

บทความวิชาการ

นมเปรี้ยวคีเฟอร์: เทคโนโลยีชีวภาพจากมุมมองวิทยาการด้านโอมิกส์

Kefir: Biotechnology from “~omics” Perspectives

ศานต์ เศรษฐชัยมงคล^{1, 2, *} และ อัญชิสา กุลทวีสุข¹

Sam Settachaimongkon^{1, 2, *} and Aunchisa Kuntaveesuk¹

Received: August 31, 2017

Accepted: October 6, 2017

บทคัดย่อ

ปัจจุบันได้มีการนำวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีโอมิกส์ (omics sciences and technology) ได้แก่ จีโนมิกส์ (genomics) ทรานสคริปโตมิกส์ (transcriptomics) โปรตีโอมิกส์ (proteomics) และเมตาโบโลมิกส์ (metabolomics) มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยทางด้านการเกษตรและอาหาร (foodomics) รวมทั้งการศึกษาด้านจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์อาหารหมัก (fermented food) ในบทความวิชาการนี้จึงขอเสนอรูปแบบของการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีดังกล่าว เพื่อศึกษาองค์ประกอบและพลวัตของประชากรจุลินทรีย์และชีวโมเลกุลในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวคีเฟอร์ ซึ่งเป็นผลผลิตจากกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์กล้ำเชื้อผสม (mixed culture fermentation) ระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียกรดอะซิติก และยีสต์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เกิดความเข้าใจในลักษณะแบบองค์รวม (holistic approach) ครอบคลุมตั้งแต่ระดับโครงสร้างของสารพันธุกรรมและหน้าที่ของยีนทั้งหมดในจีโนม การแสดงออกของยีน และการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมและความเครียดจากปัจจัยต่างๆ ในระหว่างกระบวนการหมัก ปฏิสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ที่อยู่รวมในระบบอาหารเดียวกัน รวมทั้งกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมเพื่อย่อยสลายสารอาหารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำนมและการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ที่ส่งผลต่อสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี คุณภาพทางประสาทสัมผัส คุณค่าทางโภชนาการ สมบัติเชิงหน้าที่ และความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ ซึ่งก่อให้เกิดการพัฒนาองค์ความรู้ใหม่ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารในยุคหลังการสำรวจจีโนม หรือ “Post Genomic Era” ที่จำเป็นต้องอาศัยการบูรณาการของนักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญระหว่างศาสตร์ในหลากหลายสาขาเข้าด้วยกัน

คำสำคัญ: ผลิตภัณฑ์นม จีโนมิกส์ ทรานสคริปโตมิกส์ โปรตีโอมิกส์ เมตาโบโลมิกส์

1. นมเปรี้ยวคีเฟอร์

คีเฟอร์ หรือ เคเฟอร์ (kefir) หมายถึง นมเปรี้ยว (fermented milk) ชนิดหนึ่ง คาดว่ามีต้นกำเนิดจากบริเวณทางตอนเหนือของเทือกเขาคอเคซัส (Caucasus) ตั้งแต่ในยุค 200 ปีก่อนคริสตกาล [1] มีรากศัพท์มาจากคำ

ในภาษาตุรกี “keyif” หมายถึง “good feeling หรือ ความรู้สึกดี” ซึ่งสื่อความหมายถึงผลในเชิงสุขภาพต่อผู้บริโภค [2] คีเฟอร์เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักน้ำนม เช่น นมวัว นมแพะ (ใช้ในผลิตภัณฑ์ดั้งเดิม) นมแกะ นมควาย นมม้า หรือนมอูฐ [3] โดยกิจกรรม

* Corresponding author e-mail: sam.s@chula.ac.th

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

² ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

ทางเมตาบอลิซึม (metabolic activity) ของแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ *Lactobacillus kefir* แบคทีเรียในสกุล *Leuconostoc*, *Lactococcus* และแบคทีเรียกรดอะซิติกในสกุล *Acetobacter* ร่วมกับยีสต์กลุ่มที่สามารถหมักน้ำตาลแลคโตส ได้แก่ *Kluyveromyces marxianus* และยีสต์กลุ่มที่ไม่สามารถหมักน้ำตาลแลคโตส ได้แก่ *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Saccharomyces exiguus* [4] โดยจุลินทรีย์เชื้อผสมดังกล่าวอาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพา (symbiosis) ในโครงสร้างที่เกิดจากการรวมตัวของชั้นพอลิแซ็กคาไรด์ที่เชื่อมแบคทีเรียสร้างและปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (exopolysaccharide) ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตส (อัตราส่วน 1:1) ร่วมกับโปรตีนเคซีนและไขมันนม เรียกว่า คีเฟอร์ราน (kefiran) [2] ซึ่งทำให้จุลินทรีย์กล้าเชื้อผสม (mixed starter cultures) จับตัวเป็นกลุ่มก้อนลักษณะเป็นเม็ดสีขาว มีความเหนียวและยืดหยุ่น (gelatinous biomass) รูปร่างไม่แน่นอน คล้ายดอกกะหล่ำ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 2 ถึง 30 มิลลิเมตร เรียกว่า เม็ดคีเฟอร์ (kefir grains) [2] (Figure 1)



Figure 1. Physical appearance of fresh kefir grains available in Thai marketplace. Photo taken by Kanokorn Narasawat and Rangsarit Sangrungrawee at Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

คีเฟอร์เริ่มมีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเป็นครั้งแรกช่วงปลายของศตวรรษที่ 19 ในสหภาพโซเวียต [2] ปัจจุบันการผลิตและการบริโภคคีเฟอร์เป็นที่นิยมอย่างมากในกลุ่มประเทศยุโรปตะวันออก เยอรมนี และนอร์เวย์ อีกทั้งมีแนวโน้มการขยายตัวของตลาดอย่างต่อเนื่องไปยังประเทศในทวีปแอฟริกา ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และประเทศในภูมิภาคตะวันออกกลาง [5] กระบวนการผลิตคีเฟอร์ด้วยวิธีดั้งเดิม (traditional method) ทำได้โดยการนำเม็ดคีเฟอร์ (ร้อยละ 2-10) ใส่ในน้ำนมที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อเบื้องต้น บ่มในภาชนะปิดที่อุณหภูมิประมาณ 20-25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นกรองเพื่อแยกเอาเม็ดคีเฟอร์ออก ซึ่งเม็ดคีเฟอร์ดังกล่าวสามารถนำกลับมาใช้หมักซ้ำได้ใหม่ [2] ส่วนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมสมัยใหม่นิยมใช้กระบวนการหมักแบบรัสเซีย (Russian method) หรือแบบยุโรป (European method) และมีการนำกล้าเชื้อผสมพร้อมใช้ (direct-vat-inoculation: DVI culture) ที่ผ่านการคัดเลือกสายพันธุ์และเก็บรักษาในรูปแบบกล้าเชื้อแช่เยือกแข็ง (frozen culture) หรือทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dried culture) มาใช้แทนเม็ดคีเฟอร์ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสม่ำเสมอและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค [2, 6] ซึ่งความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบของกล้าเชื้อ ปริมาณสัดส่วนกล้าเชื้อที่ใช้ต่อน้ำนม ชนิดของน้ำนมที่ใช้เป็นวัตถุดิบและกระบวนการให้ความร้อน ตลอดจนระยะเวลาและสภาวะแวดล้อมในระหว่างกระบวนการหมัก นับเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้คุณภาพทางประสาทสัมผัสของคีเฟอร์ที่ได้มีความแตกต่างกัน [6] โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์จะมีเนื้อสัมผัสเป็นของเหลวข้น สีขาวนวล มีความเป็นกรดและกลิ่นเปรี้ยวจากกระบวนการหมักกรดแลคติก (lactic acid fermentation) และกรดอะซิติก (acetic acid fermentation) ซึ่งเป็นผลจากกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย มีกลิ่นแอลกอฮอล์และความซ่า

* Corresponding author e-mail: sam.s@chula.ac.th

¹ Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

² Omics Sciences and Bioinformatics Center, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

