GABA เสถียร จากนั้น GABA ที่เกิดขึ้นจะถูกขับออกนอกเซลล์พร้อมกับการนำกลูตาเมทโมเลกุลใหม่เข้าสู่เซลล์เป็นวัฏจักรต่อไป [55]

ความสามารถในการทนกรดลักษณะนี้จะพบได้ทั่วไปในกลุ่มจุลินทรีย์ก่อโรคและโพรไบโอติกส์ โดยจะเป็นระบบที่ทำให้จุลินทรีย์สามารถรอดผ่านสภาวะที่เป็นกรดสูงในกระเพาะอาหารและผ่านเข้าสู่ลำไส้ได้ [54] กลไกการทำงานของ GAD จะไม่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ของกลูตาเมทและ GABA จากงานวิจัยของ Karatzas (2012) ได้ทดสอบความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ของสารทั้งสอง โดยไตเตรทกับ 10% กรดไฮโดรคลอริก (HCl) พบว่าสารละลายของทั้งกลูตาเมทและ GABA มีพีเอชลดลงเหมือนกันในช่วงแรกจนกระทั่งพีเอชของสารละลายลดลงถึง 3.0 กลูตาเมทจะแสดงความเป็นบัฟเฟอร์ที่ดีกว่าโดยต้องใช้กรดในปริมาณมากกว่าถึง 3 เท่าในการทำให้ค่า พีเอชลดลงจาก 3.0 เป็น 2.0 แต่กระบวนการ decaboxylation จะเกิดได้ดีที่พีเอชประมาณ 4.5 – 3.5 [56] อย่างไรก็ดีแม้จะพบการทำงานของ GAD ในจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ แต่การทำงานของระบบดังกล่าวยังขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมอื่นๆ ที่จุลินทรีย์อาศัยอยู่ด้วย โดยใน *E. coli* จะพบการทำงานของ GAD ในระบบที่มีค่าพีเอชต่ำไม่ว่าจะเป็นระบบอาหารเลี้ยงเชื้อปกติหรือ Minimal Medium [57] แต่ใน *Listeria Monocytogenes* จะพบการทำงานของ GAD เฉพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติและไม่พบการทำงานเมื่อเลี้ยงเชื้อใน minimal medium แม้จะมีการเติมกลูตาเมทร่วมด้วย

ระบบ Deiminase Pathway

Arginine Deiminase Pathway (ADI) เป็นกระบวนการที่พบบ่อยในจุลินทรีย์ *Lactobacillus* โดยจะเกิดปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการแตกของโมเลกุล arginine ได้เป็นแอมโมเนีย (NH_3) และสารประกอบอื่นๆ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ Arginine Deiminase, Ornithine Transcarbamoylase และ Carbamate Kinase โดยมีลำดับขั้นของการเกิดปฏิกิริยา ดังนี้

$$\textbf{L-Arginine} + H_2O \xrightarrow{\text{Arginine Deiminase}} \textbf{Citruline} + NH_3$$

$$\textbf{L-Citruline} + \textbf{Pi} \xrightarrow{\text{Ornithine Transcarbamoylase}} \textbf{L-Ornithine} + \textbf{Carbamyl Phosphate}$$

$$\textbf{Carbamyl Phosphate} + \textbf{ADP} \xrightarrow{\text{Carbamate Kinase}} \textbf{ATP} + CO_2 + NH_3$$

จากสมการเคมีข้างต้นจะเห็นได้ว่า arginine 1 โมเลกุลจะทำให้เกิดแอมโมเนีย 2 โมเลกุล ซึ่งแอมโมเนียมีฤทธิ์เป็นด่าง จึงทำให้กลไกนี้เป็นกลไกสำคัญอันหนึ่งที่จะช่วยในการต้านทานต่อสภาวะกรดของจุลินทรีย์ได้ [58] จากงานวิจัยหลายๆ งานจะพบกระบวนการ ADI ใน *Lactobacillus* หลายสายพันธุ์ เช่น *L. sanfranciscensis*, *L. brevis* AM1, AM8, 10A, *L. hilgradii* 51B และ *L. fructivoran* แต่ใน *L. plantarum* B14 จะพบการทำงานของเอนไซม์เพียง 2 ชนิด โดยไม่พบการทำงานของ Carbamate Kinase [59] ใน *Lactobacillus* ต่างสายพันธุ์จะพบการทำงานของระบบ ADI ที่ต่างกัน โดยมีรายงานว่าในกลุ่ม Homofermentative Lactobacilli ที่แยกได้จากไวน์ จะไม่มีระบบสลาย arginine แต่ในเชื้อกลุ่มเดียวกันที่แยกได้จากส้มกลับพบระบบ ADI [60] และยังพบว่าการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดในระบบ ADI จะขึ้นกับปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ เช่น ปริมาณกลูโคสในระบบ โดยในสภาวะที่มีกลูโคสต่ำเอนไซม์

ทั้ง 3 ชนิดจะทำงานได้เร็วกว่าในสภาวะกลูโคสสูง จากการศึกษาใน *L. reuteri* พบการทำงานของเอนไซม์สูงขึ้นเมื่อมีกลูโคสในระบบต่ำกว่า 0.5% [58] ซึ่งสอดคล้องกับรายงานใน *L. sakei* ที่พบการทำงานของเอนไซม์ได้ดีที่กลูโคสความเข้มข้นต่ำ [61] และใน *L. sanfranciscensis* การทำงานของเอนไซม์จะหยุดลงเมื่อมีกลูโคสในระบบสูงกว่า 54 mM [59] สำหรับปริมาณออกซิเจนนั้นจะพบว่าปริมาณออกซิเจนที่น้อยจะช่วยให้ระบบ ADI เกิดได้ดีขึ้น และใน *Lactobacillus* บางสายพันธุ์ระบบ ADI จะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจนนอกจากนี้ปริมาณ arginine ในสิ่งแวดล้อมยังเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการกระตุ้นระบบ ADI โดยใน *Lactobacillus* ต่างสายพันธุ์จะพบการทำงานของ ADI สูงสุดที่ความเข้มข้นของ Arginine ในระบบแตกต่างกัน [59, 61]

แม้ว่ากระบวนการ ADI จะเป็นวิธีหนึ่งในการปรับตัวของแบคทีเรียให้รอดชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่เป็นกรด แต่จะเริ่มพบการทำงานของ ADI ที่พีเอชต่างกันในแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ จากการศึกษาพบว่าอัตราส่วนสารผลิตภัณฑ์ต่างๆ ในกระบวนการ ADI มีความเข้มข้นแตกต่างกันเมื่อแบคทีเรียอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีค่าพีเอชต่างกัน[62]ดังนั้นจะเห็นได้ว่ากระบวนการ ADI เป็นระบบที่ค่อนข้างมีความซับซ้อนและมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องอยู่มาก ทำให้ระบบ ADI ของ *Lactobacillus* แต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน จึงยังไม่มีข้อสรุปที่แน่นอนเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลกระตุ้นการทำงานของระบบ ADI ทำให้ยังมีการศึกษากลไกการทำงานของระบบ ADI ใน *Lactobacillus* สายพันธุ์ต่างๆ อย่างต่อเนื่อง สำหรับกรดอะมิโนอื่นๆ ที่พบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดแอมโมเนียภายในเซลล์ และช่วยลดความเป็นกรดภายในไซโตพลาสซึมได้เมื่อแบคทีเรียต้องอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นกรด ได้แก่ Aspartate, Leucine, Isoleucine, Valine และ Glutamine เป็นต้น [63, 64]

การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์

เยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียเป็นส่วนสำคัญในการอยู่รอดของจุลินทรีย์ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ โดยเฉพาะสภาวะที่ทำให้เซลล์เกิดความเครียด เช่น อุณหภูมิ แรงดันออสโมติก หรือค่าพีเอชที่ไม่เหมาะสม การที่จุลินทรีย์ต้องอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมจะพบการเปลี่ยนแปลงการสังเคราะห์โปรตีนบางชนิดที่ส่งผลถึงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย [65] กลไกการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวประกอบด้วยการเปลี่ยนอัตราส่วนไขมันอิ่มตัว ความยาวของสายคาร์บอน ตำแหน่งของกิ่งก้าน cis-trans isomerisation และการปรับเปลี่ยนกรดไขมันไม่อิ่มตัวไปเป็นกรดไขมันที่มีไซโคลโพรเพน (Cyclopropane Fatty Acid) เป็นส่วนประกอบในโมเลกุล โดยการทำงานของเอนไซม์ Cyclopropane Fatty Acid (CFA) synthase [66] แม้ว่ายังไม่มีคำอธิบายที่ชัดเจนเกี่ยวกับการทำงานหรือลักษณะทางเคมีกายภาพที่เปลี่ยนแปลงไปของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ประกอบด้วย CFA ปริมาณสูง แต่มีรายงานวิจัยหลายงานยืนยันเป็นที่แน่ชัดว่าการสร้าง CFA เพิ่มขึ้นมีส่วนเกี่ยวข้องในการช่วยให้จุลินทรีย์หลายชนิดรอดชีวิตในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีขึ้น เช่น *E. coli* [67-68] *Samonella* [69] และแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* เป็นต้น จากรายงานของ Gomez และคณะในปี 2000 พบว่าการเพิ่มขึ้นของ CFA ช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์มีเสถียรภาพที่ดีขึ้นในด้านการเป็นเยื่อเลือกผ่าน แต่ยังไม่สามารถอธิบายกลไกได้แน่ชัด [70] อย่างไรก็ดี CFA เป็นสารประกอบที่มีความเสถียรต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีมากกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งพบว่า CFA สามารถต้านทานต่อ Ozonolysis และ Oxidation ที่ไม่รุนแรงมากได้ดี จึงคาดว่าคุณสมบัติทางเคมีของ CFA น่าจะเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยเสริมการรอดชีวิตมากกว่าสมบัติทางฟิสิกส์ [66]

จากการศึกษาในระดับยีนใน *E. coli* พบว่ามีการซึมผ่านของโปรตอนเข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้นและความสามารถในการขับโปรตอนออกนอกเซลล์ในสภาวะกรดลดต่ำลงอย่างมาก เมื่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ CFA ถูกทำลาย [68] สำหรับแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* จะพบการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว รวมถึงปริมาณ CFA ในเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่เป็นกรด โดยใน *L. coryniformis* Si3 จะพบ CFA ชนิด 18:1D9cis เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพาะเลี้ยงที่พีเอช 4.5 [71] และใน *L. casei* จะพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้นและมีความยาวเฉลี่ยของสายคาร์บอนหลักมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของ CFA อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพาะเลี้ยงที่พีเอช 3.5 ซึ่งหากทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในลักษณะที่เพิ่มความสามารถในการสังเคราะห์ CFA จะทำให้เซลล์ทนกรดได้ดีขึ้นอีกด้วย [72] อย่างไรก็ดียังมีข้อขัดแย้งจากการศึกษาของ Broadbent และคณะในปี 2010 ที่ได้ทำการศึกษาใน *L. casei* ATCC334 ที่พีเอช 4.5 กลับพบการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิ่มตัวแทน [73] ในงานวิจัยหลายๆ งานได้ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ CFA ใน *Lactobacillus* และพบว่า ยีน *cfa* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ CFA synthase จะถูกกระตุ้นได้ด้วยค่าพีเอชต่ำๆ จากการศึกษาใน *L. rhamnosus* อธิบายการทำงานของยีนดังกล่าวว่าไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชในระบบสูงกว่า 5.0 [74] นอกจากการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องแล้ว สภาพแวดล้อมอื่นๆ ที่จุลินทรีย์อาศัยอยู่ยังมีส่วนในการสังเคราะห์ CFA เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่เป็นกรด จากการศึกษาใน *L. helveticus* ที่เลี้ยงในอาหารที่มีกรด oleic และ linoleic อยู่มากจะมีผลให้การสังเคราะห์ CFA สูงขึ้นเมื่อเชื้ออยู่ในสภาวะกรด [75] และใน *L. sanfranciscensis* จะสังเคราะห์ CFA ผ่านกระบวนการที่มีออกซิเจนได้ดี ในขณะที่ *L. helveticus* จะใช้กระบวนการที่ไม่มีออกซิเจนได้ดีกว่า ส่งผลให้ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีความสามารถในการทนกรดได้ต่างกันเมื่อปริมาณออกซิเจนในระบบต่างกัน [76]