เล็กน้อยจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักโดยกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของยีสต์ (alcoholic fermentation) มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วงระหว่าง 4.2-4.6 มีส่วนประกอบสำคัญโดยประมาณ ได้แก่ น้ำ (ร้อยละ 89.0) ไขมัน (ร้อยละ 0.2-3.5 ขึ้นกับน้ำมันที่ใช้เป็นวัตถุดิบ) โปรตีน (ร้อยละ 3.0) น้ำตาล (ร้อยละ 6.0) และเถ้า (ร้อยละ 0.7) [1] ซึ่งประกอบไปด้วยวิตามินและแร่ธาตุสำคัญที่มีอยู่ในน้ำมัน และมีความเข้มข้นของกรดแลคติก เอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ในช่วงระหว่าง ร้อยละ 0.8-1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ร้อยละ 0.5-2.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และร้อยละ 0.08-0.20 โดยปริมาตรตามลำดับ [1, 2] นอกจากนี้ยังมีสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ให้กลิ่นรส (aroma volatile metabolite) ได้แก่ acetoin, acetaldehyde, diacetyl, acetic acid, propionic acid และ butyric acid เป็นต้น ซึ่งเป็นผลผลิตจากกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์กล้ำเชื้อในระหว่างกระบวนการหมัก [7]

คีเฟอร์ เป็นผลิตภัณฑ์อาหารมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ประกอบไปด้วยสารอาหารหลักจากน้ำมัน ได้แก่ โปรตีน และกรดอะมิโนจำเป็น (lysine, isoleucine, phenylalanine, valine, threonine, methionine และ tryptophan) อีกทั้งยังอุดมไปด้วยแร่ธาตุ (calcium, magnesium, phosphorus และ potassium) และวิตามิน (A, B₁, B₂, B₅, B₆, B₉, B₁₂, C และ K) ที่จำเป็นต่อร่างกาย [1] ซึ่งมีรายงานว่า กิจกรรมการย่อยสลายโปรตีน (proteolytic activity) ของจุลินทรีย์กล้ำเชื้อในระหว่างกระบวนการหมักส่งผลให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid) ในคีเฟอร์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับปริมาณที่พบในน้ำมันวัตถุดิบ [8] อีกทั้งน้ำตาลแลคโตสบางส่วนในน้ำมันจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ β -galactosidase จากจุลินทรีย์ ทำให้ผู้ที่มีภาวะการย่อยแลคโตสผิดปกติ (lactose Intolerance) สามารถบริโภคผลิตภัณฑ์จากนมชนิดนี้ได้ [9] ประเด็นสำคัญอีกประการหนึ่ง คือ

แบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ที่เป็นองค์ประกอบในเมดคีเฟอร์บางสายพันธุ์จัดเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก (probiotics) หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อผู้บริโภคได้รับเข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่เพียงพอจะทำให้เกิดผลที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ [10] เช่น ปรับให้เกิดสภาวะสมดุลในระบบลำไส้ ลดความเสี่ยงในการติดเชื้อจากจุลินทรีย์ก่อโรค อาการท้องเสีย และมะเร็งลำไส้ ลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด ช่วยสร้างเสริมระบบภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย เป็นต้น [1, 11] จากเหตุผลดังกล่าว คีเฟอร์จึงถูกจัดให้เป็นผลิตภัณฑ์ในกลุ่มอาหารเชิงหน้าที่ (functional food) ซึ่งให้ประโยชน์หรือคุณสมบัติอื่นๆ ในด้านการส่งเสริมสุขภาพนอกเหนือจากคุณค่าทางโภชนาการขั้นพื้นฐาน [12] นอกจากนี้ มีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกในเมดคีเฟอร์บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค (bacteriocin) เช่น *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria* spp., *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus* spp. ในอาหารได้ [13] สำหรับในประเทศไทย คีเฟอร์มีชื่อเสียงที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า “นมบัวหิมะ หรือ โยเกิร์ตบัวหิมะ (ทิเบต)” [14, 15] เป็นที่นิยมในกลุ่มผู้บริโภคอาหารเพื่อสุขภาพ พบการผลิตในระดับครัวเรือนหรืออุตสาหกรรมขนาดเล็กในรูปแบบเครื่องต้มเพื่อสุขภาพ อย่างไรก็ตาม ข้อมูลการศึกษาทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับแหล่งที่มาและชนิดของจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในเมดคีเฟอร์ และประโยชน์ในเชิงสุขภาพของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังมีอยู่ค่อนข้างจำกัด [16, 17] คณะผู้เขียนจึงมีความสนใจที่จะนำเสนอข้อมูลเกี่ยวกับการนำเทคโนโลยีสมัยใหม่ทางอณูชีววิทยา (molecular biology) มาประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาผลิตภัณฑ์ดังกล่าว

2. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับเทคโนโลยีโอมิกส์

ศานต์ และมยุรี (2560) อธิบายความหมายเบื้องต้นของวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีโอมิกส์ไว้ดังนี้ “คำว่า “โอมิกส์” (~omics) มีรากศัพท์มาจากคำใน

* Corresponding author e-mail: sam.s@chula.ac.th

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

² ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

ภาษาละติน “~omne” ซึ่งหมายถึง ลักษณะโดยรวม หรือองค์ประกอบทั้งหมด ซึ่งได้ถูกนำมาใช้เป็นคำต่อท้ายในภาษาอังกฤษ (suffix) ของเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาองค์ประกอบโดยรวมของสารชีวโมเลกุล (biomolecule) ตั้งแต่ระดับข้อมูลสารพันธุกรรม (genomics) การแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ (transcriptomics) การสังเคราะห์โปรตีน (proteomics) รวมถึงการวิเคราะห์หาสารเมตาบอไลต์ (metabolomics) ทั้งหมดในสิ่งมีชีวิตหรือระบบชีวภาพ [18] ผลการศึกษาที่ได้จะอยู่ในรูปแบบข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุล (biomolecular profile) ได้แก่ ข้อมูลรหัสพันธุกรรมทั้งหมด (genome) ข้อมูลการแสดงออกหรือ

การถอดรหัสของยีนเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอทั้งหมด (transcriptome) ข้อมูลการสังเคราะห์โปรตีน (proteome) และสารเมตาบอไลต์ทั้งหมด (metabolome) ของสิ่งมีชีวิตหรือระบบชีวภาพชนิดใดชนิดหนึ่ง ภายใต้สภาวะใดสภาวะหนึ่ง ณ ช่วงเวลาใดเวลาหนึ่ง [18] โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เกิดความเข้าใจในกลไกเชิงหน้าที่และอันตรกิริยาระหว่างสารชีวโมเลกุลเหล่านั้น รวมทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลดังกล่าวต่อลักษณะปรากฏ (phenotype) หรือคุณลักษณะเฉพาะ (characteristics) ของสิ่งมีชีวิตหรือระบบชีวภาพนั้นๆ ภายใต้สภาวะที่สนใจในภาพรวม (holistic approach) [19]” [20] (Figure 2)

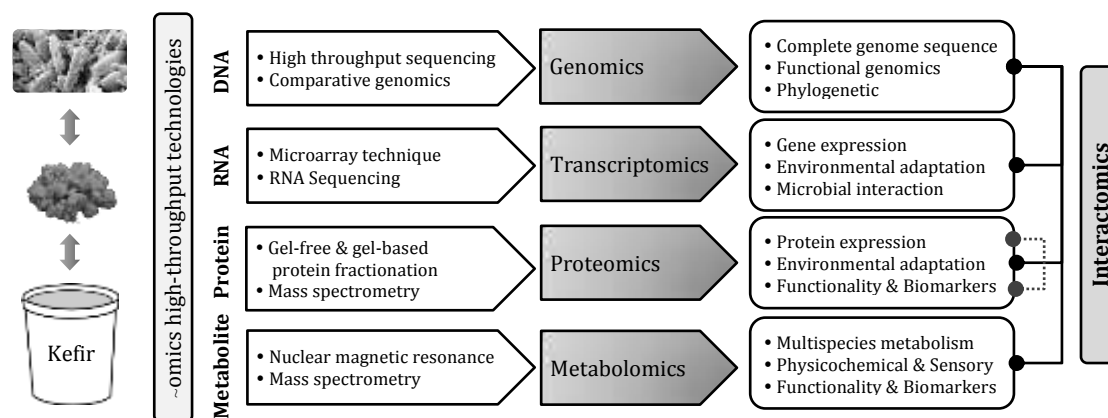


Figure 2. Schematic representation summarizing different ~omics techniques employed for the study of kefir grains and kefir milk targeting different levels of molecular interpretation. Information adapted from Sánchez et al. (2013) [29].