แม้ยังไม่สามารถอธิบายได้ชัดเจนถึงกระบวนการป้องกันเซลล์ของจุลินทรีย์เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด โดยการสร้าง CFA เพิ่มขึ้นในเยื่อหุ้มเซลล์ แต่อาจอธิบายเพิ่มเติมได้จากรายงานของ Ma และ Marquis (1997) ที่ได้ศึกษาการแพร่ของโปรตอนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ พบว่าการที่จุลินทรีย์มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว 1 ตำแหน่งและมีสายคาร์บอนหลักที่ยาวเป็นส่วนประกอบในเยื่อหุ้มเซลล์อยู่มาก จะช่วยลดการแพร่ของโปรตอนเข้าสู่เซลล์ได้เมื่อเซลล์นั้นอยู่ในสภาวะที่มีความเป็นกรด [77]

สรุป

โพรไบโอติกส์ *Lactobacillus* เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ทนต่อสภาพความเป็นกรดในสิ่งแวดล้อมได้ดี โดยพบว่าความสามารถในการทนกรดมีความแตกต่างกันไปขึ้นกับสายพันธุ์ เนื่องจากระบบที่แบคทีเรียนี้ใช้ตอบสนองต่อสภาวะกรดมีหลายแบบ ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็นระบบที่แบคทีเรียใช้ในเพื่อลดความเป็นกรดในไซโตพลาสซึม ได้แก่ สมบัติความเป็นบัฟเฟอร์ของไซโตพลาสซึมเอง และการพยายามกำจัดโปรตอนออกจากเซลล์โดยเอนไซม์ H^+-ATPase หรือผลิตแอมโมเนียซึ่งเป็นสารที่เป็นด่างมาทำปฏิกิริยากับโปรตอน โดยใช้กระบวนการ Decarboxylation และ Deimination ของกรดอะมิโน นอกจากนี้ยังมีระบบป้องกันการผ่านของโปรตอนเข้าสู่เซลล์โดยเปลี่ยนอัตราส่วนกรดไขมันชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวโดยเพิ่มการผลิต CFA ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งระบบต่างๆ เหล่านี้จะทำงานไม่เหมือนกันใน *Lactobacillus* แต่ละสายพันธุ์ ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ระดับพีเอชในไซโตพลาสซึม ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในระบบ อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจนในระบบ เป็นต้น จะเห็นได้ว่าระบบและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความสามารถ

ในการปรับตัวเพื่อต้านสภาวะที่เป็นกรดค่อนข้างหลากหลาย ทำให้การศึกษากลไกดังกล่าวใน *Lactobacilus* สายพันธุ์ต่างๆ ยังมีอยู่อย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นข้อมูลในการเลือกใช้สายพันธุ์ให้เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์รูปแบบต่างๆ ที่มีเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน

เอกสารอ้างอิง

[1] Sawaminee, Nualkaekul; & Dimitris, Charalampopoulos. (2011, March). Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*. 146: 111-117.

[2] Mershen, Govender; Yahya, E. Choonara; Pradeep, Kumar; Lisa, C. du Toit; Sandy, van Vuuren; & Viness, Pillay. (2014, February). A review of the advancements in probiotic delivery: conventional vs. non-conventional formulations for intestinal flora supplementation. *AAPS PharmSciTech.* 15(1): 29-43.

[3] Michael, de Vrese; & Jrgen, Schrezenmeir. (2008, May). Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotehnology*. 111: 1-66.

[4] Mary, E. Sanders; & Jos, H. in't Veld. (1999). Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76: 293-315.

[5] T., He; M., G. Priebe; Y., Zhong; C., Huang; H., J.M. Harmsem; G., C. Raangs; J.-M., Antoine; G., W. Welling; & R., J. Vonk. (2008). Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subfects. *Journal of Applied Microbiology*. 104: 595-604.

[6] Jingjie, Li; Wen, Zhang; Chuan, Wang; Qian, Yu; Ruirui, Dai; & Xiaofang, Pei. (2012, December). *Lactococcus lactis* expressing food-grade β-galactosidase alleviates lactose intolerance symptoms in post-weaning Balb/c mice. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 96(6): 1499-1506.

[7] Jose, M. Saavedra; Adel, Abi-Hanna; Nancy, Moore; & Robert, H. Yolken. (2004, February). Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 79(2): 261-267.

[8] Catherine, Maidens; Caroline, Childs; Agnieszka, Przemska; Iman, B. Dayel; & Parveen, Yaqoob. (2012, July). Modulation of vaccine response by concomitant probiotic administration. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 75(3): 663-670.

[9] Eileen, F. O'Shea; Paul, D. Cotter; Catherine, Stanton; Paul, Ross; & Colin, Hill. (2012, January). Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. *International Journal of Food Microbiology*. 152: 189-205.

[10] Manoj, Kumar; Ravinder, Nagpal; Vinod, Verma; Ashok, Kumar; Navrinder, Kaur; Rajkumar, Hemalatha; Sanjeen, K. Gautam; & Birbal, Singh. (2012). Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer. *Nutrition Reviews*. 71(1): 23-34.

[11] Diomira, Luongo; Junki, Miyamoto; Paolo, Bergamo; Filomena, Nazzaro; Federico, Baruzzi; Toshihiro, Sashihara; Soichi, Tanabe; & Mauro, Rossi. (2013, December). Differential modulation of innate immunity in vitro by probiotic strains of *Lactobacillus gassei*. *BMC Microbiology*. 13: 298-310.

[12] Martin, L. Cross. (2002, December). Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacillus and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 34: 24-253.

[13] Intan, H. Ismail; Paul, V. Licciardi; & Mimi, L.K. Tang.(2013, April). Probiotic effects in allergic disease. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 49: 709-715.

[14] Esra, Tok; & Belma, Aslim. (2010, March). Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotic. *Microbiology and Immunology*. 54: 257-264.

[15] M., M. Brashears; S., S. Gilliland; & L., M. Buck. (1998, April). Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*. *Journal of Dairy Science*. 81: 2103-2110.

[16] C., P. Selinger; A., Bell; A. Cairn; M., Lockett; S., Sebastian; & N., Haslam. (2013, June). Probiotic VSL#3 prevents antibiotic-associated diarrhea in a double-blind, randomized, placbo-contralled clinical trial. *Journal of Hospital Infection*. 84: 159-165.

[17] Stephen, J. Allen; Kathie, Wareham; Duolao, Wang; Caroline, Bradley; Hayley, Hutchings; Wyn, Harris; Anjan, Dhar; Helga, Brown; Alwyn, Foden; Michael, B. Gravenor; & Dietrich, Mack. (2013, October). Lactobacilli and bifidobacteria in the prevention of antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* diarrhea in older inpatients (PLACIDE): a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet*. 382: 1249-1257.

[18] Dario, Pérez-Conesa; Ginés, López; Pedro, Abellán; & Gaspar, Ros. (2006, November). Bioavailability of calcium, magnesium and phosphorus in rats fed probiotics, prebiotic and symbiotic powder follow-up infant formulas and their effect on physiological and nutritional parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86: 2327-2336.

[19] Takao, Mukai; Tomoko, Asasaka; Eri, Sato; Kenichi, Mori; Mitsuyo, Matsumoto; & Hitoshi Ohori. (2002). Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 32: 105-110.

[20] Daniel, Granato; Gabriel, F. Branco; Filomena, Nazzaro; Adriano, G. Cruz; & José, A. Faria.(2010, May). Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9: 292-302.

[21] M., H.D. Almeida; A., G. Cruz; J., A.F. Faria; M., R.L. Moura; L., M.J. Carvalho; & M., C.J. Freitas. (2009). Effect of the açai pulp on the sensorial attributes of probiotic yoghurts. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*. 4: 41-44.

[22] Claude, P. Champagne; & Nancy J. Gardner. (2008). Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Research International*. 41: 539-543.

[23] David, M. Collins; & Glenn, R. Gibson. (1999, May). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 69(suppl): 1052S-1057S.

[24] Terry, A. Krulwich; Raanan, Agus; Michael, Schneier; & Arthur, A. Guffanti. (1985, February). Buffering capacity of Bacilli that grow at different pH ranges. *Journal of Bacteriology*. 162: 768-772.