คณะผู้เขียนเดียวกันได้อภิปรายเพิ่มเติมว่า “ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีโอมิกส์มาประยุกต์ใช้ในการวิจัยทางด้านการเกษตรและอาหาร ทำให้เกิดการพัฒนารูปแบบการวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวโมเลกุลของระบบอาหาร เพื่อให้ได้ข้อมูลในลักษณะแบบองค์รวมที่เรียกว่า “foodomics” [21] โดย Cifuentes (2013) ได้ให้คำจำกัดความของ foodomics ว่าหมายถึง การนำเทคโนโลยีโอมิกส์มาประยุกต์ใช้ในการวิจัยด้าน

การเกษตร อาหาร และโภชนาการ เพื่อให้ได้ข้อมูลเชิงลึกที่เป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค ทั้งในเชิงคุณภาพของวัตถุดิบ การเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการแปรรูปและเก็บรักษาอาหาร สมบัติทางโภชนาการและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารอาหาร รวมทั้งระดับการปนเปื้อนของสารพิษและความปลอดภัยของอาหาร [22]” [20]

* Corresponding author e-mail: sam.s@chula.ac.th

¹ Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

² Omics Sciences and Bioinformatics Center, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

สำหรับงานวิจัยด้านผลิตภัณฑ์อาหารหมัก (fermented food) มีการนำเทคโนโลยีโอมิกส์มาประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์และพลวัต (microbial diversity and population dynamics) [23, 24] ปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์ในระบบอาหารหมัก (microbial interaction) [25] การตอบสนองต่อปัจจัยในระบบอาหารที่ทำให้เกิดความเครียดต่อเซลล์ (adaptive stress response) [26] บทบาทและกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมัก การบ่ม และการเก็บรักษา ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงด้านสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี คุณภาพทางประสาทสัมผัส และความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ [23, 27] รวมทั้งผลจากการบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารหมักต่อการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (human gut microbiota) [28, 29] และประโยชน์ในเชิงสุขภาพด้านอื่นๆ ต่อผู้บริโภค [23, 30] ร่วมกับการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวสารสนเทศ (bioinformatics) เพื่อประมวลผลข้อมูลและสามารถใช้ข้อมูลที่ได้สร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (predictive modeling) [31] สำหรับคัดเลือกปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์และทำนายคุณลักษณะที่ต้องการ ทั้งนี้ ผู้อ่านสามารถศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีโอมิกส์ในงานวิจัยด้านผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ได้จากเอกสารอ้างอิงตามที่ระบุไว้ในเนื้อความข้างต้น

3. การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีจีโนมิกส์ในการศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในคีเฟอร์

จีโนมิกส์ (genomics) เป็นการศึกษาข้อมูลสารพันธุกรรมทั้งหมดหรือจีโนมของสิ่งมีชีวิตด้วยเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสขั้นสูง (high-throughput sequencing (HTS) technology) เพื่อให้ทราบถึงองค์ประกอบและโครงสร้างของสารพันธุกรรม ตำแหน่ง และหน้าที่ของยีนทั้งหมดในจีโนม (functional genomics)

เพื่อวิเคราะห์ระบุตำแหน่งของยีนเครื่องหมาย (marker gene) ต่อคุณลักษณะหรือลักษณะปรากฏเฉพาะ (phenotype) รวมถึงการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อม (environmental adaptation) ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetics) และใช้ประกอบการพิสูจน์เอกลักษณ์เพื่อจำแนกชนิด (genetic identification) ของสิ่งมีชีวิต [30] โดยจุลินทรีย์กล้ำเชื้อในผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ได้รับการวิเคราะห์หาลำดับเบสในจีโนมอย่างสมบูรณ์ (complete genome sequencing) เป็นชนิดแรก คือแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 ที่ใช้เป็นกล้ำเชื้อในกระบวนการผลิตเนยแข็ง [32] ซึ่งความก้าวหน้าของเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบส HTS โดยเฉพาะเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสยุคใหม่ (next generation sequencing: NGS) [33] ส่งผลให้งานวิจัยทางด้านจีโนมิกส์มีการพัฒนาไปอย่างรวดเร็ว จนถึงปัจจุบัน (สิงหาคม 2560) ในระบบฐานข้อมูลออนไลน์ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ของประเทศสหรัฐอเมริกา มีรายงานจำนวนจีโนมสมบูรณ์ของจุลินทรีย์ (microbial complete genome sequence) ทั้งชนิดโปรคาริโอตและยูคาริโอตรวมกันทั้งสิ้น มากกว่า 8,000 รายการ (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/microbes/) รวมทั้ง *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 ที่แยกได้จากเมดคีเฟอร์ของประเทศทิเบต [34]

อย่างไรก็ตาม จีโนมิกส์เป็นการวิเคราะห์ข้อมูลสารพันธุกรรมในจีโนมของเซลล์หนึ่งเซลล์หรือสิ่งมีชีวิตหนึ่งชนิดเท่านั้น จึงยังไม่ครอบคลุมจุลินทรีย์อีกเป็นจำนวนมากในระบบธรรมชาติที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ (unculturable microorganism) [35] ดังนั้น จึงมีการพัฒนาเทคโนโลยีเมตาจีโนมิกส์ (metagenomics; meta = beyond) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ข้อมูลจีโนมของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เป็นสมาชิกในหนึ่งกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ (microbial community) โดยวิธีการสกัดสารพันธุกรรมออกมาจากตัวอย่างที่ต้องการศึกษาโดยตรง ซึ่งไม่ต้องผ่านกระบวนการคัดแยก

* Corresponding author e-mail: sam.s@chula.ac.th

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

² ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

(isolation) และเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture independent method) [35] ผลการวิเคราะห์ที่ได้จะอยู่ในรูปแบบข้อมูลชนิด (taxonomic composition) และปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) ของจีโนมจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างจากระบบธรรมชาติหรือสิ่งแวดล้อมดังกล่าว เรียกว่า ไมโครไบโอม (microbiome) [36] ทั้งนี้ มีการนำเทคโนโลยีดังกล่าวมาประยุกต์ใช้เพื่อศึกษานิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ (microbial ecology) ในระบบอาหารหมัก รวมทั้งจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุให้อาหารเสื่อมเสีย (microbial food spoilage) ทำให้ได้ข้อมูลเชิงลึกเพื่อพัฒนาองค์ความรู้เกี่ยวกับความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์และพลวัตในระบบอาหารดังกล่าว [24, 36]

ปัจจุบันมีรายงานผลการศึกษาความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียและยีสต์ที่เป็นองค์ประกอบในเม็ตคิเฟอร์และผลิตภัณฑ์คิเฟอร์โดยใช้เทคโนโลยีจีโนมิกส์เผยแพร่ในวารสารวิชาการอย่างต่อเนื่อง (Table 1) ผู้เขียนจึงขอนำงานวิจัยที่มีมุมมองในการศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในคิเฟอร์ที่แตกต่างกันมาสรุปเป็นตัวอย่างไว้ ณ ที่นี้

Chen และคณะ (2008) Kesmen และคณะ (2011) Leite และคณะ (2012) และ Garofalo และคณะ (2015) ศึกษาความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียและยีสต์ในเม็ตคิเฟอร์และคิเฟอร์จากประเทศไต้หวัน ตุรกี บราซิล และอิตาลี ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบระหว่างจำนวนสายพันธุ์แบคทีเรียและยีสต์ที่สามารถระบุได้จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค culture-dependent ได้แก่ การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (media-based isolation) และระบุชนิด (identification) โดยอาศัยการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) และ culture-independent method ได้แก่ polymerase chain reaction-based denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) และ pyrosequencing ซึ่งคณะผู้วิจัยได้อภิปรายและนำเสนอข้อมูลที่แสดงถึงข้อได้เปรียบและข้อจำกัดของวิธีการทั้งสองแบบ โดยเฉพาะ

เทคนิค culture-independent method ซึ่งก่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการศึกษาด้านอนุกรมวิธานและความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในคิเฟอร์ [37-40]

Dobson และคณะ (2011) ศึกษาความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในเม็ตคิเฟอร์ และ คิเฟอร์จากประเทศไอร์แลนด์ด้วยเทคนิค HTS โดยคณะผู้วิจัยพบความแตกต่างระหว่างสัดส่วนของแบคทีเรียในตระกูล *Firmicutes* ที่ตรวจพบในเม็ตคิเฟอร์และคิเฟอร์ ณ ช่วงระยะอายุการหมักเดียวกัน นอกจากนี้ยังรายงานความแตกต่างของประชากรจุลินทรีย์ระหว่างบริเวณภายในและพื้นผิวภายนอกของกลุ่มก้อนเม็ตคิเฟอร์อย่างชัดเจน [41]

Gao และคณะ (2013) ศึกษาข้อมูลเมตาจีโนมของแบคทีเรียในเม็ตคิเฟอร์ด้วยเทคนิค HTS โดยคณะผู้วิจัยพบว่าแบคทีเรียกลุ่มหลักที่ตรวจพบได้จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus*, *Lactococcus* และ *Acetobacter* และยังรายงานการตรวจพบแบคทีเรียในสกุล *Shewanella*, *Acinetobacter*, *Pelomonas*, *Dysgonomonas*, *Weissella* และ *Pseudomonas* เป็นครั้งแรกในเม็ตคิเฟอร์จากประเทศทิเบต [42]

Marsh และคณะ (2013) นำเทคนิค HTS มาประยุกต์ใช้เป็นครั้งแรกในการศึกษาความหลากหลายของประชากรยีสต์ในเม็ตคิเฟอร์ โดยผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเชื้อในสกุล *Kazachstania*, *Kluyveromyces* และ *Naumovozyma* เป็นกลุ่มประชากรยีสต์หลักในเม็ตคิเฟอร์จากประเทศไอร์แลนด์ [43]

Nalbantoglu และคณะ (2014) นำเทคนิค whole genome shotgun sequencing (WGS) มาประยุกต์ใช้เป็นครั้งแรกในการศึกษาข้อมูลเมตาจีโนมของแบคทีเรียในเม็ตคิเฟอร์จากประเทศตุรกี โดยพบว่าเชื้อในสกุล *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* และ *Leuconostoc* เป็นกลุ่มประชากรแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดหลัก อีกทั้งนำเสนอผลการวิเคราะห์เพื่อระบุหน้าที่ (functional annotation) ของลำดับโปรตีนที่ประมาณการได้จาก

* Corresponding author e-mail: sam.s@chula.ac.th

¹ Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

² Omics Sciences and Bioinformatics Center, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

การวิเคราะห์เมตาจีโนมดังกล่าว (predicted protein sequences) [44]

Zamberi และคณะ (2016) ศึกษาข้อมูลเมตาจีโนมของแบคทีเรียในเมดคีเฟอร์จากประเทศมาเลเซียด้วยเทคนิค NGS (MiSeq) และเปรียบเทียบวิธีการประมวลผลข้อมูลที่ได้ด้วยชุดคำสั่งทางชีวสารสนเทศที่ใช้อัลกอริทึม (algorithm) แตกต่างกันเพื่อสร้าง taxonomic tree นอกจากนี้ยังตรวจพบแบคทีเรียในสกุล *Bacteroides* ซึ่งไม่เคยมีรายงานการศึกษาพบมาก่อนในเมดคีเฟอร์ โดยคณะผู้วิจัยอภิปรายถึงประสิทธิภาพของการประยุกต์ใช้เทคโนโลยี NGS ในการศึกษาประชากร

จุลินทรีย์ที่มีอยู่ปริมาณน้อยมากในระบบ ซึ่งไม่สามารถตรวจพบได้ด้วย culture-independent method แบบอื่น [45]

Kalamaki และ Angelidis (2017) รายงานว่านอกจากเชื้อในสกุล *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Kazachstania* และ *Candida* ซึ่งเป็นกลุ่มประชากรยีสต์หลักในเมดคีเฟอร์และคีเฟอร์จากประเทศกรีซแล้ว คณะผู้วิจัยสามารถตรวจพบเชื้อ *Pichia membranifaciens* และ *Candida zeylanoides* ด้วยเทคนิค HTS ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาพบในคีเฟอร์มาก่อน [46]

Table 1. Metagenome analysis of microbiota present in kefir grains and kefir milk.

Analytical technique	Type of sample	Microbiota	Reference
Pyrosequencing analysis	Kefir grains (interior)	Families: <i>Bacteroidaceae</i> , <i>Bifidobacteriaceae</i> , <i>Clostridiaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Leuconostocaceae</i> , <i>Pasteurellaceae</i> , <i>Pseudomonadaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i>	[41]
	Kefir grains (exterior)	Families: <i>Bifidobacteriaceae</i> , <i>Clostridiaceae</i> , <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Pasteurellaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i>	
	Kefir milk:	Families: <i>Alcaligenaceae</i> , <i>Bacteroidaceae</i> , <i>Bifidobacteriaceae</i> , <i>Clostridiaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Leuconostocaceae</i> , <i>Proteobacteria</i> , <i>Pseudomonadaceae</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i>	[40]
	Kefir grains	Families (Genera): <i>Acetobacteraceae</i> (<i>Acetobacter</i>), <i>Bifidobacteriaceae</i> (<i>Bifidobacterium</i>), <i>Lactobacillaceae</i> (<i>Lactobacillus</i>), <i>Leuconostocaceae</i> (<i>Leuconostoc</i>), <i>Pseudomonadaceae</i> (<i>Pseudomonas</i>), <i>Solirubrobacteraceae</i> (<i>Solirubrobacter</i>), <i>Streptococcaceae</i> (<i>Streptococcus</i> , <i>Lactococcus</i>)	
	Kefir grains	Bacteria Families: <i>Acetobacteraceae</i> , <i>Bacteroidaceae</i> , <i>Bifidobacteriaceae</i> , <i>Clostridiaceae</i> , <i>Enterococcaceae</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Leuconostocaceae</i> , <i>Propionibacteriaceae</i> , <i>Rikenellaceae</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i> Fungi Families: <i>Bondarzewiaceae</i> , <i>Davidiellaceae</i> , <i>Debaryomycetaceae</i> , <i>Dermataceae</i> , <i>Dothioraceae</i> , <i>Ganodermataceae</i> , <i>Herpotrichiellaceae</i> , <i>Malasseziaceae</i> , <i>Pezizaceae</i> , <i>Phaffomycetaceae</i> , <i>Saccharomycetaceae</i> , <i>Teratosphaeriaceae</i> , <i>Tremellomycetes</i> , <i>Tricholomataceae</i> , <i>Valsaceae</i>	[43]

* Corresponding author e-mail: sam.s@chula.ac.th

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

² ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

Table 1 (Cont.)

Analytical technique	Type of sample	Microbiota	Reference
Pyrosequencing analysis	Kefir milk	Bacteria Families: <i>Acetobacteraceae</i> , <i>Propionibacterineae</i> , <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Leuconostocaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i> Fungi Families: <i>Bondarzewiaceae</i> , <i>Davidiellaceae</i> , <i>Debaryomycetaceae</i> , <i>Dermataceae</i> , <i>Herpotrichiellaceae</i> , <i>Ganodermataceae</i> , <i>Malasseziaceae</i> , <i>Pezizaceae</i> , <i>Phaffomycetaceae</i> , <i>Pichiaceae</i> , <i>Saccharomycetaceae</i> , <i>Teratosphaeriaceae</i> , <i>Tremellomycetes</i> , <i>Tricholomataceae</i> , <i>Valsaceae</i> , <i>Wallemiomycetes</i>	[43]
	Kefir grains	Whole genome sequencing Families (Genera): <i>Enterococcaceae</i> (<i>Tetragenococcus</i>), <i>Lactobacillaceae</i> (<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i>), <i>Leuconostocaceae</i> (<i>Oenococcus</i> , <i>Leuconostoc</i>), <i>Streptococcaceae</i> (<i>Lactococcus</i>) 16S rRNA gene Families (Genera): <i>Enterococcaceae</i> (<i>Tetragenococcus</i>), <i>Lactobacillaceae</i> (<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i>)	[44]
	Kefir grains	Bacteria Genera: <i>Acetobacter</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Streptococcus</i> Fungi Genera: <i>Dekkera</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Kazachstania</i> , <i>Saccharomyces</i>	[39]
	Kefir grains	Genera: <i>Acetobacter</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Dysgonomonas</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pelomonas</i> , <i>Pseudomona</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Weissella</i>	[42]
Illumina sequencing analysis	Kefir grains	Bacteria Families: <i>Acetobacteraceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Enterococcaceae</i> , <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Moraxellaceae</i> , <i>Pseudomonadaceae</i> , <i>Streptococcaceae</i> Fungi Families: <i>Dipodascaceae</i> , <i>Malasseziaceae</i> , <i>Mucoraceae</i> , <i>Pichiaceae</i> , <i>Saccharomycetaceae</i> , <i>Trichosporonaceae</i>	[7]

4. การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ในการศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์ในคีเฟอร์

ทรานสคริปโตมิกส์ (transcriptomics) เป็นการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ (RNA) ทั้งหมดหรือทรานสคริปโตม ได้แก่ mRNA rRNA tRNA รวมทั้ง non-coding RNA ของสิ่งมีชีวิตหรือ

ระบบชีวภาพชนิดใดชนิดหนึ่ง ซึ่งตอบสนองต่อสภาวะใดสภาวะหนึ่ง ณ ช่วงเวลาใดเวลาหนึ่ง [47] โดยอาศัยความก้าวหน้าของเทคโนโลยีไมโครแอเรย์ (microarray) และ NGS ในรูปแบบของ RNA sequencing (RNA-seq) [47] ปัจจุบันมีการนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านจุลชีววิทยาทางอาหาร เพื่อให้ทราบถึงการตอบสนอง