[25] Lana, Shabala; Tom, McMeekin; Birgitte, B. Budde; & Henrik, Siegumfeldt. (2006, July). *Listeria innocua* and *Lactobacillus delbrueckii* subp. *bulgaricus* employ different strategies to cope with acid stress. *International Journal of Food Microbiology*. 110: 1-7.

[26] Eilís, O'Sullivan; & Séamus, Condon. (1999, June). Relationship between acid tolerance, cytoplasmic pH, and ATP and H^+-ATPase levels in chemostat cultures of *Lactobacillus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 2287-2293.

[27] L., C. McDonald; H., P. Fleming; & H., M. Hassan. (1990, July). Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(7): 2120-2124.

[28] Steve, Goodwin; & Gregory J. Zeikus. (1987, May). Physiological adaptations of anaerobic bacteria to low pH: metabolic control of proton motive force in *Sarcina ventriculi*. *Journal of Bacteriology.* 169: 2150-2157.

[29] H.K. Hill; K.L. Karem; & J.W. Foster. Molecular responses of microbes to environmental pH stress. in Robert K. Poole. *Advances in Microbiological Physiology.* California: Academic Press.

[30] Ian, R. Booth. (1985, December). Rugulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological Reviews*. 49(4): 359-378.

[31] Robert, W. Hutkins; & Nancy, L. Nannen. (1993, August). pH Homeostasis in Lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. 76(8): 2354-2365.

[32] W., N. Konings; J., S. Lolkema; H., Bolhuis; H., W. van Veen; A., J.M. Poolman; & A., J.M. Driessen. (1997, February). The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 71: 117-128.

[33] Nancy, L. Nannen; & Robert, W. Hutkins. (1991, March). Proton-translocating adenosine triphosphatase activity in lactic acid bacterial. *Journal of Dairy Science*. 74(3): 747-751.

[34] Alan, E. Senior; & John, G. Wise. (1983, June). The proton-ATPase of bacteria and mitochondria. *The Journal of Membrane Biology*. 73: 105-124.

[35] Seok-In, Hong; Yun-Ji Kim; & Yu-Ryang Pyum. (1999, May). Acid tolerance of *Lactobacillus plantarum* from Kimchi. *LWT-Food Science and Technology*. 32(3): 142-148.

[36] Gary, R. Bender; & Robert, E. Marquis. (1987, June). Membrean ATPases and Acid Tolerance of *Actinomyces viscous* and *Lactobacillus casei*. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(9): 2124-2128.

[37] Henrik, Siegumfeldt; Björn, K. Rechinger; & Mogens, Jakobsen. (2000, March). Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(6): 2330-2335.

[38] Gary, R. Bender; Scott, V.W. Sutton; & Robert, E. Marquis. (1986, August). Acid tolerance, proton permeability, and membrane ATPase of oral Streptococci. *Infection and Immunity*. 53(2): 331-338.

[39] Takehiro, Miwa; Hidetake, Esaki; Juzoh, Umemori; & Tsuneo Hino. (1997, June). Activity of H^+-ATPase in ruminal bacteria with special reference to acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(6): 2155-2158.

[40] Xia, Chen; Zhihong, Sun; He, Meng; & Heping Zhang. (2009, May). The acid tolerance association with expression of H^+-ATPase in *Lactobacillus casei*. *International Journal of Dairy Technology*. 62(2): 272-276.

[41] Paul, D. Cotter; & Colin, Hill. (2003, September). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(3): 429-453.

[42] Xia, Chen; Zhihong, Sun; He, Meng; & Heping, Zhang. (2007, September). Molecular cloning and characterization of gamma subunit of H^+-ATPase in *Lactobacillus acidophilus* MG2-9. *Annals of Microbiology*. 57(3): 415-418.

[43] G., L. Lorca; & G., Font de Valdez. (2001, March). Acid tolerance mediated by membrane ATPases in *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnology Letter*. 23: 777-780.

[44] Martin, J. Kullen; & Todd, R. Klaenhammer. (1999, June). Identification of the pH-inducible, proton-translocating F_0F_1-ATPase (atpBEFHAGDC) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: gene structure, cloning and characterization. *Molecular Microbiology*. 33(6):1152-1161.