* Corresponding author e-mail: sam.s@chula.ac.th

¹ Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

² Omics Sciences and Bioinformatics Center, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

ของจุลินทรีย์ต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมและความเครียดจากปัจจัยต่างๆ ภายนอกเซลล์ (environmental stress) ในระหว่างกระบวนการแปรรูปและเก็บรักษาอาหาร ปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบอาหารเดียวกัน เช่น การแข่งขัน (competition) หรือภาวะพึ่งพา (symbiosis) ปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์กับเจ้าบ้าน (host-microbe interaction) ทั้งในรูปแบบของเชื้อก่อโรคและโพรไบโอติก สามารถในการรวมกลุ่มเซลล์เกิดเป็นฟิล์มชีวภาพ (biofilm formation) และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรค (pathogenicity) เป็นต้น [27, 30]

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีทรานสคริปโตมิกส์ในผลิตภัณฑ์กลุ่มนมหมักยังมีจำนวนไม่มากนัก เช่น ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์เชิงบวก (proto-cooperation) ระหว่างจุลินทรีย์กล้าเชื้อในระหว่างกระบวนการหมักโยเกิร์ต [48, 49] กระบวนการผลิตและบ่มเนยแข็ง [50-52] และศึกษาการแสดงออกของยีนในจุลินทรีย์โพรไบโอติก ภายใต้ภาวะที่เซลล์ต้องเผชิญกับความเครียดในระหว่างกระบวนการหมัก [26]

สำหรับคีเฟอร์ Mendes และคณะ (2013) รายงานผลการศึกษาคู่มือทรานสคริปโตมของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นตัวแทนแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ในกระบวนการหมักคีเฟอร์ โดยศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดในระบบการหมักที่ปราศจากออกซิเจนและมีน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยพบว่าจุลินทรีย์ทั้งสองมีการแสดงออกของยีนเพื่อสร้างปฏิสัมพันธ์ในลักษณะพึ่งพาต่อกัน เพื่อใช้ประโยชน์จากความสามารถในการไฮโดรไลซ์น้ำตาลแลคโตสของ *L. bulgaricus* และการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ของ *S. cerevisiae* ในทางตรงข้าม พบค่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ lipid

metabolism เพิ่มขึ้นใน *L. bulgaricus* ซึ่งคณะผู้วิจัยอธิบายว่าน่าจะสัมพันธ์กับภาวะการแข่งขันเพื่อแย่งกรดไขมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรืออาจจะเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของเซลล์แบคทีเรียต่อความเครียดจากเอทานอลที่ยีสต์สร้างขึ้น [53]

Serafini และคณะ (2014) รายงานผลการศึกษาคู่มือทรานสคริปโตมของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 เมื่อเจริญร่วมกับจุลินทรีย์เมดคีเฟอร์และเมื่อมีการเติมคีเฟอร์านในระบบการหมัก โดยพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับ glycan metabolism และกระบวนการสร้าง pili ของ *B. bifidum* PRL2010 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ซึ่งน่าจะส่งเสริมความสามารถในการเมตาบอไลซ์คีเฟอร์านเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ และเพิ่มประสิทธิภาพในการยึดติดเยื่อผนังลำไส้โฮสต์ของแบคทีเรียดังกล่าว [54]

5. การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีโปรตีโอมิกส์ในการศึกษาโปรตีนในคีเฟอร์

โปรตีโอมิกส์ (proteomics) เป็นการศึกษาข้อมูลการสังเคราะห์โปรตีนทั้งหมดหรือโปรตีโอมของสิ่งมีชีวิตหรือระบบชีวภาพชนิดใดชนิดหนึ่ง ภายใต้สภาวะใดสภาวะหนึ่งซึ่งเป็นผลจากการแสดงออกของยีน (gene expression) [55] โดยครอบคลุมการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบเพื่อระบุโครงสร้างและจำแนกชนิดของโปรตีนและเปปไทด์ (peptide) การศึกษาหน้าที่และสมบัติของโปรตีน (functional analysis) การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนด้วยกัน (protein-protein interaction) และการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อตอบสนองต่อสภาวะที่แตกต่างกัน (protein synthesis) [55] โดยความก้าวหน้าของเทคโนโลยีการแยกส่วนประกอบ (fractionation) และการวิเคราะห์เพื่อระบุชนิด (identification) ของโปรตีนในปัจจุบัน เช่น two-dimensional electrophoresis (2-DE), matrix-assisted laser desorption/ionization time-

* Corresponding author e-mail: sam.s@chula.ac.th

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

² ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

of-flight mass spectroscopy (MALDI-TOF-MS), ultraperformance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-MS/MS) และ liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ส่งผลให้งานวิจัยด้านโปรตีโอมิกส์มีการพัฒนาไปอย่างรวดเร็ว [56]

ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีโปรตีโอมิกส์มาประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาข้อมูลแบบแผนการสังเคราะห์โปรตีนของจุลินทรีย์กล้าเชื้อและโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์กลุ่มนมหมัก เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต คีเฟอร์ และเนยแข็ง [57] โดยการเปลี่ยนแปลงรูปแบบและปริมาณของโปรตีน เช่น โปรตีนนำส่งสารเข้าออกจากเซลล์ (transport protein) เอนไซม์ (enzyme) และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีเมตาบอลิซึม (metabolic protein) ทำให้ทราบถึงกลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ต่อความเครียดและการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมในระหว่างกระบวนการหมักและเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับสมบัติเชิงหน้าที่การสร้างสารพิษและความปลอดภัยของจุลินทรีย์ [56, 58] รวมทั้งขยายขอบเขตการศึกษาไปในกลุ่มเปปไทด์ (peptidomics) ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial peptide) และเปปไทด์สายสั้นที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive peptide) ซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมของจุลินทรีย์ดังกล่าว [59, 60]

Yang และคณะ (2014) ศึกษาข้อมูลโปรตีโอมของตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมหมักซึ่งเชื่อว่าเป็นคีเฟอร์และเนยแข็งชนิดอ่อนที่ขุดพบในหลุมฝังศพโบราณในช่วงยุคสำริดตอนต้น (early bronze age) (1440-1615 ปีก่อนคริสตกาล) ของพระจักรพรรดิเซี่ยวเหอ (Xiaohe) ในประเทศจีน โดยคณะผู้วิจัยรายงานการวิเคราะห์พบข้อมูลโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบจากน้ำนมโคและแพะในตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมหมัก อีกทั้งสามารถตรวจพบโปรตีนจำเพาะต่อเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์ และราเส้นใย เพื่อนำมาใช้ทำนายระบุชนิดและประเมิน

ความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในช่วงเวลาดังกล่าวได้ การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีโปรตีโอมิกส์ในงานวิจัยนี้นับเป็นก้าวสำคัญในการศึกษาบรรพชีวิน (microbial paleontology) และวิวัฒนาการของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก [61]

Ebner และคณะ (2015) เปรียบเทียบข้อมูลโปรตีนสายสั้นและเปปไทด์ (peptide profile) ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนมในระหว่างกระบวนการหมัก โดยกิจกรรมของจุลินทรีย์เมดคีเฟอร์และกล้าเชื้อพร้อมใช้ คณะผู้วิจัยพบว่าเปปไทด์จำนวน 236 ชนิด ที่พบได้เฉพาะในผลิตภัณฑ์นมที่ผ่านกระบวนการหมักแล้วเท่านั้น ซึ่งเป็นเปปไทด์อนุพันธ์ของ β -, α_{S1} -, κ - และ α_{S2} -casein ตามลำดับ อีกทั้งรูปแบบชนิดและปริมาณของเปปไทด์ที่ได้มีความจำเพาะต่อประเภทของกล้าเชื้อที่ใช้ โดยพบว่าจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในกล้าเชื้อพร้อมใช้มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนได้ดีกว่าจุลินทรีย์เมดคีเฟอร์ นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยรายงานว่เปปไทด์จำนวน 16 ชนิด ที่ตรวจพบในงานวิจัยนี้มีสมบัติการเป็น bioactive peptide [62] ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dallas และคณะ (2016) ที่รายงานการพบ bioactive peptide จำนวน 25 ชนิด ที่เกิดจากกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนของแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* ระหว่างกระบวนการหมักคีเฟอร์ [63]

Chen และคณะ (2017) ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน (protein expression) ใน *Lactobacillus kefirifaciens* M1 ที่แยกได้จากเมดคีเฟอร์ของประเทศไต้หวัน โดยพิจารณาการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการปกป้องเซลล์และตอบสนองต่อความเครียดจากอนุมูลอิสระ สภาวะความเป็นกรด และเกลือแร่ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (*in vitro*) โดยคณะผู้วิจัยพบว่าโปรตีน 27 ชนิด ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต การรักษาสมดุลกรดเบส (pH homeostasis) โปรตีนตอบสนองต่อความเครียด

* Corresponding author e-mail: sam.s@chula.ac.th

¹ Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

² Omics Sciences and Bioinformatics Center, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

ในกลุ่ม chaperones และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแปลรหัส mRNA (translation) มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นในเซลล์แบคทีเรียได้รับความเครียดดังกล่าว [64]

Cavallero และคณะ (2017) รายงานผลการศึกษาโครงสร้างของ S-layer glycoprotein ในชั้น cell envelope ของ *Lactobacillus kefir* ด้วยเทคโนโลยีโปรตีโอมิกส์ ซึ่งถือเป็นครั้งแรกที่สามารถอธิบายคุณลักษณะทางชีวโมเลกุลของ N-glycan และการเกิด protein glycosylation ของโครงสร้างดังกล่าวของแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* โดยนับเป็นข้อมูลสำคัญที่ช่วยพัฒนาองค์ความรู้เกี่ยวกับหน้าที่ทางชีวภาพ (biological function) ของโครงสร้างดังกล่าว ซึ่งมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์แบบพึ่งพาระหว่างเซลล์แบคทีเรีย *Lactobacillus* และยีสต์ในระบบนิเวศน์การหมักคีเฟอร์ ความสามารถในการต่อต้าน (antagonism) เซลล์ของจุลินทรีย์ก่อโรค ประสิทธิภาพในการยึดติดเยื่อผนังลำไส้โฮสต์ และสมบัติการเป็นไพรไบโอติกของแบคทีเรียดังกล่าว [65]

Liu และคณะ (2017) ติดตามการเปลี่ยนแปลงของข้อมูล bioactive peptide ที่เป็นองค์ประกอบในคีเฟอร์ เมื่อทดสอบในระบบจำลองการย่อยอาหารที่ตำแหน่งช่องปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กของมนุษย์ (simulated human gastrointestinal model) โดยคณะผู้วิจัยรายงานว่าการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนและน้ำดีในระบบจำลองดังกล่าว ส่งผลให้จำนวน bioactive peptide ที่เป็นอนุพันธ์จากการย่อยสลายเคซีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งจาก β -casein ในคีเฟอร์มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งน่าจะส่งผลในเชิงประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค [66]

6. การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ในการศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีในคีเฟอร์

ศานต์ และมยุรี (2560) อธิบายความหมายเบื้องต้นของเมตาโบโลมิกส์ไว้ว่า คือ “การศึกษาสารชีว

โมเลกุลขนาดเล็ก (โดยทั่วไปมีขนาดต่ำกว่า 1.5 กิโลดาลตัน) [67] เช่น กรดนิวคลีอิก นิวคลีโอไทด์ กรดอะมิโน เพปไทด์ สายสั้น กรดไขมัน น้ำตาล โอลิโกแซคคาไรด์ วิตามิน สารประกอบแอลกอฮอล์ สารประกอบคาร์บอนิล กรดอินทรีย์ สารประกอบซัลเฟอร์ สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ฯลฯ ที่สังเคราะห์โดยสิ่งมีชีวิตหรือเป็นองค์ประกอบของระบบชีวภาพชนิดใดชนิดหนึ่ง [68] โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมข้อมูลชนิดและปริมาณของสารเมตาบอไลต์ทั้งหมด หรือ เมตาโบโลม ทั้งสารที่สังเคราะห์อยู่ภายในเซลล์และสารที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งเป็นผลผลิตจากวิถีเมตาบอลิซึม (metabolic pathway) ของระบบชีวภาพนั้นๆ โดยเป็นผลมาจากการแสดงออกทางพันธุกรรมร่วมกับการปรับตัวเพื่อตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อม [69]” [20] และได้อภิปรายการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีดังกล่าว ในการศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมไว้อย่างละเอียดในบทความวิชาการก่อนหน้านี้ [20]

สำหรับคีเฟอร์ Hu และคณะ (2014) เปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายทั้งหมด (volatile metabolite profile) โดยเรียกว่า “volatome” ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวที่มีการเติมจุลินทรีย์ไพรไบโอติก โยเกิร์ต คีเฟอร์ และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* บริสุทธิ์ โดยคณะผู้วิจัยพบว่าข้อมูล volatome ของสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มเอสเทอร์ (esters) ที่เกิดจากกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของยีสต์ ได้แก่ isopentyl acetate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, phenethyl acetate และ ethyl decanoate ในคีเฟอร์และอาหารเหลวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* มีความคล้ายคลึงกัน และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลิตภัณฑ์นมหมักชนิดอื่นที่ไม่มียีสต์เป็นองค์ประกอบในประชากรจุลินทรีย์กล้าเชื้อ [70] ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Irigoyen และคณะ (2012) ที่รายงานว่าข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย

* Corresponding author e-mail: sam.s@chula.ac.th

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

² ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

ทั้งหมดที่ตรวจพบในคีเฟอร์ โดยเฉพาะสารประกอบในกลุ่ม amyl alcohol, ester และ free fatty acid มีความซับซ้อนมากกว่าผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวและโยเกิร์ต [71] ซึ่งคณะผู้วิจัยยังอภิปรายว่าน่าจะเป็นผลมาจากกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมที่หลากหลายของจุลินทรีย์กล้ำเชื้อที่เกี่ยวข้องในระหว่างกระบวนการหมัก

Walsh และคณะ (2016) และ Dertli และคณะ (2017) ประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาจีโนมิกส์ร่วมกับเมตาโบลอมิกส์ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในเมคคีเฟอร์และการสร้างสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย โดยคณะผู้วิจัยรายงานค่าสหสัมพันธ์ (correlation) เชิงบวกระหว่างข้อมูลเมตาจีโนมของจุลินทรีย์และปริมาณสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่พบในคีเฟอร์ เช่น แบคทีเรียในสกุล *Acetobacter* กับปริมาณของ acetic acid แบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* โดยเฉพาะ *L. kefirifaciens* กับปริมาณของ carboxylic acids, esters และ ketones แบคทีเรียในสกุล *Leuconostoc* โดยเฉพาะ *Leu. mesenteroides* กับปริมาณของ acetic acid และ 2,3-butanedione และยีสต์ในสกุล *Saccharomyces* กับปริมาณของสารประกอบในกลุ่มเอสเทอร์ [7, 72] ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะเป็นพื้นฐานสำคัญในการคัดเลือกกล้ำเชื้อและควบคุมกระบวนการหมักเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นรสจำเพาะตามที่ต้องการในอนาคต

7. บทสรุป

การนำความรู้ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีโอมิกส์มาประยุกต์ใช้ในการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวคีเฟอร์ในปัจจุบัน อาศัยความก้าวหน้าของเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลำดับเบสและเคมีวิเคราะห์ในรูปแบบ high-throughput ร่วมกับการประมวลผลและจัดการข้อมูลจำนวนมากด้วยเทคนิคทางชีวสารสนเทศ ซึ่งได้ส่งเสริมให้เกิดการพัฒนา รูปแบบการศึกษาองค์ประกอบและพลวัตของประชากรจุลินทรีย์และชีว

โมเลกุลในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ซึ่งเป็นผลผลิตจากกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์กล้ำเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียกรดอะซิติก และยีสต์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เกิดความเข้าใจในลักษณะแบบองค์รวม ครอบคลุมตั้งแต่ระดับโครงสร้างของสารพันธุกรรมและหน้าที่ของยีนทั้งหมดในจีโนม การแสดงออกของยีนและการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมและความเครียดจากปัจจัยต่างๆ ในระหว่างกระบวนการหมัก ปฏิสัมพันธ์ระหว่างประชากรจุลินทรีย์ที่อยู่รวมในระบบอาหารเดียวกัน รวมทั้งกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมเพื่อย่อยสลายสารอาหารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำนม และการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ที่ส่งผลต่อสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี คุณภาพทางประสาทสัมผัส คุณค่าทางโภชนาการ สมบัติเชิงหน้าที่ และความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ ซึ่งก่อให้เกิดการพัฒนาองค์ความรู้ใหม่ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารในยุคหลังการสำรวจจีโนม หรือ “Post Genomic Era” ที่จำเป็นต้องอาศัยการบูรณาการของนักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญระหว่างศาสตร์ในหลากหลายสาขาเข้าด้วยกัน