[45] Archana, Chandran; Raj, Kumar Duary; Sunita Grover; & Virender, Kumar Batish. (2013, November). Relative expression of bacterial and host specific genes associated with probiotic survival and viability in the mice gut fed with *Lactobacillus plantarum* Lp91. *Microbiological Research.* 168: 555-562.

[46] Raj, Kumar Duary; Virendr, Kumar Batish; & Sunita Grover. (2010, June). Expression of the atpD gene in probiotic *Lactobacillus plantarum* strains under in vitro acidic conditions using RT-qPCR. *Research in Microbiology*. 161: 399-405.

[47] Johanna, Koponen; Kati, Laakso; Kerttu, Koskenniemi; Matti, Kankainen; Kirsi, Savijoki;Tuula, A. Nyman; Willem, M. de Vos; Solie, Tynkkynen; Nisse, Kalkkinen; & Peka, Varmanen. (2012 February). Effect of acid stress on protein expression and phosphorylation in *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Proteomic*. 75: 1357-1374.

[48] Heinz, Gut; Eugenia, Pennacchietti; Robert, A. John; Francesco, Bossa; Guido, Capitani; Daniela De Biase; & Markus, G. Grtter. (2006, June). *Escherichia coli* acid resistance: pH-sensing, activation by chloride and autoin-hibition in GadB. *The EMBO Journal*. 25: 2643-2651.

[49] Paul, D. Cotter; Cormac, G.M. Gahan; & Colin, Hill. (2001, April). A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. *Molecular Microbiology*. 40(2): 465-475.

[50] Jun, Huang; Lehe, Mei; Qing, Sheng; Shanjing, Yao; & Dongqiang, Lin. (2007, March). Purification and characterization of glutamate decarboxylase of *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 isolated from fresh milk. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 15(2): 157-161.

[51] Feng, Shi; Yilong, Xie; Junjun, Jiang; Nannan Wang; Yongfu, Li; & Xiaoyuan, Wang. (2014, August). Directed evolution and mutagenesis of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* Lb85 to broaden the range its activity toward a near-neutral pH. *Enzyme and Microbial Technology*. 61-62: 35-43.

[52] Guidong, Huang; Chaobo, Li; & Yusheng, Cao. (2012, March). Effect of sodium L-glutamate on growth and survival of Lactobacillus brevis NCL912 at different acidic pH. *Annals of Microbiology*. 62: 351-355.

[53] Teixeira, J.S., Seeras, A., Sanchez-Maldonado, A.F., Zhang, C., Su, M.S.-W., and Gänzle, M.G. (2014). Glutamine, glutamate, and arginine-based acid resistance in *Lactobacillus reuteri*. *Food Microbiology*. 42: 172-180.

[54] Conor, Feehily; & Kimon-Andreas, G. Karatzas. (2012, January). Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *Journal of Applied Microbiology*. 114: 11-24.

[55] Kimon-Andreas, G. Karatzas; Orla, Brennan; Sinéad, Heavin; John, Morrissey; & Conor, P. O'Byrne. (2010, April). Intracellularaccumulation of high levels of γ-aminobutyrate by *Listeria monocytogenes*10403S in response to low pH: uncoupling of γ-aminobutyrate synthesisfrom efflux in a chemically defined medium. *Applied and Environmental Microbiology*. 76: 3529-3537.

[56] Kimon-Andreas, G. Karatzas; Laura, Suur; & Conor, P. O'Byrne. (2012, May). Characterization of the intracellular glutamate decarboxylase system: analysis of its function, transcription, and role in the acid resistance of various strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(10): 3571-3579.

[57] Marie-Pierre, Castanie-Cornet; & John, W. Foster. (2001, March). *Escherichia coli* acid resistance: cAMP receptor protein and a 20 bp cis-acting sequence control pH and stationary phase expression of the *gad*A and *gad*BC glutamate decarboxylase genes. *Microbiology*. 147: 709-715.

[58] G., Rollan; G., L. Lorca; & F., de Valdez. (2003, June). Arginine catabolism and acid tolerance response in *Lactobacillus reuteri* isolated from sourdough. *Food Microbiology*. 20: 313-319.

[59] Maria, De Angelis; Liberato, Mariotti; Jone, Rossi; Maurizio, Servili; Patrick, F. Fox; Graciela, Rollแn; & Marco, Gobbetti. (2002, December). Arginine catabolism by sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of the arginine deiminase pathway enzymes from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(12): 6193-6201.

[60] M., E. Arena; F., M. Saguir; & M., C. Manca de Nadra. (1999, January). Arginine dihydrolase pathway in *Lactobacillus plantarum* from orange. *International Journal of Food Microbiology*. 47: 203-209.

[61] Marie-Christine, C. Vergès; Manuel, Zuñiga; Françoise, Morel-Deville; Gaspar, Pérez-Martnez; Monique, Zagorec; & S.-Dusko, Ehrlich. (1999, September). Relationships between arginine degradation, pH and survival in *Lactobacillus sakei*. *FEMS Microbiology Letters*. 180: 297-304.

[62] T., Rimaux; G., Vrancken; V., Pothakos; D., Maes; L., de Vuyst; & F., Leroy. (2011). The kinetics of the arginine deiminase pathway in the meat starter culture *Lactobacillus sakei* CTC are pH-dependent. *Food Microbiology*. 28: 597-604.

[63] N., Vermeulen; M., G. Gänzle; & R., F. Vogel. (2007, January). Glutamine deamidation by cereal-associated lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 103: 1197-1205.

[64] Chongde, Wu; Juan, Zhang; Guocheng, Du; & Jiam, Chen. (2013, January). Aspartate protects *Lactobacillus casei* against acid stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97: 4083-4093.

[65] Jeroen, Wouters; Hélène, Frenkiel; Willem, M. de Vos; Oscar, P. Kuipers; & Tjakko, Abee. (2001, November). Cold shock proteins of *Lactobacillus lactis* MG1363 are involved in cryoprotection and in the production of cold-induced proteins. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 5171-5178.

[66] Dannis, W. Grogan; & John, E. Cronan. (1997, December). Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61: 429-441.

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

[68] Lana, Shabala; & Tom, Roos. (2008, April). 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.* 159: 458-461.

[69] Bae, H. Kim; Seungki, Kim; Hyeno, G. Kim; Jin, Lee; In, S. Lee; & Yong, K. Park. (2005, January). The formation of cyclopropane fatty acid in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Microbiology*. 151: 209-218.

[70] Andrea, G. Zavaglia; Edgardo, A. Disalvo; & Graciela, L. De Antoni. (2000, May). Fatty acid composition and freeze-thaw resistance in *Lactobacilli*. *Journal of Dairy Research*. 67: 241-247.

[71] Âsa, Schoug; Janett, Fischer; Hermann, J. Heipieper; Johan, Schnürer; & Sebastian, Hŋkansson. (2008). Impact of fermentation pH and Temperature on freeze-drying survival and membrane lipid composition of *Lactobacillus coryniformis* Si3. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35: 175-181.

[72] Chongde, Wu; Juam, Zhang; Miao, Wang; Guocheng, Du; & Jiam, Chen. (2012, February). *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 39: 1030-1039.

[73] Jeff, R. Broadbent; Rebecca, Larsen; Virginia, Deibel; & James, L. Steele. (2010, May). Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC334 to acid stress. *Journal of Bacteriology.* 192(9): 2445-2458.

[74] Janne, Wallenius; Tuomas, Unksulainen; Kalle, Salonen; Jari, Rautio; & Tero Eerikäinen. 2011. The effect of temperature and pH gradients on *Lactobacillus rhamnosus* gene expression of stress-related genes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 34: 1169-1176.

[75] M.-Elisabetta, Gurezoni; Rosalba, Lanciotti; & P.-Sandro, Cocconcelli. (2001). Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology*. 147: 2255-2264.

[76] Chiara, Montanari; Sylvain, L. Sado Kamdem; Diana, I. Serrazanetti; François-Xavier, Etoa; & M. Elisabetta, Guerzoni. (2010, June). 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*. 27: 493-502.

[77] Y., Ma; & R., E. Marquis. (1997). Thermophysiology of *Streptococcus mutans* and related lactic-acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhek*. 72: 91-100.