เอกสารอ้างอิง

- [1] Rosa, D.D., Dias, M.M.S., Grzeskowiak, Ł.M., Reis, S.A., Conceição, L.L. and Peluzio, M.D.C.G. (2017). Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews*. 1-15.
- [2] Kesenkaş, H., Gürsoy, O. and Özbaş, H., (2017). Kefir. In: C. Martinez-Villaluenga and E. Peñas, (ed.), *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*, Academic Press: Boston. pp. 339-361.
- [3] Bourrie, B.C., Willing, B.P. and Cotter, P.D. (2016). The microbiota and health promoting

* Corresponding author e-mail: sam.s@chula.ac.th

¹ Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

² Omics Sciences and Bioinformatics Center, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

- characteristics of the fermented beverage kefir. *Frontiers in Microbiology*. 7: 647.
- [4] CODEX. CODEX STAN 243-2003: Standard for fermented milks. 2003 [cited 2012 November 3, 2012]; revised in 2010: [Available from: <http://www.fao.org/docrep/015/i2085e/i2085e00.pdf>].
- [5] Baschali, A., Tsakalidou, E., Kyriacou, A., Karavasiloglou, N. and Matalas, A.L. (2017). Traditional low-alcoholic and non-alcoholic fermented beverages consumed in European countries: a neglected food group. *Nutrition Research Reviews*. 30(1): 1-24.
- [6] Sarkar, S. (2008). Biotechnological innovations in kefir production: A review. *British Food Journal*. 110(3): 283-295.
- [7] Dertli, E. and Çon, A.H. (2017). Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. *LWT - Food Science and Technology*. 85: 151-157.
- [8] Simova, E., Simov, Z., Beshkova, D., Frengova, G., Dimitrov, Z. and Spasov, Z. (2006). Amino acid profiles of lactic acid bacteria, isolated from kefir grains and kefir starter made from them. *International Journal of Food Microbiology*. 107(2): 112-123.
- [9] Hertzler, S.R. and Clancy, S.M. (2003). Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*. 103(5): 582-587.
- [10] FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: Report of a joint FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations)/WHO (World Health Organization) working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. 2002 [cited 2013 May 31, 2013]. [Online]. Available from: <ftp://ftp.fao.org/esn/food/wgreport2.pdf>.
- [11] Ahmed, Z., Wang, Y., Ahmad, A., Khan, S.T., Nisa, M., Ahmad, H. and Afreen, A. (2013). Kefir and health: A contemporary perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53(5): 422-434.
- [12] Shibby, V.K. and Mishra, H.N. (2013). Fermented milks and milk products as functional foods: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53(5): 482-496.
- [13] Kim, D.H., Jeong, D., Kim, H., Kang, I.B., Chon, J.W., Song, K.Y. and Seo, K.H. (2016). Antimicrobial activity of kefir against various food pathogens and spoilage bacteria. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 36(6): 787-790.
- [14] ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม (2555). คีเฟอร์ (บัวหิมะ) ผลิตภัณฑ์นมหมักจากจุลินทรีย์หลายชนิด. *วารสารวิทยาศาสตร์ มข.* 40(2): 366-379.
- [15] ปิ่นมณี ขวัญเมือง (2550). คีเฟอร์: อาหารสุขภาพจากผลิตภัณฑ์นมหมัก. *วารสารครุศาสตร์อุตสาหกรรม*. 6(6): 152-160.
- [16] Luang-In, V. and Deeseenthum, S. (2016). Exopolysaccharide-producing isolates from Thai milk kefir and their antioxidant activities. *LWT - Food Science and Technology*. 73: 592-601.

* Corresponding author e-mail: sarn.s@chula.ac.th

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

² ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

- [17] Powthong, P. and Suntornthiticharoen, P. (2015). Isolation, identification and analysis of probiotic properties of lactic acid bacteria from selective various traditional Thai fermented food and kefir. *Pakistan Journal of Nutrition*. 14(2): 67-74.
- [18] Mozzi, F., Ortiz, M.E., Bleckwedel, J., De Vuyst, L. and Pescuma, M. (2013). Metabolomics as a tool for the comprehensive understanding of fermented and functional foods with lactic acid bacteria. *Food Research International*. 54(1): 1152-1161.
- [19] Ren, S., Hinzman, A.A., Kang, E.L., Szczesniak, R.D. and Lu, L.J. (2015). Computational and statistical analysis of metabolomics data. *Metabolomics*. 11(6): 1492-1513.
- [20] ศานต์ เศรษฐชัยมงคล และ มยุรี เหลืองวิสัย (2560). การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมตาโบโลมิกส์ในการศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม. *วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม*. 12(1): 1-16.
- [21] Ibáñez, E. and Cifuentes, A. (2014). Foodomics: Food science and nutrition in the postgenomic era. *Comprehensive Analytical Chemistry*. 64: 395-440.
- [22] Cifuentes, A., (2013). Foodomics: principles and applications. In: A. Cifuentes (ed). *Foodomics: advanced mass spectrometry in modern food science and nutrition*. pp. 1-13.
- [23] Chen, G., Chen, C. and Lei, Z. (2017). Metabolomics insights in the microbial community profiling and functional characterization of fermented foods. *Trends in Food Science and Technology*. 65: 23-31.
- [24] Kergourlay, G., Taminiau, B., Daube, G. and Champomier Vergès, M.C. (2015). Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. *International Journal of Food Microbiology*. 213: 31-39.
- [25] Smid, E.J. and Lacroix, C. (2013). Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology*. 24(2): 148-154.
- [26] Gandhi, A. and Shah, N.P. (2017). Integrating omics to unravel the stress-response mechanisms in probiotic bacteria: Approaches, challenges, and prospects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57(16): 3464-3471.
- [27] Walsh, A.M., Crispie, F., Claesson, M.J. and Cotter, P.D. (2017). Translating omics to food microbiology. *Annual Review of Food Science and Technology*. 8: 113-134.
- [28] Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I. and Tuohy, K. (2017). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of Nutrition*. 1-24.
- [29] Sánchez, B., Ruiz, L., Gueimonde, M. and Margolles, A. (2013). Omics for the study of probiotic microorganisms. *Food Research International*. 54(1): 1061-1071.
- [30] Xu, Y.J. and Wu, X. (2015). Foodomics in microbiological investigations. *Current Opinion in Food Science*. 4: 51-55.

* Corresponding author e-mail: sam.s@chula.ac.th

¹ Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

² Omics Sciences and Bioinformatics Center, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

- [31] Alkema, W., Boekhorst, J., Wels, M. and Van Hijum, S.A.F.T. (2016). Microbial bioinformatics for food safety and production. *Briefings in Bioinformatics*. 17(2): 283-292.
- [32] Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malmgren, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D. and Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research*. 11(5): 731-753.
- [33] Mayo, B., Rachid, C.T.C.C., Alegría, Á., Leite, A.M.O., Peixoto, R.S. and Delgado, S. (2014). Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology. *Current Genomics*. 15(4): 293-309.
- [34] Wang, Y., Wang, J., Ahmed, Z., Bai, X. and Wang, J. (2011). Complete genome sequence of *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3. *Journal of Bacteriology*. 193(16): 4280-4281.
- [35] อัจฉรา บุญมี. (2556). เมตาจีโนมิกส์: เปิดโลกแห่งจีโนมจุลินทรีย์ในประเทศไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 21(1): 71-82.
- [36] De Filippis, F., Parente, E. and Ercolini, D. (2017). Metagenomics insights into food fermentations. *Microbial Biotechnology*. 10(1): 91-102.
- [37] Chen, H.C., Wang, S.Y. and Chen, M.J. (2008). Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*. 25(3): 492-501.
- [38] Kesmen, Z. and Kacmaz, N. (2011). Determination of lactic microflora of kefir grains and kefir beverage by using culture-dependent and culture-independent methods. *Journal of Food Science*. 76(5): M276-M283.
- [39] Leite, A.M.O., Mayo, B., Rachid, C.T.C.C., Peixoto, R.S., Silva, J.T., Paschoalin, V.M.F. and Delgado, S. (2012). Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiology*. 31(2): 215-221.
- [40] Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Aquilanti, L., De Filippis, F., Stellato, G., Di Mauro, S., Turchetti, B., Buzzini, P., Ercolini, D. and Clementi, F. (2015). Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food Microbiology*. 49(1): 123-133.
- [41] Dobson, A., O'Sullivan, O., Cotter, P.D., Ross, P. and Hill, C. (2011). High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain. *FEMS Microbiology Letters*. 320(1): 56-62.
- [42] Gao, J., Gu, F., He, J., Xiao, J., Chen, Q., Ruan, H., and He, G. (2013). Metagenome analysis of bacterial diversity in Tibetan kefir grains. *European Food Research and Technology*. 236(3): 549-556.
- [43] Marsh, A.J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R.P. and Cotter, P.D. (2013). Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and

* Corresponding author e-mail: sam.s@chula.ac.th

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

² ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

- milks from multiple sources. PLoS One. 8(7): e69371.
- [44] Nalbantoglu, U., Cakar, A., Dogan, H., Abaci, N., Ustek, D., Sayood, K. and Can, H. (2014). Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. Food Microbiology. 41: 42-51.
- [45] Zamberi, N.R., Mohamad, N.E., Yeap, S.K., Ky, H., Beh, B.K., Liew, W.C., Tan, S.W., Ho, W.Y., Boo, S.Y., Chua, Y.H. and Alitheen, N.B. (2016). 16S metagenomic microbial composition analysis of kefir grain using MEGAN and BaseSpace. Food Biotechnology. 30(3): 219-230.
- [46] Kalamaki, M.S. and Angelidis, A.S. (2017). Isolation and molecular identification of yeasts in Greek kefir. International Journal of Dairy Technology. 70(2): 261-268.
- [47] Valdés, A., Ibáñez, C., Simó, C. and García-Cañas, V. (2013). Recent transcriptomics advances and emerging applications in food science. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 52: 142-154.
- [48] Sieuwerts, S., Molenaar, D., van Hijum, S.A.F.T., Beerthuyzen, M., Stevens, M.J.A., Janssen, P.W.M., Ingham, C.J., de Bok, F.A.M., de Vos, W.M. and van Hylckama Vlieg, J.E.T. (2010). Mixed-culture transcriptome analysis reveals the molecular basis of mixed-culture growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. Applied and Environmental Microbiology. 76(23): 7775-7784.
- [49] Zdenkova, K., Alibayov, B., Karamonova, L., Purkrtova, S., Karpiskova, R. and Demnerova, K. (2016). Transcriptomic and metabolic responses of *Staphylococcus aureus* in mixed culture with *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus* and *Enterococcus durans* in milk. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 43(9): 1237-1247.
- [50] Lazzi, C., Turrone, S., Mancini, A., Sgarbi, E., Neviani, E., Brigidi, P. and Gatti, M. (2014). Transcriptomic clues to understand the growth of *Lactobacillus rhamnosus* in cheese. BMC Microbiology. 14(1):28. doi: 10.1186/1471-2180-14-28
- [51] Dugat-Bony, E., Straub, C., Teissandier, A., Onésime, D., Loux, V., Monnet, C., Irlinger, F., Landaud, S., Leclercq-Perlat, M.N., Bento, P., Fraud, S., Gibrat, J.F., Aubert, J., Fer, F., Guédon, E., Pons, N., Kennedy, S., Beckerich, J.M., Swennen, D. and Bonnarne, P. (2015). Overview of a surface-ripened cheese community functioning by meta-omics analyses. PLoS ONE. 10(4):e0124360. doi: 10.1371/journal.pone.0124360
- [52] Monnet, C., Dugat-Bony, E., Swennen, D., Beckerich, J.M., Irlinger, F., Fraud, S. and Bonnarne, P. (2016). Investigation of the activity of the microorganisms in a reblochon - style cheese by metatranscriptomic analysis. Frontiers in Microbiology. 7: 536. doi: 10.3389/fmicb. 2016.00536

* Corresponding author e-mail: sam.s@chula.ac.th

¹ Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

² Omics Sciences and Bioinformatics Center, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

- [53] Mendes, F., Sieuwerts, S., de Hulster, E., Almering, M.J.H., Luttik, M.A.H., Pronk, J.T., Smid, E.J., Bron, P.A. and Daran-Lapujadea, P. (2013). Transcriptome-based characterization of interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in lactose-grown chemostat cocultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(19): 5949-5961.
- [54] Serafini, F., Turroni, F., Ruas-Madiedo, P., Lugli, G.A., Milani, C., Duranti, S., Zamboni, N., Bottacini, F., van Sinderen, D., Margolles, A. and Ventura, M. (2014). Kefir fermented milk and kefir promote growth of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 and modulate its gene expression. *International Journal of Food Microbiology*. 178: 50-59.
- [55] Gallardo, J.M., Ortea, I. and Carrera, M. (2013). Proteomics and its applications for food authentication and food-technology research. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 52: 135-141.
- [56] Piras, C., Roncada, P., Rodrigues, P.M., Bonizzi, L. and Soggiu, A. (2016). Proteomics in food: Quality, safety, microbes, and allergens. *Proteomics*. 16(5): 799-815.
- [57] Gagnaire, V. and Jan, G., (2017). Proteomics of fermented milk products. In: M.L. Colgrave. (ed.). *Proteomics in Food Science*, Academic Press. pp. 361-382.
- [58] De Angelis, M., Calasso, M., Cavallo, N., Di Cagno, R. and Gobbetti, M. (2016). Functional proteomics within the genus *Lactobacillus*. *Proteomics*. 16(6): 946-962.
- [59] Brown, L., Pingitore, E.V., Mozzi, F., Saavedra, L., Villegas, J.M. and Hebert, E.M. (2017). Lactic acid bacteria as cell factories for the generation of bioactive peptides. *Protein and Peptide Letters*. 24(2): 146-155.
- [60] Giacometti, J. and Buretić-Tomljanović, A. (2017). Peptidomics as a tool for characterizing bioactive milk peptides. *Food Chemistry*. 230: 91-98.
- [61] Yang, Y., Shevchenko, A., Knaust, A., Abuduresule, I., Li, W., Hu, X., Wang, C. and Shevchenko, A. (2014). Proteomics evidence for kefir dairy in early bronze age China. *Journal of Archaeological Science*. 45(1): 178-186.
- [62] Ebner, J., Aşçi Arslan, A., Fedorova, M., Hoffmann, R., Küçükçetin, A. and Pischetsrieder, M. (2015). Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains. *Journal of Proteomics*. 117: 41-57.
- [63] Dallas, D.C., Citerne, F., Tian, T., Silva, V.L.M., Kalanetra, K.M., Frese, S.A., Robinson, R.C., Mills, D.A. and Barile, D. (2016). Peptidomic analysis reveals proteolytic activity of kefir microorganisms on bovine milk proteins. *Food Chemistry*. 197: 273-284.
- [64] Chen, M.J., Tang, H.Y. and Chiang, M.L. (2017). Effects of heat, cold, acid and bile salt

* Corresponding author e-mail: sam.s@chula.ac.th

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

² ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

- adaptations on the stress tolerance and protein expression of kefir-isolated probiotic *Lactobacillus kefiranofaciens* M1. Food Microbiology. 66: 20-27.
- [65] Cavallero, G.J., Malamud, M., Casabuono, A.C., Serradell, M.D.L.Á. and Couto, A.S. (2017). A glycoproteomic approach reveals that the S-layer glycoprotein of *Lactobacillus kefir* CIDCA 83111 is O- and N-glycosylated. Journal of Proteomics. 162: 20-29.
- [66] Liu, Y. and Pischetsrieder, M. (2017). Identification and relative quantification of bioactive peptides sequentially released during simulated gastrointestinal digestion of commercial kefir. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 65(9): 1865-1873.
- [67] Wishart, D.S. (2008). Metabolomics: applications to food science and nutrition research. Trends in Food Science & Technology. 19(9): 482-493.
- [68] Cevallos-Cevallos, J.M., Reyes-De-Corcuera, J.I., Etxeberria, E., Danyluk, M.D. and Rodrick, G.E. (2009). Metabolomic analysis in food science: A review. Trends in Food Science & Technology. 20(11-12): 557-566.
- [69] Nicholson, J.K. and Lindon, J.C. (2008). Systems biology: Metabonomics. Nature. 455(7216): 1054-1056.
- [70] Hu, J.B., Gunathilake, S., Chen, Y.C. and Urban, P.L. (2014). On the dynamics of kefir volatome. RSC Advances. 4(55): 28865-28870.
- [71] Irigoyen, A., Ortigosa, M., Garcia, S., Ibanez, F.C. and Torre, P. (2012). Comparison of free amino acids and volatile components in three fermented milks. International Journal of Dairy Technology. 65(4): 578-584.
- [72] Walsh, A.M., Crispie, F., Kilcawley, K., O'Sullivan, O., O'Sullivan, M.G., Claesson, M.J. and Cotter, P.D. (2016). Microbial succession and flavor production in the fermented dairy beverage kefir. mSystems. 1(5). DOI: 10.1128/mSystems.00052-16

* Corresponding author e-mail: sam.s@chula.ac.th

¹ Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

² Omics Sciences and Bioinformatics Center, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok