

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

**การคัดเลือกและการพัฒนานกเชื้อโพรไบโอติกสำหรับการผลิต
ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก**

**SCREENING AND DEVELOPMENT OF PROBIOTIC STARTER
CULTURE FOR PRODUCTION OF FERMENTED FISH PRODUCT**



**นิระชา ศรีวงษ์
NIRACHA SRIWONG**

ดว.
ร ๕45 ๗
๑๕๕๐

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....**74548**
วัน,เดือน,ปี.....**3 ต.ค. 2550**

b.....	11๕03๓21
i.....	

**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานี้เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พ.ศ. 2550

**SCREENING AND DEVELOPMENT OF PROBIOTIC STARTER CULTURE
FOR PRODUCTION OF FERMENTED FISH PRODUCT**

NIRACHA SRIWONG

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULLFILMENT
OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SHCOOL OF GRADUATE STUDIES**

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2007



COPYRIGHT 2007

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกและพัฒนากล้าเชื้อโพรไบโอติกสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ปลาหมัก
นักศึกษา	นางสาวนิระชา ศรีวงษ์
รหัสประจำตัว	46063408
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2550
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พุกภัย

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหนมปลาทรายและเนื้ปลาสดทั้งหมด 15 ตัวอย่าง พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 3×10^7 ถึงมากกว่า 2.1×10^9 โคโลนีต่อกรัม จากนั้นได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 138 ไอโซเลต นำมาศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นซึ่งได้แก่เชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus bulgaricus* และ *Listeria monocytogenes* ด้วยเทคนิค agar spot test พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 30 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด และได้ศึกษาการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดีของแบคทีเรียเหล่านี้ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4 สามารถทนต่อกรดแลคติก (พีเอช 2.9 และ 3.2) กรดไฮโดรคลอริก (พีเอช 2.2) ทนต่อโซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ 6) และเกลือน้ำดี (ร้อยละ 5.25) ในอาหารเหลว MRS และเมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลต มาทำการจำแนกชนิดโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 50 CH และการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 คือเชื้อ *Lactococcus lactis* และ ไอโซเลต 13IS4 คือเชื้อ *Lactobacillus sakei* ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลตนี้มาทำเป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

ในการศึกษาผลของสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งแห้งต่อการอยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* หลังการแช่แข็งแห้ง ได้เปรียบเทียบปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียทั้งสองชนิดในสารป้องกันเซลล์แต่ละชนิด (ความเข้มข้นร้อยละ 9.1) ทั้งหมด 8 ชนิด ซึ่งได้แก่ หางนม นมถั่วเหลือง ไข่แดง ซูโครส แลคโตส กลูโคส ทรีฮาโลส และซอร์บิทอล จากนั้นจึงคัดเลือกสารป้องกันเซลล์

ชนิดที่มีผลทำให้แบคทีเรียทั้งสองมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตสูงเพื่อนำมาพัฒนาเป็นสูตรสารป้องกันผสม จำนวน 9 สูตร *L. lactis* มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตมากที่สุดในแลคโตส (ร้อยละ 64.17) หางนม (ร้อยละ 61.56) และซูโครส (ร้อยละ 60.96) เมื่อเปรียบเทียบกับ การรอดชีวิตในนมถั่วเหลือง และซอร์บิทอลซึ่งให้การป้องกันเซลล์น้อยกว่า ส่วน *L. sakei* นั้นพบว่าสารป้องกันเซลล์ที่ดีที่สุดคือ หางนมและนมถั่วเหลือง ซึ่งให้ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งแห้งร้อยละ 65.06 และ 62.80 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ตรีฮาโลส ซูโครส และแลคโตส มีผลทำให้ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตน้อยกว่าในสารป้องกันเซลล์ทั้งสองชนิดนั้น ในบรรดาสารป้องกันเซลล์ทั้งหมดที่ทดสอบ กลูโคส และไข่แดงให้ผลป้องกันเซลล์แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ได้ต่ำสุดหลังการแช่แข็งแห้ง สำหรับการเปรียบเทียบการอยู่รอดของเซลล์ในสูตรสารป้องกันผสม พบว่า *L. lactis* อยู่รอดได้สูงสุดหลังการแช่แข็งแห้ง (ร้อยละ 75.86) ในสารป้องกันเซลล์ผสมที่ประกอบด้วยหางนมผงร้อยละ 8.73 แลคโตสร้อยละ 3.97 ซูโครสร้อยละ 3.97 ตรีฮาโลสร้อยละ 3.97 และน้ำกลั่นร้อยละ 73.36 ซึ่งพบว่ามีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตเพิ่มขึ้นร้อยละ 11.69 ถึง 20.15 ขณะที่สูตรป้องกันการแช่แข็งแห้งที่ทำให้เชื้อ *L. sakei* อยู่รอดได้สูงสุด (ร้อยละ 74.57) ประกอบด้วยหางนมผงร้อยละ 4.56 แลคโตสร้อยละ 4.15 ซูโครสร้อยละ 4.15 ตรีฮาโลสร้อยละ 4.15 ในนมถั่วเหลืองต่อน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1 ร้อยละ 82.99 โดยพบว่ามีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตเพิ่มขึ้นร้อยละ 9.51 ถึง 18.15 หลังการแช่แข็งแห้ง

ในการศึกษาผลของการปรับตัวต่อความดันออสโมติกด้วยซูโครส (ซูโครส 0.3 โมลาร์) และการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็น (10 องศาเซลเซียส) ต่อการชักนำการป้องกันข้ามของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* ในสูตรสารป้องกันผสมที่ดีที่สุดที่คัดเลือกหลังการแช่แข็งแห้งและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน พบว่าการปรับตัวทั้งสองทรีดเมนต์นี้ไม่มีผลช่วยป้องกันเซลล์ของ *L. lactis* หลังการแช่แข็งแห้ง แต่การปรับตัวของเซลล์นี้มีแนวโน้มช่วยส่งเสริมการต้านทานต่อสภาพเครียดของการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำมากโดยช่วยเพิ่มการอยู่รอดของเซลล์ได้เล็กน้อย สำหรับเชื้อ *L. sakei* นั้นต่างกับ *L. lactis* โดยเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งแห้งของ *L. sakei* ที่ผ่านการปรับตัวมีจำนวนสูงกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัว และการปรับตัวทั้งสองทรีดเมนต์ไม่ได้มีผลช่วยป้องกันเซลล์ต่อสภาพเครียดจากการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำมาก

Thesis title	Screening and Development of Probiotic Starter Culture for Production of Fermented Fish Product
Student	Niracha Sriwong
Student ID	46063408
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2007
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Suree Nanasombat
Thesis Co-Advisor	Asst. Prof. Dr. Saranya Phunpruch

ABSTRACT

In this study, the number of lactic acid bacteria (LAB) was analyzed from 15 samples of Nham-plaa and raw fish. The total viable counts of LAB were in the range of 3.0×10^5 to $> 2.1 \times 10^9$ CFU/g. One hundred thirtyeight LAB isolates were selected and used to study antibacterial activity against other organisms, including *Staphylococcus aureus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Listeria monocytogenes* using agar spot test. The thirty isolates were found to inhibit at least one specie of these test organisms. For the study of resistance to lactic acid, hydrochloric acid, sodium chloride and bile salt, the LAB isolates 13IS3 and 13IS4 were tolerant to lactic acid (pH 2.90 and 3.20), hydrochloric acid (pH 2.20), sodium chloride (6.00%) and bile salts (5.25%) in MRS broth. The two isolates, 13IS3 and 13IS4, were identified by morphological characterization, biochemical tests using API 50 CH system and nucleotide sequence analysis of 16S rDNA, and shown to be *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus sakei*, respectively. Therefore, these two LAB isolates were selected for production of fermented fish starter culture.

Effect of lyoprotective agents on survival of *L. lactis* and *L. sakei* after freeze drying was investigated. Survival of these two bacteria in each of eight lyoprotective agents (9.1% (w/w) including skim milk, soy milk, egg yolk, sucrose, lactose, glucose, trehalose and sorbitol was compared, and effective protectants affected high viability of these two LAB were selected to develop 9 formulations of mixed lyoprotectants. The highest viability of *L. lactis* was found in lactose, skim milk and sucrose with 64.17%, 61.56% and 60.96% survival respectively, compared

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

to soy milk and sorbitol which provided lower protection. For *L. sakei*, skim milk and soy milk were found to be best lyoprotectants, and the survivor populations of in these protectants after freeze drying were 65.06% and 62.80%, respectively. However, trehalose, sucrose and lactose affected lower survival of *L. sakei* than those two lyoprotective agents. Among all protectants tests, glucose and egg yolk influenced the lowest protection to these two bacteria after freeze drying. For survival comparing in nine lyoprotectant formulations, the highest survival (75.86%) of *L. lactis* was found in mixed protectants containing 8.37% skim milk, 3.97% lactose, 3.97% sucrose, 3.97% trehalose and 73.36% distilled water, showing increased viability of 11.69-20.15%. On the other hand, the protectant mixture composed of 4.56% skim milk, 4.15% lactose, 4.15% sucrose, 4.15% trehalose and 82.99% soy milk with distilled water (1:1) affected greater viability of *L. sakei* (74.57% survival), compared to other protectant formulations. Using this protectants, the number of *L. sakei* survivors was increased by 9.51-18.15% after freeze drying.

Osmotic adaptation (0.3 M sucrose) and osmotic adaptation in combination with cold adaptation induced cross-protection of *L. lactis* and *L. sakei* in the best selected lyoprotectant mixture after freeze drying and storage for 28 days at -80 °C were studied. The two treatments of adaptation did not affect protection of *L. lactis* adapted cells after freeze drying, but these adaptation tended to enhance resistance to deep freezing stress by slightly increasing cell viability. Unlike *L. lactis*, the survivor populations of *L. sakei* adapted cells after freeze drying were higher than their nonadapted counterparts, and both adaptation treatments did not affect cell protection against deep freezing.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. สุริย์ นานาสมบัติ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำชี้แนะช่วยแก้ไขปัญหา ให้ความรู้และข้อคิดเห็นในด้านต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤษย์ ที่ให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณ รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์ และ รศ. อรไท สุขเจริญ ซึ่งเป็นคณะกรรมการสอบหัวข้อวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาสละเวลาให้คำปรึกษา และคำชี้แนะในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย บัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและติดต่อประสานงาน ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์และสารเคมี

ขอบคุณเพื่อน พี่ และน้องภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกคน ในความช่วยเหลือและคอยเป็นกำลังใจตลอดมา

และที่สำคัญขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อนคร และคุณแม่จำเนียร ศรีวงษ์ และทุกคนในครอบครัว ที่เสียสละ ให้ความรัก ให้กำลังใจผู้วิจัยตลอดมา

สำหรับคุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอบอกให้กับคุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว ครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัย ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน

นิระชา ศรีวงษ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	I-II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III-IV
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	XII
สารบัญรูป.....	XIV

บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 แบคทีเรียโพรไบโอติก.....	5
2.1.1 คุณสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติก.....	5
2.1.1.1 การปรับตัวต่อสภาวะเครียดของแบคทีเรียโพรไบโอติก.....	5
2.1.1.2 การทนต่อกรด	5
2.1.1.3 การทนต่อน้ำดี	6
2.1.1.4 การทนต่อเกลือ.....	6
2.1.2 ประโยชน์ของแบคทีเรียโพรไบโอติก	7
2.1.3 การคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติก	7
2.2 วิธีการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	9
2.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)	9
2.2.2 การศึกษารูปแบบการหมักสารประเภทคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate fermentation).....	9
2.2.3 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียโพรไบโอติกโดยการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA.....	10
2.2.3.1 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase chain reaction)	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3 การตอบสนองต่อสภาพเครียดจากความดันออสโมติก	14
2.3.1 ความดันออสโมติก (Osmotic pressure)	14
2.3.2 สภาพเครียดต่อความดันออสโมติก (Osmoregulatory mechanism).....	15
2.3.3 กลไกการควบคุมความดันออสโมติก	15
2.3.4 Compatible solute.....	16
2.4 การตอบสนองต่อสภาพเครียดจากความเย็น	17
2.4.1 ความซับซ้อนของกระบวนการปรับตัวของเซลล์ (The complexity of the cellular adaptation process)	18
2.4.2 การปรับตัวต่ออุณหภูมิของของเหลวที่เป็นไขมันที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Thermal adaptation of membrane lipid fluidity).....	18
2.5 เทคโนโลยีการผลิตกล้าเชื้อ	21
2.6 การแช่แข็งแห้ง (Freeze Drying หรือ Lyophilization)	22
2.6.1 การแช่แข็ง	24
2.6.1.1 โครงสร้างของน้ำแข็งและสารละลาย	25
2.6.1.2 การแช่แข็งเพื่อให้เกิดผลึกขนาดใหญ่	26
2.6.1.3 ผลของการแช่แข็งต่อเซลล์ของแบคทีเรีย	28
2.6.2 การระเหิด (Sublimation).....	29
2.6.3 การคาย (Desorption).....	29
2.6.4 ผลของสารป้องกันความเย็นต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย	29
2.6.4.1 แซคคาไรด์และโพลีแซคคาไรด์ (Saccharide and polysaccharide)	29
2.6.4.2 โพลีอัลกอฮอล์ (Polyalcohols).....	31
2.5.4.3 เอไมด์และไอไมด์ (Amides and imides)	31
2.6.4.4 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Me ₂ SO).....	32
2.6.4.5 สารประกอบเชิงซ้อน (Complex compound).....	32
2.6.5 กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสำหรับผลิตภัณฑ์ปลาหมัก.....	33
2.6.6 การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อยับยั้งและการทำลาย จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค	33
2.6.7 ประโยชน์ของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 การวิจัยและการดำเนินงาน	35
3.1 วัสดุและอุปกรณ์	35
3.1.1 ตัวอย่างเหนมปลาและเนื้อปลาสด	35
3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์	35
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายที่ใช้ทำเชื้อจาง และสารเคมี	35
3.1.4 เครื่องมือและอุปกรณ์	36
3.2 วิธีการทดลอง	36
3.2.1 การวิเคราะห์หาจำนวนและการแยกแบคทีเรียกรดแลกติก ในเหนมปลาและเนื้อปลาสด	36
3.2.1.1 การตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลกติก ในเหนมปลาและเนื้อปลาสด	36
3.2.1.2 การแยกแบคทีเรียกรดแลกติก	37
3.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์	37
3.2.3 การทดสอบการทนต่อกรดแลกติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือแร่ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์	38
3.2.3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก	38
3.2.3.2 การทดสอบการทนต่อกรดแลกติกของแบคทีเรียกรดแลกติก	38
3.2.3.3 การทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริก ของแบคทีเรียกรดแลกติก	38
3.2.3.4 การทดสอบการทนต่อโซเดียมคลอไรด์ ของแบคทีเรียกรดแลกติก	38
3.2.3.5 การทดสอบการทนต่อเกลือแร่ของแบคทีเรียกรดแลกติก	39
3.2.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติก	39
3.2.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	39
3.2.4.2 การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีโดยใช้ ชุดทดสอบ API 50 CH	39
3.2.4.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกด้วย วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA	41
ก) การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ข) การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟเรซิส	42
ค) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	42
ง) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA	43
3.2.5 การศึกษาผลของสารป้องกันเซลล์ต่อการอยู่รอดของ แบคทีเรียกรดแลกติกที่ผ่านการแช่แข็งแห้ง	43
3.2.5.1 ผลของสารป้องกันเซลล์ต่อการอยู่รอด ของแบคทีเรียกรดแลกติกหลังการแช่แข็งแห้ง	43
3.2.5.2 ผลของสูตรสารป้องกันผลต่อการอยู่รอด ของแบคทีเรียกรดแลกติกหลังการแช่แข็งแห้ง	44
3.2.6 การศึกษาผลของการปรับตัวต่อความดันออสโมติก และการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็น ต่อการอยู่รอดหลังแช่แข็งแห้งและเก็บรักษา	45
3.2.6.1 การเตรียมแบคทีเรียกรดแลกติกที่ไม่ผ่านการปรับตัว	45
3.2.6.2 การเตรียมแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผ่านการปรับตัว ต่อความดันออสโมติก	45
3.2.6.3 การเตรียมแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผ่านการปรับตัว ต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็น	45
3.2.6.4 การอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่ไม่ผ่านการปรับตัว แบคทีเรียกรดแลกติกที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก และแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผ่านการปรับตัวต่อความดัน ออสโมติกร่วมกับความเย็น	46
3.3 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	47
4.1 ผลการตรวจนับจำนวนและการแยกแบคทีเรียกรดแลกติกในนมพลา และเนื้อปลาสด	47
4.1.1 ผลการตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลกติก ในนมพลาและเนื้อปลาสด.....	47
4.2 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ด้วยวิธี Agar Spot Test	50
4.2.1 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ ที่ใช้ทดสอบด้วยวิธี Agar Spot Test.....	50
4.3 ผลการทดสอบการทนต่อกรดแลกติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลกติก.....	53
4.3.1 การทนต่อกรดแลกติกของแบคทีเรียกรดแลกติก.....	53
4.3.2 การทนต่อกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลกติก	54
4.3.3 การทนต่อโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลกติก	54
4.3.4 การทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลกติก.....	54
4.4 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติก.....	58
4.4.1 การศึกษาทางสัณฐานวิทยา.....	58
4.4.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4 โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH.....	58
4.4.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกโดยการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA	62
4.4.3.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส	62
4.4.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์.....	62
4.4.4 ผลสรุปการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4.....	67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5 ผลของสารป้องกันเซลล์และสูตรสารป้องกันผสมต่อการอยู่รอด ของเชื้อ <i>Lactococcus lactis</i> และ <i>Lactobacillus sakei</i> หลังการแช่แข็งแห้ง.....	70
4.5.1 ผลของสารป้องกันเซลล์ต่อการอยู่รอดของเชื้อ <i>L. lactis</i> และ <i>L. sakei</i> หลังการแช่แข็งแห้ง.....	70
4.5.2 ผลของสารป้องกันผสมต่อการอยู่รอดของเชื้อ <i>L. lactis</i> และ <i>L. sakei</i> หลังการแช่แข็งแห้ง.....	73
4.6 ผลของการปรับตัวต่อแรงดันออสโมติกและแรงดันออสโมติกร่วมกับความเย็น ต่อการอยู่รอดของเชื้อ <i>Lactococcus lactis</i> และ <i>Lactobacillus sakei</i> หลังการแช่แข็งแห้งและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส	75
4.6.1 ผลของการปรับตัวต่อแรงดันออสโมติกและการปรับตัว ต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นต่อการอยู่รอดของ เชื้อ <i>L. lactis</i> และ <i>L. sakei</i> หลังการแช่แข็งแห้ง.....	75
4.6.2 ผลของการปรับตัวต่อความดันออสโมติกและการปรับตัวต่อความดัน ออสโมติกร่วมกับความเย็นต่อการอยู่รอดของเชื้อ <i>L. lactis</i> และ <i>L. sakei</i> ในกล้าเชื้อผงที่เก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส.....	77
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	81
บรรณานุกรม	84
ภาคผนวก ก	101
ภาคผนวก ข.....	104
ภาคผนวก ค	105
ประวัติผู้เขียน	122

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การสะสมสาร Compatible solute ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	17
2.2 ปริมาณของน้ำที่แข็งตัวและไม่แข็งตัวในอาหารบางชนิดที่อุณหภูมิ ของการแช่แข็งระดับต่างๆ.....	24
2.3 ปริมาณของน้ำที่ไม่กลายเป็นน้ำแข็งซึ่งไม่สามารถแข็งตัวได้ โดยการลดอุณหภูมิให้ต่ำลง.....	25
3.1 สารที่ใช้ทดสอบลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลกติกโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH	40
3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	43
3.3 ส่วนผสมของสารป้องกันเซลล์ทั้งหมด 9 สูตร	44
4.1 จำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกทั้งหมดและจำนวนไอโซเลตของ แบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือก	49
4.2 คุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 118, <i>Pediococcus acidilactici</i> TISTR 051, <i>Lactobacillus bulgaricus</i> TISTR 451 และ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 11256 โดยแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกจาก พลาสติกและเหนมปลา 30 ไอโซเลต.....	52
4.3 จำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกทั้งหมดและจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรีย กรดแลกติกที่ผลิตสารยับยั้ง.....	53
4.4 การทนต่อกรดแลกติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดี ในอาหารเหลว MRS ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกจากเหนมปลาและเนื้อพลาสติก.....	57
4.5 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4 ด้วยชุดทดสอบ API 50 CH.....	60
4.6 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลกติก ไอโซเลต 13IS3 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน	66
4.7 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลกติก ไอโซเลต 13IS4 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน	67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.8 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4 โดย การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบชีวเคมี (API 50 CH) และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA	68
4.9 ผลของสารป้องกันเซลล์ต่อการอยู่รอดของเชื้อ <i>Lactococcus lactis</i> และ <i>Lactobacillus sakei</i> หลังการแช่แข็งแห้ง	72
4.10 ผลของสูตรสารป้องกันผลต่อการอยู่รอดของเชื้อ <i>Lactococcus lactis</i> และ <i>Lactobacillus sakei</i> หลังการแช่แข็งแห้ง	74
4.11 ผลของการอยู่รอดของเชื้อ <i>Lactococcus lactis</i> ในสารป้องกันผลสูตรที่ 8 และ <i>Lactobacillus sakei</i> ในสารป้องกันผลสูตรที่ 5 ที่ไม่ผ่านการปรับตัว ผ่านการ ปรับตัวต่อความดันออสโมติก และผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับ ความเย็นหลังการแช่แข็งแห้ง.....	75

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์	13
2.2 แผนภาพของสถานะของน้ำและบริเวณที่จะมีการเปลี่ยนสถานะจากของแข็งกลายเป็นไอ	23
2.3 การทำแห้งเป็นการเปลี่ยนสภาพจากน้ำแข็งหรือน้ำในสถานะอะมอร์ฟัส (amorphous phase) กลายกลายเป็นไอ	23
2.4 รูปร่างโมเลกุลของน้ำ	25
2.5 การโตขึ้นของผลึกน้ำแข็งของน้ำซึ่งเพิ่มขึ้น	26
2.6 อัตราการเกิดน้ำแข็ง น้ำ และสารที่ถูกละลายได้ในสภาวะที่สมดุลของ สารละลาย กลีเซอรินและน้ำ ซึ่งเป็นฟังก์ชันของความเข้มข้นของกลีเซอรินพลอตที่อุณหภูมิ ของการแช่แข็งต่างกันระหว่าง -5 และ -50 องศาเซลเซียส	27
4.1 รูปร่างและการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต 13IS3 (รูป ก) และไอโซเลต 13IS4 (รูป ข)	59
4.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต 13IS3 (รูป ก) และไอโซเลต 13IS4 (รูป ข) ด้วยชุดทดสอบ API 50 CH	61
4.3 จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4 จากการแยกด้วยเทคนิค อิเล็กโตรโฟเรซิสในอะกาโรสเจลร้อยละ 0.8	63
4.4 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA	64
4.5 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ขนาด 600 คู่เบส ของไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4	65
4.6 ผลของการปรับตัวต่อความดันออสโมติก และการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วม กับความเย็นต่อการอยู่รอดของเชื้อ <i>L. lactis</i> (รูป ก) ในสารป้องกันผสมสูตรที่ 8 และ <i>L. sakei</i> (รูป ข) ในสารป้องกันผสมสูตรที่ 5 ระหว่างเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน	80

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

โพรไบโอติกคือจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารช่วยให้ผู้บริโภคมีสุขภาพดีโดยการช่วยรักษาหรือปรับปรุงจุลินทรีย์ในลำไส้ให้มีความสมดุล (Fuller. 1989) และสามารถต่อต้านจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคด้านการเกิดมะเร็ง กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน และสร้างสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายเช่น กรดอะมิโน กรดแลคติก พลังงาน ไวตามินเค และไวตามินบี (Saarela และคณะ. 2000 ; Robinson และคณะ. 2002) โดยอาจนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกมาพัฒนาเป็นอาหารเสริมในรูปแคปซูลหรือเม็ดหรืออาจนำมาใช้ในการผลิตถั่วงอกสำหรับทำผลิตภัณฑ์อาหารหมักและในบางครั้งอาจนำมาเติมในอาหารเพื่อช่วยให้อาหารมีคุณสมบัติของโพรไบโอติกหรือการทำงานของเชื้อโพรไบโอติก (Mattila-Sandholm และคณะ. 2002) ซึ่งก่อนการนำเชื้อโพรไบโอติกมาใช้ในอาหารนั้นควรทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกเสียก่อนเพื่อให้ได้จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีคุณลักษณะเหมาะสมและทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Saarela และคณะ. 2000) คุณลักษณะที่สำคัญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกได้แก่ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีริโอซิน (Cowley. 1988) การมีชีวิตรอดจากการเผชิญสภาพกรด และสภาพน้ำดีในระบบทางเดินอาหาร ได้จึงเกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ รวมทั้งต้องสามารถทนต่อสภาพที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการหมักของอาหารที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ (Saarela และคณะ. 2000 ; Sander และคณะ. 1999) จากรายงานการศึกษาของ Budde และคณะ (2003) เกี่ยวกับคุณสมบัติของเชื้อ *Leuconostoc carnosum* 4010 ที่แยกจากผิวของขึ้นหุ้มแฮมมาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยวิธี spot test พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ได้หลายสายพันธุ์และเมื่อเร็วๆนี้ Thapa และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SM:T1 ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ปลาตากแห้งและรมควัน (sukako maacha) พื้นเมืองแถบหิมาลัยตะวันตกของประเทศเนปาลและอินเดียด้วยวิธี agar spot พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Listeria innocua* และ *Staphylococcus aureus* ได้นอกจากนี้ Ghalfi และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาระบบแบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 พบว่าสามารถต้านเชื้อ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ปลาชาลมอนรมควัน ในระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้ จากความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค และเป็นเชื้อเริ่มต้นในอาหารหมักนี้เองจึงทำให้แบคทีเรียกรดแลคติก ที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อโพรไบโอติกหลายชนิดถูกนำมาผลิตเป็นถั่วงอกให้กับผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

ดังนั้นถ้าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อโพรไบโอติกจากเนื้อปลาสดหรือปลาหมักซึ่งสามารถสร้างสารยับยั้งได้นำมาใช้ผลิตกล้าเชื้อในการทำผลิตภัณฑ์ปลาหมักอาจช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคได้แก่ *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*, *Coliform* และ fecal coliform ที่อาจปนเปื้อนในวัตถุดิบ ซึ่งทำให้ผู้บริโภคลดความเสี่ยงอันเกิดจากจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายเหล่านี้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกจากเนื้อปลาสดและແหมมปลาที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้แก่ *S. aureus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus bulgaricus* และ *L. monocytogenes* ด้วยเทคนิค agar spot test และการที่จะได้รับประโยชน์จากจุลินทรีย์โพรไบโอติก จุลินทรีย์จะต้องมีชีวิตรอดในทางเดินอาหารโดยจะต้องทนต่อกรดและน้ำดี ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีการศึกษาคุณสมบัติการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือ และเกลือน้ำดีของแบคทีเรียที่คัดเลือกอีกด้วย

ในการผลิตกล้าเชื้อโพรไบโอติกส่วนใหญ่จะผลิตอยู่ในรูปแช่แข็งแห้งเนื่องจากสะดวกในการขนส่งและเก็บรักษา (Champagne และคณะ. 1991 ; Gölker. 1993) แต่การผลิตกล้าเชื้อในรูปแช่แข็งแห้งมักเกิดปัญหาการรอดชีวิตและประสิทธิภาพของเชื้อที่ต่ำลงมากหลังจากผ่านการแช่แข็งแห้ง (Gilland. 1985) ดังนั้นจึงมีการทดลองนำสารป้องกันเซลล์มาใช้ในการป้องกันหรือบรรเทาการบาดเจ็บของเซลล์ในระหว่างที่เซลล์ถูกทำแห้งหรือเก็บรักษา (Champagne และคณะ. 1991 ; Souzu. 1992) สารป้องกันเซลล์ที่นำมาใช้ในการผลิตกล้าเชื้อได้แก่ แลคโตส ซูโครส โมโนโซเดียมกลูตาเมต (monosodium glutamate, MSG) และแอสคอร์เบต (ascorbate) ในน้ำนมหรือน้ำเป็นต้น (Mäyrä-Mäkinen และ Bigret. 1998) แต่ในสารบางชนิด เช่นนมถั่วเหลืองซึ่งมีสารประกอบที่มีคุณค่าหลายชนิด ได้แก่ โปรตีนในปริมาณสูงเช่นเดียวกับนมวัว และยังประกอบด้วย ไขมัน คาร์โบไฮเดรต แคลเซียม ฟอสฟอรัส วิตามิน (riboflavin) ธาตุเหล็ก และไทอามิน (thiamin) และไนอาซิน (niacin) (Liener. 1978) และไข่แดงซึ่งมีส่วนประกอบของโปรตีนถึงร้อยละ 33 และไขมันอีกหลายชนิด ได้แก่ ไตรกลีเซอไรด์ ฟอสโฟลิปิด และคลอเรสเตอรอล (Zeidler และคณะ. 1994) ที่อาจมีผลช่วยป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งแห้ง แต่ยังมีศึกษาไม่มากนัก ดังนั้นการศึกษาลักษณะของการป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งแห้งของสารทั้งสองชนิดนี้อาจทำให้ได้สารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งแห้งชนิดใหม่ๆ เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ถ้าหากใช้สารป้องกันเซลล์หลายๆ ชนิดร่วมกันอาจทำให้เชื้อโพรไบโอติกมีการอยู่รอดหลังการแช่แข็งแห้งสูงขึ้น ดังเช่นจากการศึกษาของ Palmfeldt และคณะ (2003) พบว่าเชื้อ *Pseudomonas chlororaphis* ในสารป้องกันเซลล์ที่ประกอบด้วยหางนม 50 กรัมต่อลิตร ทรีฮาโลส 50 กรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิก 1 กรัมต่อลิตร ทำให้เชื้อมีการอยู่รอดร้อยละ 4.3 ซึ่งสูงกว่าการใช้หางนมเป็นสารป้องกันเพียงอย่างเดียว (200 กรัมต่อลิตร) ที่มีอัตราการอยู่รอดเพียงร้อยละ 0.6 แต่อย่างไรก็ตามเชื้อโพรไบโอติกในสารป้องกันผสมเมื่อผ่านการแช่แข็งแห้งไม่สามารถอยู่รอดได้ทั้งหมด ดังนั้นจึงต้องศึกษาวิธีปรับปรุงการอยู่รอดให้ดีขึ้น หนึ่งในหลายวิธีการปรับปรุงการอยู่รอดคือการปรับตัวให้เกิดการป้องกันข้าม (cross protection) ที่เกิดจากการนำเชื้อมาปรับตัวต่อความเครียดหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิด ซึ่งช่วยให้ด้านทานต่อความเครียดอีกชนิดหนึ่งได้ (Juneja และ Novak. 2003) ซึ่งได้มีผู้วิจัยเกี่ยวกับการอยู่รอดของเชื้อ *Escherichia coli* 0517:H7 ที่ผ่านการเผชิญกับสภาพเครียดจากความร้อนพบว่าเชื้อสามารถทนต่อกรดได้ดีขึ้น (Wang และ Doyle. 1998) และในปี ค.ศ. 1996 Leu และ Yousef ได้นำเชื้อ *L. monocytogenes* ในระยะ exponential phase ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความเครียดอันเกิดจากสภาพแวดล้อมอยู่แล้วพบว่าเชื้อสามารถด้านทานต่อความร้อนที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง) และยังช่วยเพิ่มความต้านทานต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอทานอล และโซเดียมคลอไรด์ ได้อีกด้วย ขณะที่ Panoff และคณะ (2000) นำเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* CIP 101027T มาปรับตัวต่อความดันออสโมติกด้วยสารป้องกันเซลล์ชนิดต่างๆ ได้แก่ ไคเมททิลซัลฟอกไซด์ กลีเซอรอล แลคโตส ซูโครส และทรีฮาโลส ที่มีความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ในอาหารเหลว MRS และบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสามารถด้านทานต่อความเย็นได้มากขึ้น นอกจากการปรับตัวเพื่อให้เกิดการป้องกันข้ามนี้แล้ว การปรับตัวต่อความเย็นก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยให้เชื้อเพิ่มความต้านทานต่อการแช่แข็งและเก็บรักษาเชื้อโดยการแช่แข็ง (Béal และคณะ. 2001 ; Fernandez Murga และคณะ. 2000) ซึ่งปี ค.ศ. 1999 Wouter และคณะ ได้นำเชื้อ *Staphylococcus thermophilus* มาปรับตัวต่อความเย็นอย่างฉับพลันที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่ามีผลทำให้เชื้อมีอัตราการอยู่รอดหลังการแช่แข็งแห้งเพิ่มขึ้น และจากการศึกษาของ Kim และคณะ (1999) พบว่าเชื้อ *L. lactis* มีความต้านทานต่อการแช่แข็งแห้งเพิ่มขึ้นหลังจากการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะศึกษาผลของการปรับตัวของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ต่อความดันออสโมติกและการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นต่อการอยู่รอดหลังจากการแช่แข็งแห้งและการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งได้ดีขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นจากปลาสดและผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

1.2.2 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งมีคุณสมบัติการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก ที่มีค่าความเป็นกรดต่ำ โซเดียมคลอไรด์และเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูงได้ดี

1.2.3 เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้คัดเลือกโดยการศึกษาฐานวิธานวิทยา การทดสอบทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 50 CH และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

1.2.4 เพื่อศึกษาผลของการใช้สารป้องกันเซลล์ชนิดต่างๆ และทดสอบสูตรสารป้องกันผสมต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลคติก

1.2.5 เพื่อศึกษาผลของการปรับตัวของแบคทีเรียกรดแลกติกต่อความดันออสโมติก และการปรับตัวต่อแรงดันออสโมติกร่วมกับการปรับตัวต่อความชื้นต่อการอยู่รอดของเชื้อหลังการแช่แข็งแห้ง และเก็บรักษา

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นและสามารถทนต่อกรดแลกติก กรดไฮโดรคลอริก ที่มีค่าความเป็นกรดต่ำที่สุด โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงสุด จำนวน 2 ไอโซเลต พร้อมทั้งจำแนกชนิดแบคทีเรียกรดแลกติกที่ถูกคัดเลือก จากนั้นศึกษาผลของสารป้องกันเซลล์ชนิดต่างๆ และสูตรสารป้องกันผสมต่อการอยู่รอดของเชื้อหลังการแช่แข็งแห้ง และศึกษาผลของการปรับตัวต่อความดันออสโมติก และการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับการปรับตัวต่อความชื้นต่อการอยู่รอดของเชื้อหลังการแช่แข็งแห้งและเก็บรักษา

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น และสามารถทนต่อกรดแลกติก กรดไฮโดรคลอริก ที่มีค่าความเป็นกรดต่ำ โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง

1.4.2 ทราบสูตรผสมของสารป้องกันเซลล์ที่ทำให้แบคทีเรียโพรไบโอติกมีการอยู่รอดสูงหลังการแช่แข็งแห้งและเก็บรักษา

1.4.3 เป็นแนวทางในการผลิตกล้าเชื้อแช่แข็งแห้งของแบคทีเรียโพรไบโอติก ซึ่งอาจนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก และทำให้ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่ได้เป็นอาหารที่ปลอดภัยและเกิดประโยชน์ต่อผู้บริโภค

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียโพรไบโอติก

แบคทีเรียโพรไบโอติก (Probiotic) หมายถึงแบคทีเรียที่ดีมีประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดสารพิษ หรือสร้างสารพิษต่อร่างกาย สามารถเกาะกับผนังลำไส้ และทนอยู่ในกระเพาะอาหาร ได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทำให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์หรือสัตว์ ส่งผลให้เกิดการต้านทานของจุลินทรีย์ก่อโรครภายในลำไส้ แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกได้แก่แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้ หรืออาจเรียกว่าแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น เชื้อ *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis*, *S. thermophilus* และ *Bifidobacterium bifidum* ซึ่งแบคทีเรียดีมีประโยชน์เหล่านี้จะอาศัยอยู่ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ตั้งแต่เป็นทารก ทำหน้าที่ในการช่วยย่อยอาหาร และผลิตสารที่ดีมีประโยชน์ ซึ่งได้แก่ กรดอะมิโน กรดแลคติก พลังงาน วิตามินเค วิตามินบี และสารปฏิชีวนะธรรมชาติหลายชนิด (ธารารัตน์ สุภศิริ. 2542) ในปี ค.ศ. 1990 คำว่า โพรไบโอติก ถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรกในรายงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของ Lilly และ Stillwell (1965) ได้กล่าวถึงสารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งขับออกมาและช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่ตรงข้ามกับการทำงานของยาปฏิชีวนะที่จะทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด และในปี ค.ศ. 1989 Fuller ได้ให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกว่าเป็นอาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตสามารถปรับสมดุลจุลินทรีย์ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่

2.1.1 คุณสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติก

2.1.1.1 การปรับตัวต่อสภาวะเครียดของแบคทีเรียโพรไบโอติก

แบคทีเรียที่สามารถปรับตัวต่อสภาวะเครียดได้เกิดจากแบคทีเรียสามารถต้านทานต่อสภาวะเครียดที่เป็นชนิดเดียวกัน (homologous) หรือต่างชนิดกัน (heterologous) ทำให้แบคทีเรียสามารถรอดชีวิตในสภาวะเป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ เช่น เมื่อให้ความร้อนที่พอเหมาะกับแบคทีเรียอย่างฉับพลันพบว่าเซลล์ของแบคทีเรียจะเกิดการตอบสนองให้ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูงได้มากขึ้น (Bunning และคณะ. 1990)

2.1.1.2 การทนต่อกรด

เมื่อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้อาหารเน่าเสียเผชิญกับสภาพที่มีกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ในอาหารหรือในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ จะเกิดการตอบสนองต่อการทนกรด เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Acid Tolerance Response, ATR) ในหลายทาง ได้แก่การเปลี่ยนส่วนประกอบภายในเซลล์ โดยการเพิ่ม การไหลออกของโปรตอน การเพิ่มการสลายกรดอะมิโน และการเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเอนไซม์ที่มี หน้าที่ซ่อมแซม DNA จากการศึกษาในแบคทีเรียส่วนใหญ่พบว่า การตอบสนองการทนต่อกรดจะดี ยิ่งขึ้นเมื่อมีสภาวะเป็นกรดที่เหมาะสม ซึ่งจะชักนำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนที่ส่งเสริมให้แบคทีเรียมี ชีวิตรอดในสภาวะเป็นกรดมากๆ ได้ การตอบสนองการทนต่อกรดของเซลล์จะแตกต่างกันในระยะ exponential และระยะ stationary phase โดยการตอบสนองนี้จะแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ของ แบคทีเรีย (Yousef และ Courtney, 2003)

แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในกระเพาะอาหารจะต้องมีความสามารถในการทนต่อกรด โดยกรดไฮโดรคลอริกที่ถูกขับออกมาจากกระเพาะอาหารจะมีค่าพีเอชเท่ากับ 0.9 แต่เมื่อมีอาหารใน กระเพาะผสมรวมกับกรดภายในกระเพาะอาหารจะทำให้ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 3.0 (Ekkila และ Petaja, 2000)

2.1.1.3 การทนต่อน้ำดี

หลังจากอาหารเข้าสู่ร่างกายในกระเพาะอาหาร 2-4 ชั่วโมง ที่บริเวณส่วนต้นของ ลำไส้เล็กจะถูกกระตุ้นให้หลั่งน้ำดี และจะหลั่งออกมาสู่ลำไส้เล็กมากขึ้นหลังจากมีการดูดซึมไขมันและ แป้ง ซึ่งน้ำดีในส่วนนี้มีหน้าที่เป็นสารทำความสะอาดโดยจะทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ น้ำดีจึง เป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ อย่างไรก็ตามมีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถลดผลกระทบจาก น้ำดีได้ โดยการผลิตด้วย เอนไซม์ bile salt hydrolase (BSH) ที่สามารถ ไฮโดรไลซ์เกลือน้ำดีจึงทำให้ ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำดีลดลง (Ekkila และ Petaja, 2000) ทำให้แบคทีเรียสามารถทนต่อฤทธิ์ ของเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหารได้ กิจกรรม BSH พบได้ในแบคทีเรียกรดแลคติกหลายสายพันธุ์ เช่น *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* และ *Propionibacterium* เป็นต้น (Gilland และ Speck, 1977) โดยพบว่าจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถทนต่อสภาวะภายในระบบ ทางเดินอาหารในขณะที่มีการย่อยอาหารที่ชั่วโมงแรกจะมีความเข้มข้นของน้ำดีร้อยละ 1.5-2.0 น้ำหนัก ต่อปริมาตร และหลังจากนั้นระดับความเข้มข้นจะลดลงถึงร้อยละ 0.3 น้ำหนักต่อปริมาตร (Davenport, 1977) ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของน้ำดีในระบบทางเดินอาหารจะแตกต่างกัน แต่ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ น้ำดีในลำไส้ที่ใช้สำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติก เชื่อว่ามีความเข้มข้นอยู่ที่ร้อยละ 0.3 น้ำหนักต่อปริมาตร (Gilland และคณะ, 1984)

2.1.1.4. การทนต่อเกลือ

ในบางครั้งแบคทีเรียต้องเผชิญกับสภาพที่มีความดันออสโมติกสูง เช่น ในอาหารที่มี เกลือหรือน้ำตาลความเข้มข้นสูงหรือในเซลล์ที่ถูกทำให้แห้ง ภายใต้สภาวะดังกล่าวโดยธรรมชาติของ เซลล์จะรักษาสภาพภายในเซลล์ให้สามารถทนต่อความดันออสโมติกและการเกิดปฏิกิริยา hydration ในสภาพที่มีความดันออสโมติกสูง เซลล์ของแบคทีเรียจะมีกลไกการตอบสนองต่อความดันออสโมติก เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยการสะสมตัวถูกละลายที่มีขั้วภายในเซลล์หลายชนิดรวมกัน (Compatible solute) ซึ่งได้แก่ ไกลซีน บีเทน (Glycine betaine) โพรลีน (proline) แอคโตอิน (ectoine) คาร์นิทีน (carnitine) และทรีฮาโลส (trehalose) ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียสามารถต้านแรงดันออสโมติกที่เกิดขึ้น (Bremer และ Krämer. 2000)

2.1.2 ประโยชน์ของแบคทีเรียโพรไบโอติก

แบคทีเรียโพรไบโอติกมีหน้าที่และประโยชน์ต่อร่างกายดังนี้

1. กรดแลคติกที่แบคทีเรียโพรไบโอติกผลิตออกมาจะทำให้สภาวะภายในลำไส้มีความเป็นกรดมากพอที่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค
2. ทำให้ระบบขับถ่ายดีไม่เกิดการสะสมของเสียในร่างกายเป็นการลดอัตราเสี่ยงของการเกิดมะเร็งโดยเฉพาะอย่างยิ่งมะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งตับ
3. ไวตามินบีที่ได้อาจทำให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและยังทำให้มีการผลิตเม็ดเลือดแดงดีขึ้นด้วย
4. ช่วยยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและกำจัดสารก่อมะเร็งบางชนิด
5. ลดระดับน้ำตาลและโคเลสเตอรอลในเลือด
6. ผลิตเอนไซม์แลคเตส ซึ่งช่วยย่อยน้ำตาลในนมทำให้ไม่มีอาการท้องอืดจากการดื่มนม และช่วยการดูดแคลเซียมให้ดีขึ้น (ธารารัตน์ ศุภศิริ. 2542)

2.1.3 การคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติก

การคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกความสามารถในการอยู่รอดได้ดีและกิจกรรมของแบคทีเรียโพรไบโอติกเป็นสิ่งที่ต้องพิจารณาถึงก่อนนำโพรไบโอติกมาใช้เพื่อให้ได้โพรไบโอติกที่ทำงานได้อย่างเหมาะสม ได้มีรายงานผลการศึกษาพบว่าโพรไบโอติกที่ไม่มีชีวิตสามารถส่งผลที่เป็นประโยชน์ซึ่งได้แก่ ช่วยควบคุมระบบภูมิคุ้มกันและช่วยให้มีการจับของสารก่อมะเร็งในร่างกาย ดังนั้นในกรณีของเชื้อโพรไบโอติกบางสายพันธุ์นั้นอาจเพียงพอที่จะเจริญได้เป็นอย่างดีในระหว่างขั้นตอนแรกของการผลิต (เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ในปริมาณมากพอในผลิตภัณฑ์) แต่เชื้อโพรไบโอติกไม่จำเป็นอยู่รอดได้ดีในระหว่างเก็บรักษา ซึ่งการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะต้องพิจารณาถึงลักษณะต่างๆ ดังนี้

1. การทนต่อกรดและความสามารถในการทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหารของมนุษย์
2. การทนต่อน้ำดีซึ่งสำคัญต่อการอยู่รอดในลำไส้เล็ก
3. ความสามารถในการยึดติดกับผนังของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์
4. การกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคแต่ไม่ส่งผลให้เกิดการอักเสบ
5. ต่อด้านจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคได้แก่ *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp.,

L. monocytogenes และ *Clostridium difficile*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการคัดเลือกกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างกรด เป็นหนึ่งในลักษณะที่มีความสำคัญมากที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกจะต้องคำนึงถึงหลักการที่เกี่ยวข้องกับการส่งผลทำให้มนุษย์มีสุขภาพที่ดีขึ้น ในขณะที่สภาพแวดล้อมภายในระบบทางเดินอาหารและในอาหารอาจค่อนข้างแตกต่างกันมาก ซึ่งบ่อยครั้งพบว่าโพรไบโอติกไม่เหมาะที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับอาหารหมัก (Oberman และ Libudzisz. 1998 ; German และคณะ. 1999) ซึ่งอัตราการเจริญของเชื้ออาจช้าและอาจส่งผลให้เกิดรสชาติและกลิ่นผิดปกติ (off-flavours) (Svensson. 1999) การปรับปรุงอาหารเพื่อให้มีความเหมาะสมสำหรับเป็นสับสเตรทของโพรไบโอติกอาจเติมแหล่งพลังงาน (ตัวอย่างเช่น กลูโคส) ปัจจัยที่ทำให้เชื้อเจริญเติบโตซึ่งได้แก่ ยีสต์สกัด และไฮโดรไลซ์โปรตีน หรือสารต้านออกซิเดชัน กลีโกลี หรือ ไวตามิน เพิ่มลงในอาหาร (Kurmann. 1988 ; Ishibashi และ Shimamura. 1993 ; Dave และ Shah. 1998 ; Gomes และคณะ. 1998) ซึ่งข้อควรพิจารณาหลายประการในการคัดเลือกโพรไบโอติกมีดังนี้

1. คุณสมบัติที่ดีทางประสาทสัมผัส
2. การต่อต้านฟาจ (phage)
3. ความสามารถในการอยู่รอดได้ในระหว่างกระบวนการแปรรูป
4. ความคงตัวในผลิตภัณฑ์และในระหว่างการเก็บรักษา

ปัจจุบันผู้นำในทางด้านการผลิตกล้าเชื้อส่วนใหญ่ใช้แบคทีเรียกรดแลคติกร่วมกับ bifidobacteria มาใช้ผลิตกล้าเชื้อเพื่อการค้า (Mogensen และ Friis. 1979) เชื้อโพรไบโอติกทางการค้าที่หาได้อาจประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียวหรือเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดผสมกัน โดยส่วนใหญ่คุณสมบัติของโพรไบโอติกได้รับผลกระทบในระหว่างขั้นตอนต่างๆ ของการผลิต (German และคณะ. 1999) ดังนั้นผู้ผลิตควรทราบข้อมูลเฉพาะด้านคุณสมบัติของจุลินทรีย์สายพันธุ์นั้นๆ เพื่อนำมาใช้ในการปรับกระบวนการให้เหมาะสม เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกอาจจะผสมในสูตรอาหารพิเศษที่มีลักษณะเป็นแคปซูลหรือเม็ดหรืออาจถูกนำมาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมักมากมายหลายประเภท ในบางกรณีอาจนำเชื้อโพรไบโอติกมาเติมลงในอาหารเพื่อช่วยให้อาหารมีคุณสมบัติของโพรไบโอติกหรือมีการทำหน้าที่ของโพรไบโอติกได้อย่างเหมาะสม ซึ่งการที่แบคทีเรียกรดแลคติกมีประโยชน์มากจึงได้รับความสนใจมากในการนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาผลิตเป็นกล้าเชื้อ probiotic lactic acid bacteria ที่มีความคงทน ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ที่มีชีวิตและไม่บาดเจ็บจำนวนมาก ในสมัยก่อนที่จะมีการใช้กล้าเชื้อการเก็บรักษาเชื้อในรูปของของเหลวและในรูปแช่แข็งกันมาก แต่การเตรียมเชื้อในรูปของกล้าเชื้อผงที่ผ่านการแช่แข็งแห้ง (freeze-dried) และสเปรย์คราย (spray-dried) จะช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายได้อย่างมาก (Champagne และคณะ. 1991 ; Gölker. 1993) ถึงแม้ว่าการผลิตในรูปสเปรย์ครายจะประหยัดกว่าการแช่แข็งแห้งโดยเฉพาะเมื่อผลิตเป็นจำนวนมาก (Gölker. 1993 ; Johnson และ Etzel. 1993) แต่แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนมากไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิที่ค่อนข้างสูงที่ใช้ในระหว่างการทำสเปรย์ครายได้ (Porubcan และ Sellars. 1979) ด้วยเหตุนี้การแช่แข็งแห้งจึงเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อผู้ใช้ได้เห็นใบโฆษณาแล้วให้นำไปใช้
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แม้ว่าการแช่แข็งแห้งเป็นอันตรายกับเชื้อน้อยกว่าการสเปรย์คราย (Porubcan และ Sellars. 1979) แต่อาจเพิ่มการป้องกันเซลล์ได้โดยเคมีสารที่ช่วยป้องกันเซลล์ (protectants) จากการบาดเจ็บในระหว่างที่เซลล์ถูกทำให้แห้งและการเก็บรักษา (Champagne และคณะ. 1991 ; Souzu. 1992) สารป้องกันที่ถูกนำมาใช้ได้แก่ แลคโตส ซูโครส โมโนโซเดียมกลูตาเมต (monosodium glutamate, MSG) และ แอสคอร์เบท (ascorbate) ในนมหรือในน้ำ (Mäyrä-Mäkinen และ Bigret. 1998)

กล้ำเชื้อโพรไบโอติกทางการค้าส่วนมากจะเตรียมในรูปที่มีความเข้มข้นสูงและส่วนใหญ่ผลิตขึ้นเพื่อนำมาใช้ได้โดยตรง (direct vat set, DVS) (Honer. 1995) การใช้เชื้อที่มีความเข้มข้นสูง (highly concentrated DVS cultures) เป็นวิธีที่นิยมมากเนื่องจากสะดวกกว่าการเลี้ยงเชื้อเองซึ่งจะทำให้ค่อนข้างยาก นอกจากนี้เชื้อ DVS culture มีทั้งในรูปเชื้อเข้มข้นที่ผ่านการแช่แข็งหรือในรูปแช่แข็งแห้งโดยทั่วไปแล้วเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (deep-frozen) จะมีจำนวนเซลล์มากกว่า 10^{10} โคโลนีต่อกรัม ขณะที่เชื้อที่อยู่ในรูปแช่แข็งแห้งมีจำนวนเชื้อมากกว่า 10^{11} โคโลนีต่อกรัม (Oberman และ Libudzisz. 1998) ซึ่งความเข้มข้นของเซลล์ต่อกรัมของผลิตภัณฑ์จะแปรผันขึ้นกับเชื้อจุลินทรีย์และชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้

2.2 วิธีการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกมีประวัติมานานนับศตวรรษและเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่พบในธรรมชาติ แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถพบในนมและทำให้นมเปรี้ยวแต่ก็ยังสามารถพบแบคทีเรียชนิดนี้ในแหล่งอื่นๆ อีกมากมาย โดยพบว่าย้อมติดแกรมบวก ไม่มีสปอร์ และเจริญได้ดีในสภาวะไร้อากาศ การศึกษาลักษณะและการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทำได้ดังนี้ (Orla-Jensen. 1919)

2.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

การจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทำได้โดยศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ ได้แก่ รูปร่างกลมหรือแท่ง ต่อมาได้มีผู้ค้นพบแบคทีเรียกลุ่มนี้และได้จัดจำแนกเชื้อรูปร่างแท่งไว้หลายสกุล ได้แก่ *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* และ *Carnobacterium* เชื้อรูปร่างกลมซึ่งแบ่งเซลล์ 2 ระบายเป็นสี่เซลล์ ได้แก่ *Aerococcus*, *Pediococcus* และ *Tetragenococcus* และเชื้อรูปร่างกลมเรียงตัวเป็นคู่หรือสายโซ่ ได้แก่ *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* และ *Leuconostoc* ปัจจุบันมีการเสนอสกุลใหม่เพิ่มเติมจากเดิม ได้แก่ *Weissella*, *Alloliococcus*, *Atopobium*, *Oenocococcus*, *Lactosphaera* และ *Paralactobacillus* (De Vuyst และ Vandamme. 1994)

2.2.2 การศึกษารูปแบบการหมักสารประเภทคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate fermentation)

การศึกษารูปแบบการหมักสารประเภทคาร์โบไฮเดรต เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้จำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตแตกต่างกันมาก ดังนั้นจึงเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นวิธีที่ใช้ในการจำแนกเชื้อแบคทีเรียได้เป็นสายพันธุ์ต่างๆ โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในอาหารที่ใส่ธาตุอาหารบางอย่างลงไปแล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น การเกิดกรด การเกิดแก๊ส การเกิดสารบางชนิด เป็นต้น (Bridge และ Sneath. 1982)

2.2.3 การศึกษาชนิดของแบคทีเรียโพรไบโอติกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA เป็นวิธีที่ใช้เครื่องมือในการติดตามความสัมพันธ์ของสายพันธุ์แบคทีเรียและจำแนกชนิดของแบคทีเรียจากแหล่งกำเนิดที่หลากหลาย ได้แก่ จากสภาพแวดล้อม หรือโรงพยาบาล เช่น ในตัวอย่าง เลือด หรือ ปัสสาวะ การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ปัจจุบันได้ถูกนำมาใช้ในห้องทดลองเพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติหรือแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ยากต่างจากแบคทีเรียทั่วไป นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกแบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงกันได้โดยใช้วิธีที่มีระเบียบแบบแผน การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA พื้นฐานได้รับความสนใจเนื่องจากไรโบโซม SSU ที่มีอยู่ทั่วไปในแบคทีเรียและเป็นบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงจำเพาะของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ โดยลักษณะของบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงจำเพาะนี้ทำให้สามารถจำแนกชนิดหรือในระดับสายพันธุ์ของแบคทีเรียโดยการเปรียบเทียบข้อมูลจาก public domain (Vandamme และคณะ. 1996)

อย่างไรก็ตามการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีนี้ในบางกรณีอาจไม่ได้ผลเนื่องจากการจำแนกในระดับสายพันธุ์พบว่ามีส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกันทุกประการทำให้ไม่สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ ซึ่งได้แก่เชื้อ *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* และ *Streptococcus pneumoniae* นอกจากนี้ลักษณะที่ดีของลำดับนิวคลีโอไทด์ควรได้รับการตรวจทานและแก้ไขให้ถูกต้อง เช่นการตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์โดยโครมาโตแกรม (chromatogram) ในจุดสูงสุดที่เกิดการซ้อนทับกันทำให้ได้หลายลำดับนิวคลีโอไทด์ส่งผลให้ฐานข้อมูลที่ได้มาไม่ถูกต้อง และพบว่าถ้าเกิดความไม่แน่ชัดของตำแหน่งมากกว่าร้อยละ 1 จะทำให้เกิดความขัดแย้งกันในการตีความหมายลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการซ้อนทับกันของโครมาโตแกรมนี้อาจเกิดจากการปนกันของเชื้อทำให้องค์ประกอบโมเลกุลของเชื้อที่ได้ไม่ถูกต้องและทำให้ข้อมูลของตะกอนโมเลกุลที่ได้มีผิดพลาดส่งผลให้ไม่พบสายพันธุ์ของแบคทีเรียจากฐานข้อมูล ด้วยเหตุนี้การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อก่อนทำการวิเคราะห์จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย (Mignard และ Flandrois. 2006) วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA นี้มีการใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบันเพราะช่วยเพิ่มปริมาณ DNA ที่มีอยู่อย่างจำกัดให้มีปริมาณมากขึ้นรวมถึงสารพันธุกรรมชนิดอื่นๆด้วย และได้มีการดัดแปลงพัฒนาวิธีการ พีซีอาร์ (PCR) ให้มีความหลากหลายและใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสมยิ่งขึ้น เช่น การใช้ enzyme reverse transcription เพื่อเปลี่ยน RNA ให้เป็น DNA ก่อนแล้วจึงเข้าสู่ขั้นตอนพีซีอาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.1 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction) หรือพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกับดีเอ็นเออื่น โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน สามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจได้โดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปโคลน การทำพีซีอาร์คือการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสซ้ำกันหลายๆรอบ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้จำเป็นต้องมีไพรเมอร์ด้วย ดังนั้นจึงใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่มีคู่เบสคู่สมกับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายและมีปลาย 3' ในทิศทางเข้าหากัน (รูปที่ 2.1) ดังนั้นข้อกำหนดในการทำพีซีอาร์คือต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจทราบลำดับเบสทั้งหมดหรือเฉพาะส่วนปลายก็ได้ เพื่อการออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์มาใช้ในปฏิกิริยาต่อไป บริเวณหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้นจะมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลาย 5' ของไพรเมอร์หนึ่งถึงปลาย 5' ของไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่ง

ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์มีความยาวประมาณ 20-35 เบส วิธีทำคือสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์นำมาใส่รวมกับไพรเมอร์ บัฟเฟอร์ ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้ความร้อนและลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วเพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายและมีปริมาณมากกว่าชิ้นดีเอ็นเออื่นๆ มากมายเข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ (annealing) ขั้นสุดท้ายจึงเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสพร้อมทั้งใส่เอนไซม์ลงในปฏิกิริยา เอนไซม์จะทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เช่น จากเดิมมี 1 โมเลกุลจะเพิ่มเป็น 2 โมเลกุล ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกัน (denaturation-annealing-extension) หลายรอบ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นจาก 1 เป็น 2, 4, 8 เท่า ไปเรื่อยๆ จนถึง 2^n เท่า เมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ

เนื่องจากเทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ไวมากสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นล้านๆ เท่า ได้อย่างรวดเร็วใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียงเล็กน้อยก็สามารถตรวจสอบได้ ดังนั้นจึงต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากภายนอก เช่น จากอากาศ ผิวหนัง ผม เป็นต้น เพื่อป้องกันปัญหาดังกล่าวจึงควรทำพีซีอาร์ในบริเวณที่สะอาดไม่ปะปนกับการทดลองอื่น อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ควรสะอาดมีคุณภาพสูง แยกเด็ดขาดจากการทดลองอื่น สวมถุงมือในการปฏิบัติงาน และมีหลอดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ (negative control) ในการทดลองทุกครั้ง การปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากภายนอกนี้เป็นปัญหาที่สำคัญมากในการทดลองเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยๆ เช่น ตรวจดีเอ็นเอของแบคทีเรียจาก

อาหาร ดีเอ็นเอของแบคทีเรียหรือไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในคนเป็นต้น ในการทำพีซีอาร์ต้องใช้สารเคมีต่างๆ ดังนี้

1. บัฟเฟอร์สำหรับทำปฏิกิริยา ซึ่งมักจะมาพร้อมกับเอนไซม์ Tag polymerase โดยมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของที่จะใช้จริง (10x buffer) ซึ่งจะใส่ปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมของปฏิกิริยา

2. dNTP ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิโมลาร์ โดยอาจซื้อสำเร็จหรือซื้อมาแต่ละชนิดแล้วจึงนำมารวมกันให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ ในปฏิกิริยาจะใส่ในปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวม เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์

3. ไพริเมอร์ ที่นิยมใช้คือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 20-24 นิวคลีโอไทด์ มีองค์ประกอบของเบส G และ C อยู่ระหว่างร้อยละ 40-60 โดยไพริเมอร์ทั้งสองชนิดที่ใช้คู่กันควรมีส่วนประกอบของเบส G+C เท่ากัน เพื่อให้ค่า Tm (melting temperature) เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน และไม่ควรใช้ไพริเมอร์ที่มีลักษณะปลาย 2 ข้างเป็นคู่สมกัน (palindrome sequence) ทั้งภายในไพริเมอร์เดียวกันและระหว่างไพริเมอร์ทั้ง 2 ชนิดที่ใช้คู่กัน แต่ในบางกรณีก็พบว่าอาจจะใช้ไพริเมอร์ที่มีลักษณะไม่เหมาะสมดังกล่าวได้บ้าง การออกแบบไพริเมอร์อาจทำได้จากลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณโดยตรงหรือใช้โปรแกรมสำเร็จรูปก็ได้ เมื่อสังเคราะห์ไพริเมอร์เรียบร้อยแล้วจึงนำมาละลายในน้ำหรือ TE buffer ที่มีความเข้มข้น 5 พิโคโมลต่อลิตร (หรือ 5 ไมโครโมลาร์) ปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยาคือให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1-2.0 ไมโครโมลาร์

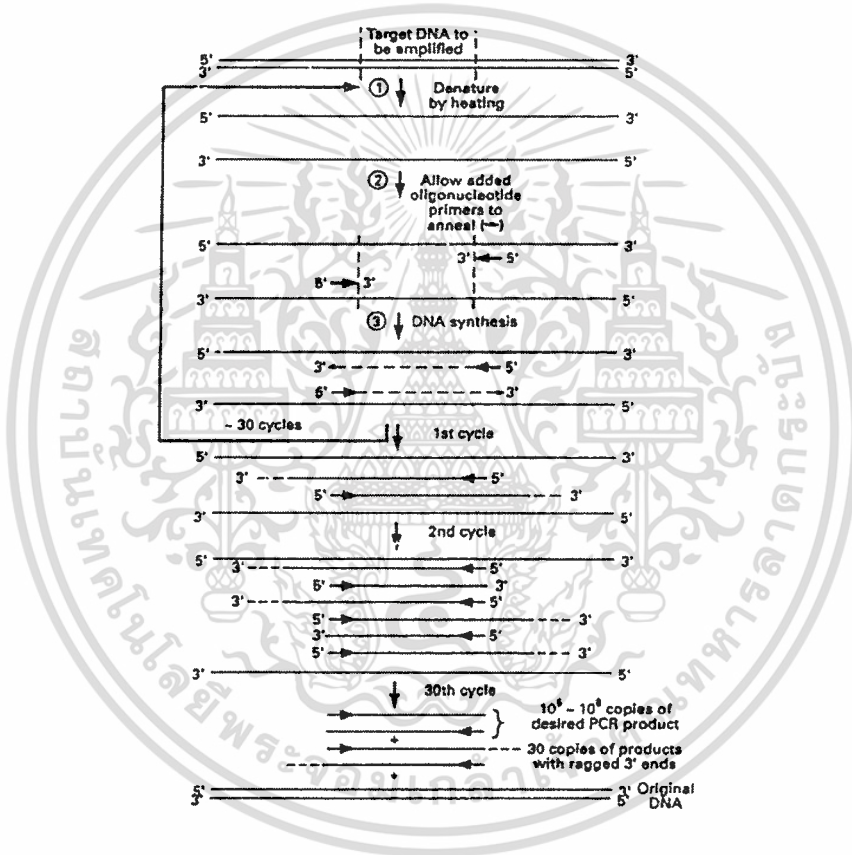
4. ดีเอ็นเอเป้าหมาย ใช้ได้ทั้งดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและดีเอ็นเอที่มีคุณภาพไม่ดีนัก เช่น ดีเอ็นเอจากหยดเลือด เนื้อเยื่อที่เก็บในพาราฟินเป็นต้น แต่ถ้าใช้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีจะได้ผลผลิตมากกว่า ปริมาณดีเอ็นเอใช้ได้ตั้งแต่ 5-500 นาโนกรัม โดยทั่วไปนิยมใช้อยู่ในช่วง 10-50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา

5. แมกนีเซียมคลอไรด์ ซึ่งอาจรวมอยู่ในบัฟเฟอร์ก็ได้ แต่ส่วนใหญ่จะแยกต่างหาก เพื่อให้ปรับใช้ได้ ในปริมาณที่เหมาะสมกับดีเอ็นเอแต่ละชนิด เนื่องจากแมกนีเซียมไอออนเป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์พอลิเมอเรส และมีรายงานว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนมีผลต่อปฏิกิริยามาก ดังนั้นในการทดลองกับตัวอย่างชนิดใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน จึงควรทดลองปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ก่อนเพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด ความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ใช้ในปฏิกิริยาคือ 1.5-10 มิลลิโมลาร์

6. เอนไซม์ เนื่องจากขั้นตอนในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ต้องมีการทำให้ดีเอ็นเอเสถียรภาพด้วยความร้อน เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่ใช้จึงเลือกใช้เอนไซม์ที่ทนความร้อนได้ (thermostable DNA polymerase) เอนไซม์ชนิดแรกแยกได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* YT1 ทำงานได้ที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมได้สูงสุดที่พีเอช 7.3-8.9 ชนิดที่ 2 แยกได้จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารทบทวนเนื้อหาสำหรับการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียเดียวกันเป็นชนิดที่คนใช้กันมากรู้จักกันในชื่อ Taq polymerase ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส และต่อมาสามารถแยกเอนไซม์ได้อีกหลายชนิดจากแบคทีเรียต่างๆ โดยทุกชนิดที่แยกได้ประกอบด้วยโพลีเพปไทด์เพียงสายเดียว (monomer) ขนาดอยู่ระหว่าง 61-100 กิโลดาลตัน ความแตกต่างของเอนไซม์แต่ละชนิดคือการมีคุณสมบัติตัดดีเอ็นเอจากปลาย (exonuclease activity) เพราะเอนไซม์ที่สามารถตัดดีเอ็นเอจากปลาย 3' (3'→5' exonuclease) จะสามารถกำจัดนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ผิดพลาดได้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545)



รูปที่ 2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์

ที่มา : Strachan. 1992

2.3 การตอบสนองต่อสภาพเครียดจากความดันออสโมติก

โดยทั่วไปเซลล์แบคทีเรียและเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นมีผนังเซลล์ที่สามารถรักษาความเข้มข้นของน้ำภายในเซลล์ให้อยู่ที่ระดับหนึ่งซึ่งต่ำกว่าภายนอกเซลล์เพื่อให้เกิดกิจกรรมภายในเซลล์ที่เหมาะสมเมื่อมีความแตกต่างของปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ (a_w) ทำให้มีแนวโน้มที่น้ำจะไหลเข้าไปในเซลล์ส่งผลให้เกิดแรงดันอุทกสถิตศาสตร์ (hydrostatic pressure) ซึ่งแรงดันนี้เมื่อเกิดขึ้นภายในเยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) และกระทำต่อผนังเซลล์จะเรียกว่าแรงดันเต่ง (Turgor pressure) หรือการบวม (turgor) เมื่อแรงดันเต่งเพิ่มขึ้นเยื่อหุ้มเซลล์จะดันผนังเซลล์ปริมาตรน้ำของเซลล์เพิ่มขึ้นทำให้เซลล์ขยายออก ในทางกลับกันถ้าแรงดันเต่งลดลงจะทำให้ปริมาตรของเซลล์ลดลงเช่นกัน จึงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงขนาดของเซลล์ แรงตึงผิว และความเข้มข้นของตัวถูกละลายภายใน cytoplasm (Csonka, 1989)

2.3.1 ความดันออสโมติก (Osmotic pressure)

ความดันออสโมติกหมายถึง ความดันอุทกสถิต (hydrostatic pressure) ที่เกิดขึ้นในเซลล์ สมมติว่ามีช่องที่ถูกแบ่งออกเป็นสองส่วนเหมือนกันซึ่งเปิดสู่สภาพบรรยากาศและถูกแยกแต่ละช่องด้วยเยื่อหุ้มที่ยอมให้สารบางชนิดผ่านได้ตามแนวทาง โดยถ้าช่องที่ 1 เต็มด้วยน้ำบริสุทธิ์ และช่องที่ 2 เต็มด้วยน้ำและตัวถูกละลายที่ไม่สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มได้ในปริมาณเท่ากัน เพราะฉะนั้นความเข้มข้นของน้ำในช่องที่ 2 น้อยกว่าน้ำบริสุทธิ์ในช่องที่ 1 ทำให้โมเลกุลของน้ำจะแพร่ผ่านเยื่อจากช่องที่ 1 ไปยังช่องที่ 2 ทำให้น้ำในช่องที่ 1 ลดลง ซึ่งการเคลื่อนย้ายของน้ำนี้เป็นสาเหตุทำให้ระดับน้ำของช่องที่ 1 ลดลง และช่องที่ 2 มีน้ำเพิ่มมากขึ้นเกิดความดันอุทกสถิต การแพร่ของน้ำจากช่อง 1 ไปยังช่องที่ 2 นี้จะดำเนินไปอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งเกิดความสมดุลของน้ำ (Csonka, 1989)

จากตัวอย่างข้างต้นถ้าสารละลายที่บรรจุในช่องที่ 2 สามารถแพร่สู่อีกช่องหนึ่งได้อย่างอิสระและเยื่อหุ้มที่กั้นระหว่าง 2 ช่องนั้นไม่สามารถยืดหยุ่นได้ทำให้ปริมาตรของสารละลายในช่องที่ 2 ไม่สามารถขยายได้ทำให้เกิดความดันในช่องที่ 2 เพิ่มขึ้น โดยถ้าเป็นเซลล์ของแบคทีเรียและพืชซึ่งมีผนังเซลล์ที่แข็งอยู่รอบๆ เยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) เมื่อน้ำแพร่เข้าสู่เซลล์จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สามารถขยายได้เพียงพื้นที่ด้านในของผนังเซลล์เท่านั้น และเมื่อน้ำแพร่เข้าสู่เซลล์มากขึ้นจะทำให้เกิดแรงดันของเยื่อหุ้มเซลล์ดันไปที่ผนังเซลล์ ซึ่งแรงดันนี้เรียกว่าแรงดันเต่ง (turgor pressure) (Csonka, 1989)

ในขณะที่เซลล์ของแบคทีเรียซึ่งมีเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นเยื่อเลือกผ่านซึ่งมีลักษณะยอมให้น้ำสามารถผ่านเข้าไปได้ แต่ไม่ยอมให้ตัวถูกละลายที่มีอยู่ในอาหารและสารเมตาโบไลต์ที่มีอยู่ใน cytoplasm ผ่านได้ เมื่อภายนอกเซลล์มีน้ำที่เซลล์สามารถนำไปใช้ได้ต่ำ (สภาวะที่มีความดันออสโมติกสูง) ส่งผลให้เกิดการไหลออกของน้ำอย่างรวดเร็วและสูญเสียแรงดันเต่งทำให้เซลล์อาจสูญเสียน้ำได้มากที่สุดและทำให้เกิดการหดกลับของเยื่อหุ้มเซลล์จากผนังเซลล์ (Csonka, 1989)

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 สภาพเครียดต่อความดันออสโมติก (Osmotic stress)

สภาพเครียดต่อความดันออสโมติกหมายถึงสภาพเครียดของการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อมที่มีความดันออสโมติกสูง (high osmolality) สภาพเครียดต่อความดันออสโมติกมีผลต่อการเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรียซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับค่า a_w ภายนอกเซลล์ ค่า $a_w = P/P_o = n_1/(n_1+n_2)$ เมื่อ P คือความดันไอของสารละลาย P_o ความดันไอของตัวทำละลาย (น้ำบริสุทธิ์) n_1 คือจำนวนโมลของตัวทำละลาย และ n_2 คือจำนวนโมลของตัวถูกละลายในอุดมคติ การลดต่ำลงของความดันไอเป็นคุณสมบัติหนึ่งของสารละลายเช่นเดียวกับการลดต่ำลงของจุดเยือกแข็ง การเพิ่มขึ้นของจุดเดือด และการเพิ่มขึ้นของความดันออสโมติก ความดันออสโมติกก็คืออุทกสถิตศาสตร์ (hydrostatic pressure, มีหน่วยเป็นเมกกาปาสกาล) ความเข้มข้นตัวถูกละลายที่แท้จริง (actual solute) แสดงในรูปของตัวถูกละลายในอุดมคติ (ideal solute) ที่ให้ค่า a_w ระดับเดียวกันและมีหน่วยเป็น osmolal (OSM) ความสัมพันธ์ระหว่าง a_w และความดันออสโมติกแสดงได้ดังสมการดังนี้คือ $a_w = x/(x+c)$ ซึ่ง c หมายถึงความเข้มข้นของตัวถูกละลายมีหน่วยเป็น OSM และ x คือจำนวนโมลของน้ำต่อลิตร ซึ่งมีจำนวนโมลประมาณ 55.6 (Ingraham และ Marr. 1996)

2.3.3 กลไกการควบคุมความดันออสโมติก (Osmoregulatory mechanism)

กลไกการควบคุมความดันออสโมติก เป็นกลไกที่ช่วยรักษาความดันเต่งภายในเซลล์ให้อยู่ในระดับที่เซลล์สามารถทนได้ โดยทั่วไปพบว่าเมื่อเซลล์เผชิญกับความดันออสโมติกสูงภายนอกเซลล์หรือสภาวะที่มีตัวถูกละลายภายนอกเซลล์สูงหรือปริมาณน้ำภายนอกเซลล์ต่ำกว่าภายในเซลล์ (hyperosmotic condition) เป็นผลให้เกิดการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ทำให้เกิดการลดลงของแรงดันเต่งและเกิดการลดลงของปริมาตรไซโตพลาสซึม (cytoplasmic volume) เป็นผลให้ความเข้มข้นของสารเมตาโบไลต์ทั้งหมดภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้ค่า a_w ภายในเซลล์ลดลง ถ้าภายในเซลล์ไม่มีการปรับตัวต่อสภาพความดันออสโมติกสูงเซลล์จะเหี่ยวจนกระทั่งค่า a_w ภายในเซลล์เท่ากับค่า a_w ภายนอกเซลล์ ความเข้มข้นที่สูงขึ้นของโมเลกุลต่างๆ ภายในเซลล์อาจทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ ตัวอย่างเช่น ตัวยับยั้งเอนไซม์จำเพาะอาจมีความเข้มข้นสูงขึ้นจนเป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ (Atkinson. 1969) หรือความเข้มข้นของไอออนที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นพิษต่อเซลล์ได้ (Walderhaug และคณะ. 1987)

ในทางตรงกันข้ามถ้าหากมีตัวถูกละลายอยู่น้อยหรือมีปริมาณน้ำมาก (hypothesis) น้ำภายนอกเซลล์จะเข้าสู่เซลล์ทำให้ความดันเต่งเพิ่มขึ้นเป็นผลให้เซลล์ขยายปริมาตรขึ้นดังนั้นการที่แบคทีเรียจะสามารถอยู่รอดในสภาพเครียดจากความดันออสโมติกได้นั้น เซลล์ของแบคทีเรียจำเป็นต้องปรับตัวโดยการสะสมตัวถูกละลายโดยเฉพาะภายใต้สภาวะที่มีความดันออสโมติกสูง (hyperosmotic) และปลดปล่อยภายใต้สภาวะความดันออสโมติกต่ำ (hypoosmotic) ตัวถูกละลายนี้เรียกว่า compatible solute ซึ่งก็คือสารประกอบที่เซลล์สามารถสะสมได้ในความเข้มข้นสูงมากๆ เพียงพอที่จะรักษาสมดุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของความดันเต่งเมื่อภายนอกเซลล์มีความดันออสโมติกสูงโดยที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ ตัวอย่างของตัวถูกละลายนี้ได้แก่โพแทสเซียมไอออน (K^+) กรดอะมิโน กลูตามัท (glutamate) กลูตามีน (glutamine) โพรลีน (proline) แกรมมาอะมิโนบิวไทเรท (γ -aminobutyrate) อะลานีน (alanine) ไกลซีนบีเทน (glycinebetaine) กรดอะมิโน N-methylated ซูโครส (sucrose) ทรีฮาโลส (trehalose) กลูโคซิลกลีเซอรอล (glucosylglycerol) (Csonka. 1989 ; Galinski และ Trüper. 1994) โดยตัวถูกละลายเหล่านี้สามารถสะสมให้เพิ่มมากขึ้นภายในเซลล์จากการสังเคราะห์ขึ้นเองหรือจากการรับจากสิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์ โดยไม่มีผลในการขัดขวางกระบวนการสำคัญภายในเซลล์ และยังมีผลในทางป้องกันเซลล์ โดย compatible solute หลายชนิดได้ถูกพิสูจน์ว่ามีผลทำให้เอนไซม์ภายในเซลล์มีความเสถียร และยังมีผลในทางป้องกันเซลล์ไม่เพียงแต่ป้องกันเซลล์ต่อสภาพที่มีเกลือสูงเท่านั้นยังป้องกันเซลล์ต่อสภาพที่มีอุณหภูมิที่สูง สภาพในการแช่แข็งและทำให้ละลาย และสภาพในการทำแห้งได้อีกด้วย (Yancey และคณะ. 1982)

2.3.4 Compatible solute

ความดันออสโมติกของไซโตพลาสซึม (cytoplasmic osmolality) เกิดขึ้นภายในเซลล์เนื่องจากสารที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมจำนวนมากที่มีความเข้มข้นไม่แตกต่างกับภายนอกเซลล์กับตัวถูกละลายที่มีปริมาณน้อยภายในเซลล์ ซึ่งความเข้มข้นของตัวถูกละลายนี้จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นภายนอกเซลล์ โดยตัวถูกละลายที่จะเป็นตัวกำหนดความดันออสโมติกภายในเซลล์นี้ถูกเรียกว่า compatible solute เนื่องจากส่วนใหญ่จะไม่ขัดขวางกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์แม้แต่ที่ความเข้มข้นสูง (Brown. 1990) compatible solute สามารถที่จะสะสมในเซลล์ของแบคทีเรียโดยการสังเคราะห์หรือโดยรับสารจากอาหารเลี้ยงเชื้อภายนอกเข้าสู่เซลล์ ซึ่ง compatible solute แต่ละชนิดมีผลต่อการทนต่อสภาพเครียดจากความดันออสโมติกของเซลล์ได้แตกต่างกันและแบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถสะสมตัวถูกละลายต่างชนิดกัน (ตารางที่ 2.1) เช่น โพแทสเซียมไอออน (K^+) กลูตามัท (glutamate) และไอออนชนิดอื่นๆ ที่มีความเข้มข้นสูงก็สามารถยับยั้งเอนไซม์หลายชนิดได้ (Richey และคณะ. 1987) แต่ในสภาพที่มีความดันออสโมติกที่ต่ำกว่า 0.25 OSM โพแทสเซียมไอออน (K^+) และกลูตามัท (glutamate) จะเป็นตัวควบคุมความดันออสโมติกภายในเซลล์แต่ที่ความดันออสโมติกสูงเซลล์ชอบที่จะสะสม compatible solute ที่ไม่มีประจุ (neutral compatible solute)

ตารางที่ 2.1 การสะสมสาร Compatible solute ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

ชนิดของจุลินทรีย์	การควบคุมสภาพเครียดจากความดัน		เอกสารอ้างอิง
	ออสโมติก		
	Compatible solute	สังเคราะห์/รับเข้า	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO 3532	Glycine betaine	รับเข้า	Hutkins และคณะ. 1987
<i>L. plantarum</i> ATCC 14971	Glycine betaine	รับเข้า	Glaasker และคณะ. 1996
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG 1363	Glycine betaine	รับเข้า	van der Heide และ Poolman. 2000
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL 1403	Glycine betaine	รับเข้า	van der Heide และ Poolman. 2000
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ML3	Glycine betaine	รับเข้า	van der Heide และ Poolman. 2000
<i>Staphylococcus aureus</i>	Proline	รับเข้า	Csonka. 1989
<i>Escherichia coli</i>	Proline	รับเข้า	Csonka. 1989
<i>Salmonella typhimurium</i>	Proline	รับเข้า	Csonka. 1989
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Proline	รับเข้า	Csonka. 1989

โดย neutral compatible solute ชนิดสำคัญที่สะสมในเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอริก (enteric bacteria) ได้แก่ ทรีฮาโลส โพรลีน และบีเทน สาร compatible solute ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ เช่น ในอาหารเลี้ยงเชื้อ defined minimal medium ทรีฮาโลสจะถูกสะสมขึ้นภายในเซลล์จากการสังเคราะห์แต่เซลล์ก็ไม่สามารถรับทรีฮาโลสเข้าสู่เซลล์เพื่อนำไปใช้เป็นสาร compatible solute ได้แม้ว่าภายนอกเซลล์จะมีทรีฮาโลสก็ตาม สำหรับโพรลีนและบีเทนจะถูกสะสมภายในเซลล์ก็ต่อเมื่อมีสารทั้งสองชนิดนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น ซึ่งการสะสม compatible solute โดยการรับเข้าจากอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นนี้สามารถพบได้ในแบคทีเรียบางชนิด เช่น เชื้อ *E. coli* สามารถสร้างบีเทนได้จากโคลีน choline ที่รับมาจากภายนอกเซลล์ (Csonka และ Epstein. 1996)

2.4 การตอบสนองต่อสภาพเครียดจากความเย็น

เมื่อเซลล์ของจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำจะส่งผลให้ความเสถียรของโปรตีนภายในเซลล์ลดน้อยลง อันเนื่องมาจากขบวนการต่างๆซึ่งได้แก่ อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์และการนำสับสเตรทเข้าสู่เซลล์ลดลง การคงรูปของเยื่อหุ้มเซลล์ลดน้อยลง การเกิดกิจกรรมของ RNA polymerase ต่ำลง และความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์สูงขึ้น ซึ่งส่งผลให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บจากความดันออสโมติกที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้ นอกจากนี้การตายของเซลล์จุลินทรีย์ที่เกิดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาข้อมูลต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการแช่แข็งและการละลายโดยส่วนมากมักเกิดจากความเสียหายและการเสียสภาพของ DNA ซึ่งการที่แบคทีเรียจะสามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิต่ำได้นั้น แบคทีเรียจะทำการปรับตัวต่ออุณหภูมิที่ต่ำด้วยกระบวนการเพิ่มกรดไขมันอิ่มตัว และการสังเคราะห์โพลีเพปไทด์ (Panoff และคณะ. 1998)

โดยทั่วไปเซลล์ของแบคทีเรียจะไวต่อการแช่แข็งซึ่งทำให้เซลล์มีอัตราการตายอย่างช้าๆ ซึ่งการแช่แข็งและการละลายบ่อยครั้งได้ถูกศึกษาซึ่งพบว่าเยื่อหุ้มเซลล์เกิดความเสียหายและเกิดการเสียสภาพของ DNA ที่เป็นเหตุให้เซลล์ตายหลังจากการแช่แข็งและละลาย ขณะที่โปรตีนถูกทำลายเนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามจากการศึกษาการตอบสนองต่อการแช่แข็งและการละลายของแบคทีเรียในระยะ exponential พบว่าหลังจากย้ายเซลล์ของแบคทีเรียจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตไปยังอุณหภูมิที่ต่ำกว่า (สูงกว่า 0 องศาเซลเซียส) แบคทีเรียบางชนิดจะเพิ่มความสามารถการอยู่รอดที่อุณหภูมิที่ต่ำยิ่งขึ้นโดยการเพิ่มความต้านทานต่อความเย็น ซึ่งการปรับตัวต่อการแช่แข็งและการละลายนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มซึ่งจะต้องเหมาะสมกับความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย (Panoff และคณะ. 1998)

2.4.1 ความซับซ้อนของกระบวนการปรับตัวของเซลล์ (The complexity of the cellular adaptation process)

อุณหภูมิของสภาพแวดล้อมมีผลกระทบอย่างมากต่อสภาวะทางสรีรวิทยาของเซลล์จุลินทรีย์ เนื่องจากอุณหภูมิมิผลกระทบต่อปฏิกิริยาเคมีในเซลล์เกือบทั้งหมด ในจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำองค์ประกอบทั้งหมดของเซลล์จำเป็นต้องสามารถทำหน้าที่ได้ ดังนั้นการปรับตัวให้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำจึงเป็นปรากฏการณ์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการรักษาสภาพโครงสร้างของโมเลกุลใหญ่ภายในเซลล์และการรวมกลุ่มของโมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งได้แก่ โปรตีน ไรโบโซม และเยื่อหุ้มเซลล์ รวมทั้งรักษาสภาพและควบคุมระบบการสังเคราะห์โปรตีนและรับสารอาหารเข้าสู่เซลล์ ความซับซ้อนที่เกิดขึ้นนี้สะท้อนให้เห็นถึงความล้มเหลวหลายๆครั้งในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ฝ่าเหล่าที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลางที่ผ่านการปรับตัวต่อความเย็น (Russell. 1990)

2.4.2 การปรับตัวต่ออุณหภูมิของของเหลวที่เป็นไขมันที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Thermal adaptation of membrane lipid fluidity)

เมื่อเกิดการปรับตัวต่อความเย็นจุลินทรีย์จะทำการปรับส่วนประกอบของกรดไขมันของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ ในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่เชื้อเจริญเติบโตโดยการปรับสัดส่วนของเซลล์ตามปกติต้องการสภาพเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีลักษณะเป็นเยื่อหุ้ม 2 ชั้น (membrane lipid bilayer) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นของเหลว เมื่อลดอุณหภูมิลงของกรดไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสภาพของเหลวหรือสภาพที่มีลักษณะเหมือนของเหลวไปเป็นสภาพที่มีการจัดตัวในรูปของผลึกไขมันมากขึ้น การเปลี่ยนแปลงในขั้นนี้เรียกว่า lipid phase transition หรือ order-disorder transition และจุดกึ่งกลางของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมินี้เรียกว่า Transition temperature

เอ็กสาร์นเป็นเอ็กสาร์ทที่ส่งผ่านไปสู่การเปลี่ยนแปลงในเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออยู่ใต้เงื่อนไขเบสเบสเอ็กสาร์ทในการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(De Mendoza และ Cronan. 1983) จุลินทรีย์จะตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงนี้เมื่ออุณหภูมิลดลงโดยเกิดกรดไขมันที่มีจุดหลอมเหลวต่ำจำนวนมากที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ยังคงทำงานได้ต่อไป (Cronan และ Rock. 1987 ; De Mendoza และ Cronan. 1983) กลไกที่ควบคุมอุณหภูมิแบบนี้ได้ทดสอบในเชื้อ *E. coli* (Cronan และ Rock. 1987) แบคทีเรียชนิดนี้จะสะสม cis-vaccenic acid ($C_{18} : 1$) ให้เพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่ออุณหภูมิในการเจริญลดลง ซึ่งการตอบสนองนี้ไม่ต้องการการชักนำการสร้างโปรตีนแต่มีการนำโปรตีนบางชนิดมาแทรกจึงจะทำงาน (active) ได้ดีเฉพาะที่อุณหภูมิต่ำ

แบคทีเรียกรดแลกติกและแบคทีเรียโพรไบโอติกบ่อยครั้งที่เผชิญกับสภาพเครียดในระหว่างกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมและกระบวนการถนอมอาหาร ในสภาพนี้เป็นอันตรายต่อสภาวะทางสรีรวิทยาของจุลินทรีย์เหล่านี้และทำให้กล้าเชื้อที่ผลิตได้ไม่มีคุณภาพ (Hubálek. 2003) เช่น แบคทีเรียที่เผชิญต่อความสภาพเครียดจะทำให้จุลินทรีย์เกิดการตอบสนองทางสรีรวิทยาโดยเกิดการปรับตัว การเปลี่ยนแปลงซึ่งได้เคยมีการศึกษาพบในแบคทีเรียโพรไบโอติกและแบคทีเรียกรดแลกติกแบ่งได้เป็นขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 การตอบสนองโดยการปรับตัวทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของส่วนประกอบของกรดไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งช่วยควบคุมการยอมรับให้สารผ่านเข้าออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane permeability) และการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวทำให้อุณหภูมิของการเปลี่ยนแปลงจากของแข็งเป็นของเหลวลดลง ซึ่งจะช่วยรักษาสภาพของเหลวที่เยื่อหุ้มเซลล์ในระหว่างเกิดสภาพเครียดจากความเย็น (Russell. 1997) กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เพิ่มสูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการทนต่อความเย็นได้ดีขึ้นในเชื้อ *S. thermophilus* (Béal และคณะ. 2001) นอกจากนี้การสังเคราะห์กรดไขมันเฉพาะมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อสภาพเครียด ความเข้มข้นของกรดไขมัน $C_{16} : 0$ ถูกพบว่าช่วยการตอบสนองต่ออุณหภูมิที่ต่ำในเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* (Fernandez Murga และคณะ. 2000 ; Wang และคณะ. 2005) ขณะที่กรดไขมัน $C_{18} : 0$ เพิ่มขึ้นในระหว่างที่เชื้อ *L. plantarum* เกิดการปรับตัวต่อความเย็น (Russell และคณะ. 1995) และ cycC19 : 0 ที่มีความเข้มข้นสูงพบว่าจะช่วยในการป้องกันเซลล์จากความเย็นให้กับเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* (Smittle และคณะ. 1974), *Lactobacillus helveticus* และ *Lactobacillus acidophilus* (Zavaglia และคณะ. 2000) โดยเชื้อเหล่านี้มีการสังเคราะห์กรดไขมัน cycC19 : 0 สูงขึ้นทำให้ของเหลวที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ถูกรักษาไว้

การสังเคราะห์โปรตีนที่ตอบสนองต่อความเย็นอย่างฉับพลัน (cold shock proteins) เป็นการตอบสนองความเย็นขั้นที่ 2 โปรตีนชนิดนี้สามารถเข้าจับกับ RNA และบางครั้งทำหน้าที่ในฐานะของ RNA chaperones ดังนั้นจึงทำให้กระบวนการแปลรหัส (translation) ภายใต้อุณหภูมิที่ลดลงง่ายขึ้น (Graumann และคณะ. 1997) โปรตีนนี้ยังทำหน้าที่ขจัดความอึดตัวของกรดไขมันที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* มีโปรตีน 12 ชนิดที่ถูกสังเคราะห์เพิ่มขึ้นเป็น 3 เท่าที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Panoff และคณะ. 2000) ในเชื้อ *S. thermophilus* จะมีโปรตีน (non-constitutive proteins) 4 ชนิด ถูกชักนำที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส และโปรตีน 6 ชนิด ถูกสังเคราะห์มากที่สุดหลังจากเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 20 องศาเซลเซียส (Wouters และคณะ. 1999) กลุ่มของ cold shock protein (CspA-CspE) ซึ่งแบ่งลักษณะได้โดยใช้น้ำหนักโมเลกุลที่ประมาณ 7 กิโลดาลตัน ซึ่งได้เคยมีการจำแนกและค้นพบในบรรดาโปรตีนเหล่านี้ การสังเคราะห์โปรตีน CspB และ CspE มากเกินไปผลทำให้เชื้อ *L. lactis* ที่ผ่านการแช่แข็งมีการอยู่รอดเพิ่มขึ้น (Wouters และคณะ. 2000) และการสังเคราะห์โปรตีน CspP ที่มากเกินไปในเชื้อ *L. plantarum* ช่วยให้การอยู่รอดของเชื้อหลังจากถูกแช่แข็งเพิ่มขึ้น (Derzelle และคณะ. 2003)

ประการสุดท้ายโปรตีนที่ทำให้เกิดการปรับตัวให้เข้ากับสภาพความเย็น 10 ชนิด จะถูกสร้างขึ้นในเชื้อ *Enterococcus faecalis* ระหว่างที่เชื้อเจริญที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส (Panoff และคณะ. 1997) ซึ่งโปรตีน 5 ชนิดของโปรตีนทั้งหมดพบว่าเป็น cold shock protein

การปรับตัวทางสรีรวิทยาหลังการเผชิญสภาวะเครียดจากความเย็นทั้ง 2 ประเภทนี้อาจถูกชักนำให้เกิดขึ้นในระหว่างการผลิตกล้าเชื้อแบบแช่แข็งเพื่อให้เชื้อสามารถทนต่อความเย็นได้ดียิ่งขึ้น ตัวอย่างเช่น เมื่อนำแบคทีเรียที่เจริญแล้วมาบ่มที่อุณหภูมิต่ำหรือพีเอชต่ำจะช่วยเพิ่มความต้านทานต่อการแช่แข็งและเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง (Béal และคณะ. 2001 ; Fernandez Murga และคณะ. 2000 ; Wang และคณะ. 2005) อย่างไรก็ตามวิธีนี้นำไปสู่ความเข้มข้นเซลล์ที่น้อยลงในขั้นสุดท้ายของการหมัก ซึ่งทำให้การผลิตของกล้าเชื้อวิธีนี้ไม่ได้รับความนิยม

การปรับตัวอื่นๆ อาจเกิดขึ้นภายหลังขั้นตอนการหมักเช่น การบ่มเชื้อ *L. lactis* ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากการเพาะเลี้ยงให้เจริญจะช่วยให้เชื้อมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตเพิ่มขึ้น (ร้อยละ 95) (Panoff และคณะ. 1994) ในกรณีของเชื้อ *L. bulgaricus* การนำเชื้อมาไว้ที่อุณหภูมิต่ำลงคืออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะทำให้เชื้อมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตร้อยละ 80 (De Urreza และ De Antoni. 1997) ส่วนเซลล์ของเชื้อ *L. lactis* มีความต้านทานต่อการแช่แข็งเพิ่มมากขึ้นหลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Kim และคณะ. 1999) หรือ 2 ชั่วโมง (Broadbent และ Lin. 1999) และเมื่อนำการปรับตัวต่อความเย็นอย่างฉับพลันที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง มาประยุกต์ให้กับเชื้อ *S. thermophilus* มีผลทำให้อัตราการอยู่รอดของเชื้อหลังการแช่แข็งเพิ่มขึ้น 10^3 เท่า (Wouters และคณะ. 1999) ประการสุดท้ายการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ในระหว่างขั้นตอนการป้องกันความเย็นจะช่วยให้กิจกรรมการสร้างกรดของเชื้อ *L. bulgaricus* และ *S. thermophilus* ที่ผ่านการแช่แข็งดีขึ้น (Fonseca และคณะ. 2001) อย่างไรก็ตามการปรับตัวที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิต่ำสุดสำหรับการเจริญคือ 15 องศาเซลเซียส ไม่มีผลทำให้เชื้อ *S. thermophilus* เกิดการปรับตัวต่อความเย็นได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Wouters และคณะ. 1999)

2.5 เทคโนโลยีการผลิตกล้าเชื้อ

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตกล้าเชื้อสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์อาหาร ชนิดของเชื้อที่นิยมใช้ในการผลิตกล้าเชื้อได้แก่ *Lactobacillus*, *Streptococcus* และ *Bifidobacterium* หรือการผสมแบคทีเรียตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป (mixed culture) โดยการผสมกล้าเชื้อให้เหมาะสมกับอาหารหมักแต่ละชนิดจะทำให้ได้ประโยชน์ทั้งในความสะดวกในการควบคุมการผลิต การปรับปรุงคุณภาพรสชาติ และความปลอดภัยของผู้บริโภค ซึ่งนอกจากอาหารจะปลอดภัยแล้วการบริโภคอาหารที่มีแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคโดยที่แบคทีเรียกรดแลคติกยังมีชีวิตอยู่ยังช่วยให้เกิดความปลอดภัยของจุลินทรีย์ภายในลำไส้และมีผลในการป้องกันการเกิดโรคที่อวัยวะจากเชื้อโรคหลายชนิดซึ่งเรียกแบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้ว่า “โพรไบโอติก” (probiotic) โดยปัจจุบันการผลิตจุลินทรีย์เพื่อเป็นโพรไบโอติกสำหรับอาหารเสริมของมนุษย์และสัตว์เป็นอุตสาหกรรมการผลิตเชื้ออีกแขนงหนึ่ง (Conway และคณะ. 1987 ; Fuller. 1989)

มนุษย์รู้จักการถนอมหรือแปรรูปอาหารด้วยวิธีการหมักดองโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกมาเป็นเวลานานไม่น้อยกว่าการหมักที่เกิดจากการใช้เชื้อราและยีสต์ แต่ในประเทศตะวันตกและประเทศตะวันตกต่างไม่มีเทคโนโลยีการผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียแบบพื้นบ้าน โดยเฉพาะกล้าเชื้อที่ไม่ได้อยู่ในรูปเชื้อผสมกับยีสต์ ในยุคก่อนที่จะมีการพัฒนาการผลิตกล้าเชื้อบริสุทธิ์ การหมักอาหารจึงอาศัยเชื้อจากธรรมชาติที่ติดมากับวัตถุดิบ โดยควบคุมสภาวะการหมักให้เหมาะสมเพื่อให้แบคทีเรียชนิดที่ต้องการเจริญได้ดี ซึ่งปัจจุบันยังพบได้ในการผลิตอาหารหมักบางชนิดเช่น การดองผักและการหมักผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ส่วนผลิตภัณฑ์นมหมักที่ผลิตแต่เดิมนั้นใช้วิธีเก็บอาหารหมักบางส่วนจากการหมักในรุ่นก่อนไว้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการหมักรุ่นต่อไป จนประมาณ ค.ศ. 1880 ได้มีการใช้เชื้อบริสุทธิ์ผลิตเนยแข็งเป็นครั้งแรกในประเทศเดนมาร์ก (Fleming และคณะ. 1985 ; Tanaka และคณะ. 1980) และได้มีการพัฒนาวิธีการผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมประเภทนี้มาอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน ซึ่งกล้าเชื้อที่จะผลิตขายเป็นอุตสาหกรรมจะต้องมีอายุการเก็บรักษานานและไม่สูญเสียคุณสมบัติระหว่างกระบวนการขนส่งและเก็บรักษา ซึ่งการแช่แข็งแห้ง (freeze drying) เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการผลิตกล้าเชื้อในระดับอุตสาหกรรม (นภา โล่ห์ทอง. 2534)

การผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธีการแช่แข็งแห้งเป็นอีกวิธีที่นิยมใช้กันในอุตสาหกรรม กล้าเชื้อในรูปแบบนี้ได้เปรียบในเรื่องความสะดวกในการขนส่งและการเก็บรักษา แต่การแช่แข็งแห้งมีผลทำให้เชื้อมีประสิทธิภาพลดจำนวนลงค่อนข้างมาก ส่วนใหญ่เชื้อที่ผลิตเป็นกล้าในรูปแบบนี้ได้แก่ *Streptococcus* ซึ่งโดยทั่วไปเซลล์ที่รอดชีวิตจะลดจำนวนถึงร้อยละ 50-80 ในระหว่างการทำแห้ง (Gilland. 1985 ; Peppler และ Perlman. 1979) และในระหว่างการเก็บรักษาเชื้อจะลดปริมาณลงอีกตามระยะเวลาที่เก็บ

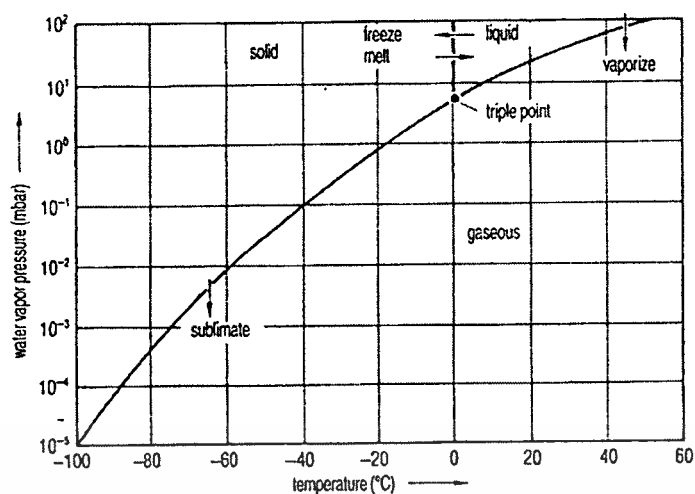
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การควบคุมความชื้นที่เหมาะสมเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ทำให้ปริมาณการยู่รอดของเชื้อระหว่างการเก็บรักษาสูงขึ้น ตัวอย่างเช่นเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ในสภาพแช่แข็งแห้งที่มีความชื้นร้อยละ 3.8-5.7 จะมีปริมาณเชื้อยู่รอดมากกว่าเชื้อ *L. plantarum* ที่มีความชื้นร้อยละ 0.7-2.3 (Denilova และคณะ. 1981)

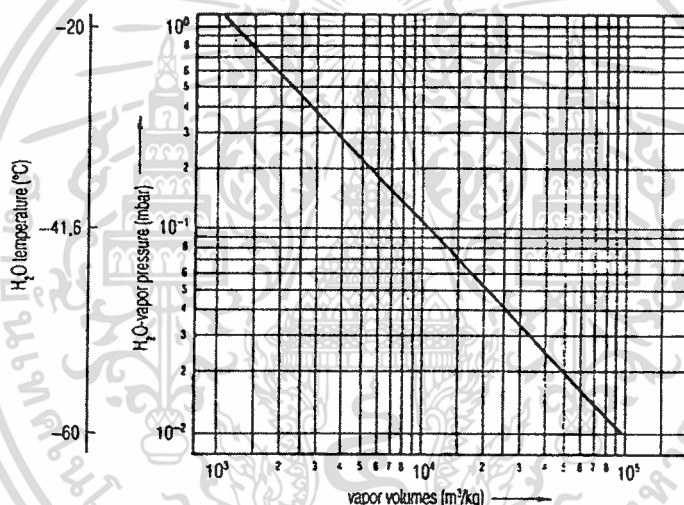
นอกจากนี้อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อมีผลทำให้เชื้อยู่รอดได้มากขึ้น เช่นการเติมยีสต์สกัดและวิตามินซีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ปริมาณ *L. bulgaricus* ยู่รอดได้มากขึ้น (Naghmoush และคณะ. 1979) นอกจากนี้ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อแล้วยังสามารถเพิ่มอัตราการยู่รอดของกล้าเชื้อได้โดยการเติมสารต่างๆ ขณะแช่แข็งแห้ง เช่น เติมนิโคตินามิกลูตาเมท ประมาณร้อยละ 5 หรือ แลคโตสร้อยละ 7 (Gilland. 1985 ; Kilara และคณะ. 1977) และในระดับการทดลองได้มีการผลิตกล้าเชื้อโดยการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจินเตแล้วนำไปไลโอฟิลไลส์พบว่าเชื้อ *L. plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* ที่ผลิตเป็นกล้าเชื้อในรูปแบบนี้สามารถใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ได้ผลเป็นอย่างดี (Kilara และคณะ. 1977)

2.6 การแช่แข็งแห้ง (Freeze Drying)

การแช่แข็งแห้งเป็นกระบวนการทำแห้งซึ่งตัวทำละลาย (solvent) หรือสารแขวนลอย (suspension medium) จะถูกทำให้กลายเป็นผลึกที่อุณหภูมิต่ำและต่อมาก็จะถูกทำให้ระเหิดจากสถานะของของแข็งกลายเป็นสถานะของไอ (vapor phase) การแช่แข็งแห้งโดยส่วนใหญ่มักใช้กับตัวอย่างที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย รูปที่ 2.2 ได้แสดงแผนภาพสถานะของน้ำและบริเวณที่จะมีการเปลี่ยนสถานะจากของแข็งกลายเป็นไอซึ่งอาจเป็นไปได้ที่จะเกิดขึ้น ในขั้นตอนในแผนภาพนี้เป็นการเปลี่ยนสถานะของน้ำบริสุทธิ์ ถ้าผลิตภัณฑ์ประกอบด้วยองค์ประกอบ 2 ชนิดหรือมากกว่า 2 ชนิดและอยู่ในสภาพของสารละลายแท้ (true solution) หรือสารแขวนลอย (suspension) ขั้นตอนการเปลี่ยนสถานะของตัวทำละลายก็也将มีความซับซ้อนมากยิ่งขึ้น ความสลับซับซ้อนในระบบเช่นนี้เกิดขึ้นในสารชีวภาพ (biological substance) การทำแห้งเป็นการเปลี่ยนสภาพจากน้ำแข็งหรือน้ำในสถานะ อะมอร์ฟัส (amorphous phase) กลายเป็นสถานะไอ เนื่องจากน้ำแข็งมีความดันไอต่ำปริมาตรของไจึงมาก (รูปที่ 2.3) ดังนั้นระหว่างขั้นที่ 2 ของการทำแห้งน้ำซึ่งถูกดูดซับอยู่บนของแข็งจะหลุดออก จุดมุ่งหมายของการแช่แข็งแห้งคือผลิตสารที่มีความคงตัวที่ดีในระหว่างการเก็บรักษาซึ่งจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังจากการคืนรูปด้วยน้ำ (Oetjen และ Haseley. 2004)



รูปที่ 2.2 แผนภาพของสถานะของน้ำและบริเวณที่จะมีการเปลี่ยนสถานะจากของแข็งกลายเป็นไอ
ที่มา : Oetjen และ Haseley. 2004



รูปที่ 2.3 การทำแห้งเป็นการเปลี่ยนสภาพจากน้ำแข็งหรือน้ำในสถานะอะมอร์ฟัส (amorphous phase)
กลายเป็นไอ

ที่มา : Oetjen และ Haseley. 2004

การแช่แข็งแห้งมีข้อได้เปรียบคือการทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยลดความเสียหายของผลิตภัณฑ์ที่ไวต่อความร้อน สามารถเติมของแห้งที่ได้จากกระบวนการแช่แข็งแห้งลงในผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวได้ในปริมาณที่ถูกต้อง ปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์ในขั้นสุดท้ายสามารถถูกควบคุมได้ในระหว่างกระบวนการ สามารถทำให้ผลิตภัณฑ์แห้งมีลักษณะทางกายภาพที่น่าสนใจ และผลิตภัณฑ์ที่แห้งซึ่งมีพื้นที่ผิวมากจะคืนรูปเป็นของเหลวได้อย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามมีข้อเสียคือ ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูงในการลงทุนการปฏิบัติงานและบำรุงรักษาเครื่องมือ นอกจากนี้กระบวนการทำแห้งยังมี

ความซับซ้อนและต้องการผู้ที่มีความชำนาญในการใช้เครื่องมือ ซึ่งกระบวนการแช่แข็งแห้ง ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

2.6.1 การแช่แข็ง

ในการแช่แข็งสารจะต้องทำให้สารมีอุณหภูมิต่ำลงจนถึงอุณหภูมิที่ทำให้น้ำและของแข็งเกิดผลึกขึ้นอย่างเต็มที่หรือในบริเวณพื้นที่ของผลึกน้ำแข็งและในขอบเขตของแข็งและน้ำซึ่งเข้มข้นในสถานะอะมอฟัส ซึ่งยังคงมีสถานะเป็นของแข็งในบริเวณที่มีการแช่แข็งผลึกน้ำแข็งจะเริ่มโตขึ้น ดังนั้นจึงทำให้สารละลายที่เหลืออยู่มีความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งสามารถทำให้ค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงในสารหลายชนิดสามารถวัดอุณหภูมิของจุดหลอมเหลวได้ แต่ในสารอื่นอีกหลายชนิดไม่สามารถทำการวัดค่าออกมาได้ การเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อัตราการให้ความเย็น ความเข้มข้นเริ่มต้น อุณหภูมิสุดท้ายในการทำให้เย็น และระยะเวลาที่สารอยู่ที่อุณหภูมิสุดท้ายนี้ในผลิตภัณฑ์หลายๆ ชนิดไม่มีการเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นและผลิตภัณฑ์ยังคงอยู่ในสถานะอะมอฟัส ซึ่งเป็นสถานะที่สารจะมีรูปร่างเหมือนแก้ว (glass-like) หรือมีสถานะผสมของ 2 สถานะ (Oetjen และ Haseley, 2004) ในการแช่แข็งอาหารและสารบางชนิดน้ำบางส่วนจะแข็งตัวเป็นผลึกน้ำแข็งขณะที่อีกบางส่วนมีน้ำบางส่วนที่ไม่แข็งตัว (unfreezable water) (ตารางที่ 2.2 และ 2.3)

ตารางที่ 2.2 ปริมาณของน้ำที่แข็งตัวและไม่แข็งตัวในอาหารบางชนิดที่อุณหภูมิของการแช่แข็งระดับต่างๆ

ชนิดของ ผลิตภัณฑ์	ปริมาณของน้ำที่เกิดการแข็งตัว (ร้อยละของปริมาณน้ำทั้งหมด) ที่อุณหภูมิต่างๆ (องศาเซลเซียส)				ปริมาณของน้ำที่ไม่เกิด การแข็งตัว (ร้อยละของปริมาณน้ำทั้งหมด)
	-10	-15	-20	-30	
เนื้อที่มี	82	85	87	88	12
ไขมันต่ำ					
ไส้กรอก	84	87	89	91	9
ไขรวมเหลว	89	91	92	93	7
ไข่แดง	85	86	87	87	13
ไข่ขาว	91	93	94	-	6
ยีสต์	80	85	88	89	11
น้ำผลไม้	85	90	93	96	-
ถั่ว	80	86	89	92	-

ที่มา : Riedel, 1972

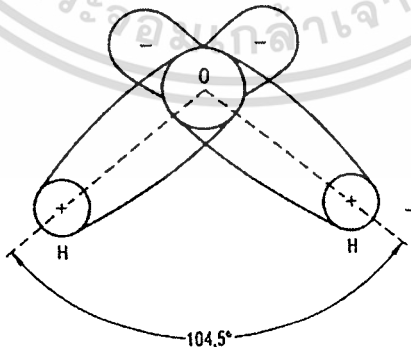
ตารางที่ 2.3 ปริมาณของน้ำที่ไม่กลายเป็นน้ำแข็งซึ่งไม่สามารถแข็งตัวได้โดยการลดอุณหภูมิให้ต่ำลง

ชนิดของสาร	ปริมาณของน้ำที่ไม่กลายเป็นน้ำแข็ง (ร้อยละ)
ทรีฮาโลส	16.7
ซอร์บิทอล	18.7
มอลโตส	20
กลีเซอริน	27
กลูโคส	29.1
ซูโครส	35.9
แลคโตส	40.8
กลีเซอรอล	45.9
ฟรุคโตส	49.0

ที่มา : Riedel. 1972

2.6.1.1 โครงสร้างของน้ำแข็งและสารละลาย

โมเลกุลของน้ำมีรูปร่างแสดงในรูป 2.4 ที่มี 2 ขั้วอย่างเห็น ได้ชัดซึ่งทำให้เกิดลักษณะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงและ โครงสร้างชั้นนอกของโมเลกุลเกาะกลุ่มกันในน้ำจะไม่มีไฮออนซึ่งกลุ่มที่เกาะกันนี้ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำ 10 โมเลกุลโดยประมาณ โดยมีรูปร่างเป็นสามเหลี่ยมที่มี 4 ด้านซึ่งถูกล้อมรอบด้วยกลุ่ม O-H-O กลุ่มของโมเลกุลน้ำจะไม่เสถียรเนื่องจากเป็นกลุ่มของโมเลกุลที่เหมือนกันและจะมีการแลกเปลี่ยน โมเลกุลกับสิ่งแวดล้อมเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอ โดยมีช่วงชีวิต (life time) เฉลี่ย 10^{10} ถึง 10^1 วินาที จำนวนของการเกาะกลุ่มจะลดลงเมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงจนกระทั่งเกิดการแข็งตัวของน้ำขึ้น (Oetjen และ Haseley. 2004)



รูปที่ 2.4 รูปร่างโมเลกุลของน้ำ

ที่มา : de Quervain. 1975

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในสภาพของน้ำที่ปราศจากสิ่งแปลกปลอมกลุ่มของน้ำจะเริ่มเป็นผลึกน้ำแข็งในน้ำที่มีอุณหภูมิลดลงถึง -39 องศาเซลเซียส การเกิดเช่นนี้เรียกว่า homogeneous nucleation สำหรับอนุภาคอื่นที่ไม่ละลายน้ำจะกระทำตัวเป็นจุดศูนย์กลาง (nuclei) สำหรับการเกิดผลึกน้ำแข็งซึ่งถูกเรียกว่า heterogeneous nucleation ในน้ำปกตินั้นจะมี nuclei อยู่ประมาณ 10^6 อนุภาคต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และ nuclei นี้จะกระทำตัวเป็นจุดศูนย์กลางของการเกิดผลึกน้ำแข็ง น้ำแข็งจะเพิ่มขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพถ้าโครงสร้างนั้นเหมือนกับโครงสร้างของน้ำ โดยถ้า nuclei มีการก่อตัวขึ้นและเกิดน้ำแข็งที่บริเวณภายนอกเร็วกว่าภายในจะเป็นการสร้างน้ำแข็งแบบไอซ์สตาร์ (ice star) ซึ่งการสร้างโครงสร้างเช่นนี้จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ลดลงและอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิ (รูปที่ 2.5) ขณะที่การแช่แข็งดำเนินต่อไปจะเกิดการโตขึ้นของผลึกน้ำแข็งที่แตกกิ่งก้านสาขาออกทำมุม 60° เป็นที่รู้จักกันดีในชื่อของดอกไม้น้ำแข็ง (Frost flowers) สำหรับผลึกขนาด 1×10^3 ตารางมิลลิเมตร เกิดจากโมเลกุลของน้ำ 2×10^7 โมเลกุล จัดเรียงตัวในตำแหน่งต่างๆ ซึ่งยากที่จะเห็นได้ว่าผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นได้อย่างไรภายในเวลาเสี้ยววินาที แต่จะเห็นได้ชัดว่าการโตของผลึกน้ำแข็งนั้นได้รับอิทธิพลจากหลายๆ ปัจจัย (Oetjen และ Haseley. 2004)



รูปที่ 2.5 การโตขึ้นของผลึกน้ำแข็งของน้ำซึ่งเพิ่มขึ้น
ที่มา : de Quervain. 1975

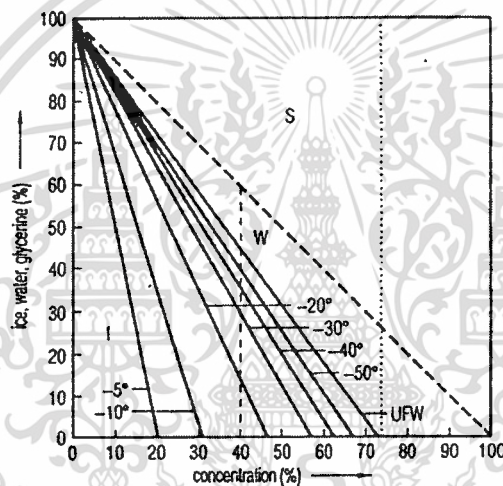
2.6.1.2 การแช่แข็งเพื่อให้เกิดผลึกขนาดใหญ่

การแช่แข็งเพื่อให้เกิดผลึกขนาดใหญ่ อัตราการเกิด nucleation ควรจะน้อย การแช่แข็งควรเกิดในสภาพ quasi-equilibrium ในสถานะระหว่างสารละลายและผลึกน้ำแข็งที่ใช้ในการแช่แข็ง ควรจะสูงมากเท่าที่จะทำได้ เนื่องจากการโตขึ้นของผลึกน้ำแข็งเป็นฟังก์ชันของ $e^{-1/T}$ และที่เวลาใช้สำหรับการเกิดผลึกน้ำแข็งจะต้องเพิ่มขึ้น ส่วนการแช่แข็งเพื่อให้เกิดผลึกน้ำแข็งน้อยมากหรือไม่เกิดผลึกการแช่แข็งควรเกิดขึ้นภายใต้ความดันสูงและอัตราการแช่แข็งควรสูงมากเท่าที่จะเป็นไปได้ (Oetjen และ Haseley. 2004)

สถานะที่ไม่สมดุล (non equilibrium status) สามารถพบได้ในระหว่างการให้สารละลายของกลีเซอรอลกับน้ำเย็นลงอย่างช้าๆ โดยเริ่มจากสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลึกน้ำแข็งบริสุทธิ์จะเริ่มเกิดขึ้นตั้งแต่แรกจนกระทั่งถึงอุณหภูมิ -46 องศาเซลเซียส ที่ทุกอุณหภูมิระดับนี้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลจะสูงถึงร้อยละ 66.7 และที่อุณหภูมิเดียวกันนี้สารผสมที่มีจุดหลอมเหลวต่ำจะกลายเป็นของแข็ง อย่างไรก็ตามอาจเป็นไปได้ที่จะลดอุณหภูมิลงจนถึง -58 องศาเซลเซียส ที่จุดนี้กลีเซอรอลจะมีความเข้มข้นสูงขึ้นเป็นร้อยละ 73 และเมื่อลดอุณหภูมิลงต่อไปก็จะไม่ทำให้น้ำแข็งก่อตัวเป็นผลึกน้ำแข็งอีกเลย ขณะที่สารละลายที่มีความเข้มข้นและความหนืดสูงมากและการเคลื่อนที่ของโมเลกุลน้ำจะลดน้อยลงมากจนกระทั่งทำให้น้ำที่เหลืออยู่ไม่สามารถกลายเป็นน้ำแข็งได้ (unfreezable, UFW) โดยจะอยู่สถานะอะมอร์ฟัสของระหว่างกลีเซอรอลและโมเลกุลของน้ำแข็ง รูปที่ 2.6 แผนภาพแสดงความเข้มข้นเริ่มต้นของสารซึ่งมีบางส่วนของสารที่จะเป็นน้ำแข็ง เป็นน้ำ และกลีเซอรอลที่ไม่แข็งตัวที่อุณหภูมิแช่แข็งที่แท้จริงที่ใช้ภายใต้สภาวะที่สมดุล (Oetjen และ Haseley. 2004)



รูปที่ 2.6 อัตราการเกิดน้ำแข็ง น้ำ และสารที่ถูกละลายได้ในสภาวะสมดุลของสารละลายกลีเซอรอลและน้ำซึ่งเป็นฟังก์ชันของความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่อุณหภูมิของการแช่แข็งต่างกันระหว่าง -5 และ -50 องศาเซลเซียส

ที่มา : Luyet. 1969

จากภาพเมื่อนำสารละลายกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 40 มาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่สมดุลพบว่าจะมีน้ำแข็งร้อยละ 32 น้ำร้อยละ 30 กลีเซอรอลร้อยละ 38 เส้นกราฟของ UFW ได้แสดงถึงอุณหภูมิที่ทำให้กลีเซอรอลมีความเข้มข้นที่สูงขึ้นมากจนกระทั่งน้ำไม่สามารถกลายเป็นน้ำแข็งได้อีกต่อไปเนื่องจากโมเลกุลของน้ำไม่สามารถเคลื่อนที่ได้

ขณะที่สารละลายของกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 20 เมื่อทำให้อุณหภูมิเย็นลงจนถึง -50 องศาเซลเซียส พบว่ามีน้ำแข็งร้อยละ 70 ส่วนของ UFW ร้อยละ 10 และกลีเซอรอลร้อยละ

20 ขณะที่อุณหภูมิ -58 องศาเซลเซียส กลีเซอรอลมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 72 และ UFW เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 27 (Oetjen และ Haseley. 2004)

ข้อเท็จจริงของการที่น้ำไม่สามารถแข็งตัวกลายเป็นผลึกน้ำแข็งในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงและข้อเท็จจริงที่โมเลกุลของน้ำไม่สามารถเคลื่อนที่ได้อีกในสภาพที่สารมีความเข้มข้นสูงมากนั้นมีความสำคัญในระหว่างการแช่แข็งของสารชีวภาพ (biological substances) ดังตารางที่ 2.3 และ 2.4 ได้แสดงการเกิดผลึกน้ำแข็งในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดและสารป้องกันความเย็น

จากความรู้นี้ประกอบกับผลที่ได้จากกระบวนการแช่แข็งอย่างรวดเร็วทำให้ได้ทฤษฎีที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งผลิตภัณฑ์ให้อยู่ในสถานะของแข็งในรูปของอะมอร์ฟัส (solid amorphous state) ถ้าความเร็วของการแช่แข็งน้อยกว่าความเร็วที่ต้องการสำหรับการเกิดเป็นผลึกน้ำแข็งในสภาพใสคล้ายแก้ว (vitrification) แต่ถ้าความเร็วในการแช่แข็งนี้สูงพอที่จะหลีกเลี่ยงการเกิดสภาพผสมของผลผสมของอะมอร์ฟัส (amorphous mixture) ซึ่งเป็นผลให้เกิดผลึกน้ำแข็งรูป 6 เหลี่ยม (hexagonal ice) ซึ่งเป็นส่วนผสมของของแข็งที่เข้มข้นกับน้ำที่ไม่แข็งตัว การเติมสารผสมมีอิทธิพลต่อการทำให้เย็นและการเกิดการแข็งตัวในกระบวนการเท่านั้นแต่ยังอาจจำเป็นต่อการที่จะได้มาซึ่งวัตถุประสงค์อื่นๆ ได้แก่ ทำให้เกิดโครงสร้างที่คงตัวถ้าปริมาณของของแข็งนั้นน้อยมาก เช่น ในสารละลายที่มีความเข้มข้นน้อยกว่าร้อยละ 3 ช่วยปรับค่าพีเอชให้เหมาะสม (มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์) เพื่อหลีกเลี่ยงหรือชักนำการเกิดผลึกน้ำแข็ง เพื่อป้องกันส่วนประกอบที่สำคัญของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการแช่แข็ง เช่น การใช้สารป้องกันความเย็น cryoprotectants และเพื่อลดการเปลี่ยนแปลงของส่วนประกอบที่สำคัญของผลิตภัณฑ์ในระหว่างเก็บรักษา เช่นการเกิด unfolding หรือ aggregation ของโปรตีน (Oetjen และ Haseley. 2004)

2.6.1.3 ผลของการแช่แข็งต่อเซลล์ของแบคทีเรีย

ผลของการแช่แข็งต่อเซลล์ของแบคทีเรีย ในปี ค.ศ. 1968 Meryman ได้เสนอความคิดเกี่ยวกับปริมาณของเซลล์ที่น้อยที่สุดและสมมติฐานในระหว่างการแช่แข็งเซลล์ซึ่งทำให้เซลล์ได้รับอันตรายเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นแรกการที่น้ำแพร่จากเซลล์ออกมาสู่ภายนอก สารละลายภายในเซลล์จะมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามปริมาณของน้ำบางส่วนจะถูกดึงออกจากเซลล์จนกระทั่งปริมาณของเซลล์ลดลงมากที่สุดจนเหลือปริมาณเซลล์ต่ำสุดกระทั่งไม่มีการดึงน้ำออกจากโมเลกุลของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนที่มีความสำคัญของโครงสร้างเซลล์ การสูญเสียน้ำเช่นนี้นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้

De Antoni และคณะ (1989) แสดงให้เห็นว่าการเติมทรีฮาโลสระหว่างที่มีการแช่แข็งและทำให้ละลายในเชื้อ *L. bulgaricus* 2 สายพันธุ์ ช่วยปรับปรุงการอยู่รอดของเชื้อ โดยการทดลองนี้ได้แช่แข็งตัวอย่าง (1 มิลลิลิตร) โดยลดอุณหภูมิลงในอัตรา 18 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ -60 องศาเซลเซียส และถูกทำให้ละลายจนถึงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเพิ่มอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสต่อนาที สารละลายที่ใช้ประกอบด้วย น้ำกลั่น อาหารเลี้ยงเชื้อ และนมร้อยละ 10 ที่มีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทรีฮาโลส และไม่มีทรีฮาโลส ผลจากการแช่แข็งและการละลาย 3 ครั้ง พบว่าในสารละลายที่ประกอบด้วยนมเพียงอย่างเดียวมีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 24 หรือ 65 ขณะที่สารละลายที่ประกอบด้วยนมและทรีฮาโลส เชื่อสามารถอยู่รอดได้สูงขึ้นถึงร้อยละ 32 และ 100 ตามลำดับ De Antoni และคณะได้กล่าวถึงประสิทธิภาพของนมว่ามีความเกี่ยวข้องกับปริมาณของ Ca^{2+} ที่มีอยู่ โดยที่ทรีฮาโลสสามารถแทนที่โมเลกุลของน้ำใน ฟอสโฟลิปิดของเยื่อหุ้มเซลล์ อย่างไรก็ตามยังไม่มีกล่าวถึงโมเลกุลน้ำตาลในนมว่ามีผลหรือไม่

2.6.2 การระเหิด (Sublimation)

การระเหิด คือการกลายเป็นไอของน้ำแข็งโดยไม่ผ่านสภาวะของเหลว การระเหิดไม่เกี่ยวข้องกับน้ำที่ไม่แข็งตัว (unfrozen water) ที่ยึดติดกับของแข็ง ผลึกน้ำแข็งต้องการพลังงานคือความร้อนในการเปลี่ยนเป็นไอ ซึ่งไอน้ำจะถูกนำออกจากของแข็งโดยการใช้ปั๊มดูดอากาศดูดออก โดยการระเหิดจะเกิดขึ้นที่ผิวของผลิตภัณฑ์ และเมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่งบางส่วนของผลิตภัณฑ์ที่ได้จะแห้ง (dry layer) และยังเหลือส่วนที่เยือกแข็ง (frozen layer) โดยระหว่างชั้นของทั้งสองนี้เรียกว่า interface (สมบูรณ์ ธนาสุวัฒน์. 2544)

2.6.3 การคาย (Desorption)

การคายจะเกิดขึ้นหลังจากผลึกน้ำแข็งระเหิดออกจากผลิตภัณฑ์แล้ว ส่วนที่เหลือจะเป็นสารละลายเข้มข้นอยู่กับส่วน dry layer ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำอยู่ 25 ถึง 30 กรัมต่อ 100 กรัมของแข็ง โดยของแข็งจะยึดติดกันแน่นและไม่เยือกแข็งและน้ำที่ยึดติดแน่นกับผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า sorbed water ซึ่งน้ำในส่วนนี้จะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็นไอและถูกนำออกไปโดยการคาย ซึ่งเป็นส่วนสุดท้ายของการทำให้แห้ง โดยความคงที่ของโครงสร้างหรือเคมีของผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นจะขึ้นอยู่กับน้ำที่ยึดอยู่ (สมบูรณ์ ธนาสุวัฒน์. 2544)

2.6.4 ผลของสารป้องกันเซลล์ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย

แบคทีเรียจะทนต่อความเย็นได้มากขึ้นเป็นพิเศษเมื่อใส่สารป้องกันเซลล์ลงในสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียที่จะทำการแช่แข็ง (Hubálek. 2003) โดยสารป้องกันเซลล์ที่นิยมใช้ในเชื้อแบคทีเรียได้แก่

2.6.4.1 แซคคาไรด์และโพลีแซคคาไรด์ (Saccharide and Polysaccharide)

แซคคาไรด์ โดยปกติจะใช้สำหรับป้องกันเซลล์ให้กับแบคทีเรียขณะแช่แข็ง การทำให้แห้งและการเก็บรักษา กลไกการป้องกันเซลล์โดยแซคคาไรด์ยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างแน่ชัดแต่ส่วนมากน่าจะเกิดจากปัจจัยร่วมต่างๆ (Crowe และคณะ. 1996) ดังนั้นได้มีการเสนอให้มีการใช้แซคคาไรด์เพื่อใช้ป้องกันทั้งเยื่อหุ้มเซลล์และโปรตีน cytosolic ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์ที่สำคัญที่มี phospholipids และป้องกันการเกิดผลึก และสภาวะการเปลี่ยนแปลงของสถานะน้ำ (dehydration) จากอุณหภูมิที่ค่อยๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลดต่ำลง (Bendas และคณะ. 1996) สารประกอบแซคคาไรด์และโพลีแซคคาไรด์ที่ใช้เป็นสารป้องกันเซลล์จากความเย็นได้แก่

ก) กลูโคส (glucose)

กลูโคสใช้เป็นสารป้องกันเซลล์ให้กับจุลินทรีย์โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 1-18 (เฉลี่ยร้อยละ 4) ทำให้การมีชีวิตรอดสูงมากขึ้นหลังจากทำการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียร่วมกับสารละลายกลูโคสที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Keith. 1913)

ข) ซูโครส (sucrose)

ซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 1-68 (เฉลี่ยร้อยละ 10) เป็นสารที่นิยมใช้ป้องกันเซลล์จากความเย็นให้กับจุลินทรีย์ โดยจากการศึกษาการอยู่รอดของเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Proteus* และ *Micrococcus* spp. โดยนำเชื้อเหล่านี้มาแช่แข็งร่วมกับสารละลายซูโครสเข้มข้นร้อยละ 10 พบว่าเชื้อสามารถอยู่รอดจากการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียสได้นานมากขึ้น (Keith. 1913) และพบว่าสารละลายซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 สามารถป้องกันการสูญเสียน้ำของกลีเซอรีน *L. lactis* ssp. *lactis* ได้ดีกว่ากลีเซอรอลเข้มข้นร้อยละ 10 เมื่อเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -20 ถึง -70 องศาเซลเซียส (Chavarri และคณะ. 1988) นอกจากนี้ Carvalho และคณะ (2003) ได้ทำการทดสอบคุณสมบัติของซูโครสเมื่อเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีความสัมพันธ์ที่คล้ายคลึงกับทรีฮาโลส คือสามารถป้องกันเซลล์ของเชื้อ *L. bulgaricus* จากการบาดเจ็บเนื่องจากความเย็นในขณะทำการเก็บรักษาได้

ค) แลคโตส (lactose)

แลคโตสที่ความเข้มข้นร้อยละ 1-10 (เฉลี่ยร้อยละ 8) ใช้เป็นสารป้องกันเซลล์ได้ดีกว่ากลีเซอรอล ในกลีเซอรีน *L. lactis* ssp. *lactis* เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -20 ถึง -70 องศาเซลเซียส (Chavarri และคณะ. 1988) นอกจากนี้แลคโตสยังมีผลต่อการแช่แข็งของเชื้อ *E. coli* (Doebbler. 1966), *Lactobacillus delbrueckii* (Panooff และคณะ. 2000) และ *Saccharomyces cerevisiae* แต่ให้ผลน้อยมากในเชื้อ *Streptomyces tenebrarius* (Daily และ Higgins. 1973) และไร้ประสิทธิภาพในการป้องกันเซลล์จากความเย็นให้กับเชื้อไซยาโนแบคทีเรีย และ *Spirulina platensis* (Takano และคณะ. 1973)

ง) ทรีฮาโลส (trehalose)

ทรีฮาโลสใช้เป็นสารป้องกันเซลล์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5-19 (เฉลี่ยร้อยละ 10) โดยใช้กับเชื้อไวรัส *S. cerevisiae* ไชโครฟิลิกัสต์ *L. bulgaricus* และ ไมคอไรซอลฟิงไจ (Coutinho และคณะ. 1988 ; Diniz-Mendes และคณะ. 1999 ; Breierová. 1994) นอกจากนี้ Crowe และคณะ. (1996) ได้รายงานวาทรีฮาโลส ให้ผลในการป้องกันเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์จากการทำแห้งได้ดีกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ ในขณะที่ Leslie และคณะ. (1995) ได้ทดลองใช้ทรีฮาโลสช่วยป้องกันเซลล์ของ *E. coli* และ *Bacillus thuringiensis* ในระหว่างการแช่แข็งแห้งและเก็บรักษา พบว่าทำให้อัตราการบาดเจ็บของเชื้อทั้งสองลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.4.2 โพลีอัลกอฮอล์ (polyalcohols)

โพลีอัลกอฮอล์ที่นิยมใช้เป็นสารป้องกันเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากความเย็นได้แก่

ก) ซอร์บิทอล (sorbitol)

Carvalho และคณะ (2003) ได้ทำการทดลองพบว่าซอร์บิทอลช่วยป้องกันเซลล์ของเชื้อ *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecalis* และ *Enterococcus durans* ได้ดีในระหว่างทำการเก็บรักษา นอกจากนี้ Fonseca และคณะ (1996) ได้ศึกษาผลของซอร์บิทอลที่มีต่อเชื้อ *S. thermophilus* พบว่าซอร์บิทอลช่วยให้จุลินทรีย์อยู่รอดในระหว่างเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง แต่กิจกรรมและความสามารถของเชื้อหลังการแช่แข็งนั้นพบว่าลดลง การป้องกันการสูญเสียของเซลล์โดยใช้ซอร์บิทอลขึ้นอยู่กับกลไกพื้นฐานดังนี้

1. ป้องกันการถูกทำลายที่เนื้อเยื่อเซลล์โดยผ่านทางทำปฏิกิริยาร่วมกันของซอร์บิทอลและเยื่อหุ้มเซลล์ และป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่มีคุณสมบัติที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน (anti-oxidant) (Linders และคณะ. 1997)

2. รักษาความเสถียร โครงสร้างของโปรตีนและรักษารูปแบบประกอบของโปรตีนที่มีหน้าที่ซับซ้อนร่วมกัน (Wisselink และคณะ. 2002)

3. รักษาความดันออสโมติก (Yoo และ Lee. 1993)

2.6.4.3 เอไมด์และไอไมด์ (Amides and imides)

เอไมด์และไอไมด์ชนิดที่ใช้เป็นสารป้องกันเซลล์ให้กับแบคทีเรียกรดแลคติกได้แก่

ก) อะซิทาไมด์ (Acetamides)

อะซิทาไมด์ ไดเมทิลอะซิทาไมด์ (Dimethylacetamide) และไดเมทิลฟอมาไมด์ (Dimethylformamide) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 พบว่าสามารถป้องกันเซลล์ให้กับเชื้อ *E. coli* จากความเย็นได้ดีเช่นเดียวกับ กลีเซอรอล และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ส่วนฟอมาไมด์ (น้ำหนักโมเลกุล 45.04) พบว่าให้ผลในการปกป้องเชื้อได้น้อยมาก (Nash และคณะ. 1963) นอกจากนี้ Lovelock (1954) ได้ทดลองใช้อะซิทาไมด์ (Acetamides) เป็นสารป้องกันเซลล์จากความเย็น โดยการเติมอะซิทาไมด์ในหางนมในปริมาณร้อยละ 0.5 หรือ 2.0 ให้กับเชื้อ *L. lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* และ *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* (Gibson และคณะ. 1966) พบว่าเชื้อสามารถต้านทานความเย็นได้ดีขึ้น

ข) ซัคซินิไมด์ (Succinimide)

ซัคซินิไมด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.3 สามารถป้องกันการบาดเจ็บของเชื้อ *Lactobacillus leichmannii* ที่อุณหภูมิต่ำได้ดี (Johannsen. 1972)

2.6.4.4 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Me₂SO)

Panoff และคณะ (2000) ได้ทำการทดสอบผลของสารที่ใช้ป้องกันเซลล์ชนิดต่างๆ โดยการเติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Me₂SO) กลีเซอรอล แลคโตส ซูโครส และทรีฮาโลสลงในสารแขวนลอยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CPI 101027T จากนั้นทำการแช่แข็งเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และทำให้ละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าไดเมทิลซัลฟอกไซด์ช่วยให้เชื้ออยู่รอดได้ดีกว่า กลีเซอรอล แลคโตส ซูโครส และทรีฮาโลส

2.6.4.5 สารประกอบเชิงซ้อน (Complex compound)

ก) ยีสต์สกัด (Yeast extract)

ยีสต์สกัดที่ประกอบด้วย ไนโตรเจนร้อยละ 11 ฟอสเฟตร้อยละ 3 เถ้าร้อยละ 12 เกลือร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และวิตามิน ได้แก่ กรดไนโคตินิก ไรโบฟลาวิน และสารประกอบอื่นๆ โดยยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25-5 (เฉลี่ยร้อยละ 5) พบว่าให้ผลดีในการป้องกันเซลล์เมื่อเผชิญกับอุณหภูมิที่ต่ำเช่นเดียวกับกลีเซอรอลหรือไดเมทิลซัลฟอกไซด์ และดีกว่าสารป้องกันเซลล์ชนิดอื่นๆ เช่น ซูโครส เคซีน อัลบูมินในไข่ (egg albumin) กลูตาเมต และน้ำแอปเปิ้ล ซึ่งใช้เป็นสารป้องกันเซลล์ให้กับเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (Baumann และ Reinbold. 1966 ; Johannsen. 1972 ; Speck และ Cowman. 1970)

ข) มอลต์สกัด (Malt extract)

มอลต์สกัดที่นิยมใช้จะประกอบด้วย มอลโตสร้อยละ 52 เดกซ์ตรินร้อยละ 15 คาร์โบไฮเดรตอื่นๆร้อยละ 6 และโปรตีนร้อยละ 5 โดยมีมอลต์สกัดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-20 (เฉลี่ยร้อยละ 2.5) น้ำหนักต่อน้ำหนัก ใช้ป้องกันเซลล์จากความเย็นให้กับแบคทีเรียกรดแลคติกที่อยู่ในอาหาร hydroxyethyl starch ได้ดี (Johannsen. 1972)

ค) หางนม (Skim milk)

ในการผลิตกล้าเชื้อสำหรับผลิตภัณฑ์นมโดยปกติจะถูกทำให้อยู่ในรูปการทำแห้งแบบเยือกแข็งเพื่อให้การเก็บรักษาได้ยาวนาน โดยหางนมเป็นสารป้องกันเซลล์พื้นฐานที่ได้ทดสอบแล้วพบว่าให้ผลดีสำหรับการเก็บรักษากล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (Champagne และคณะ. 1991) ในปี 1985 Ivanova และ Dzhevizov ได้ทำการเปรียบเทียบผลของการเติมหางนม ยีสต์ บรอกโมโนโซเดียม กลูตาเมต และซูโครส ต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Streptococcus* ซึ่งใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักพบว่าหางนมให้ผลดีที่สุด รองลงมาได้แก่ โมโนโซเดียมกลูตาเมต เดกสเตรนและซูโครสตามลำดับ

2.6.5 กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสำหรับผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาในปัจจุบันนอกจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จะต้องปราศจากกลิ่นและรสชาติที่ไม่พึงประสงค์แล้ว คุณค่าและประโยชน์ของอาหารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ปลาทั้งหมดที่ได้ก็

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำคัญอย่างยิ่ง ด้วยเหตุนี้ถ้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจึงถูกนำมาใช้ในกระบวนการหมักเพื่อยกระดับผลิตภัณฑ์ปลาไปสู่อุตสาหกรรม (Jeppesen และ Huss. 1993)

Gelman และคณะ (2001) ได้ทำการทดลองหมักปลาเฮอริง (herring) ร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้จากปลาเฮอริงสด เมื่อหมักปลาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 สัปดาห์ พบว่าเชื้อ *L. mesenteroides* และเชื้อ *L. plantarum* แบคทีเรียยีสต์สูงทำให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วอีกทั้งเกิดกลิ่นและรสชาติเป็นที่น่าพอใจ นอกจากนี้ได้มีรายงานว่า เชื้อ *L. plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* ที่นำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ซอสปลาหมักและอาหารสัตว์สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินและสารชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกับแบคทีเรียโพรไบโอติก (Nambudiry. 1986 ; Yoon และคณะ. 1997 ; Helander และคณะ. 1997 ; Suma และคณะ. 1998)

ในประเทศไทยมีผลิตภัณฑ์ปลาหมักหลายชนิดด้วยกัน ซึ่งการผลิตในการค้ำนนั้นยังคงใช้เชื้อจากธรรมชาติ ซึ่งได้มีการทดลองหมักปลาด้วยเชื้อบริสุทธิ์ เช่น การเติมเชื้อ *Pediococcus cerevisiae* จะทำให้ปลาเจ้ที่หมักเป็นเวลา 5 วัน มีค่าพีเอชและปริมาณกรดใกล้เคียงกับปลาเจ้ที่หมัก โดยวิธีธรรมชาติเป็นเวลา 10 วัน นอกจากนี้การเติม *P. cerevisiae* หรือ *L. brevis* พบว่าทำให้หมักปลาได้เร็วขึ้น (นาถสุตา วิสววงศ์. 2522) สำหรับไคปลา กุ้งจ่อมและหอยแมลงภู่นั้นพบว่าการหมักโดยใส่เชื้อ *Pediococcus halophilus* สามารถลดระยะเวลาหมักและได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นรสไม่ต่างจากการหมักด้วยเชื้อจากธรรมชาติ (จินดารัตน์ นิติวฒนพงษ์. 2522)

2.6.6 การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกเพื่อยับยั้งและการทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค

สารที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างขึ้นเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่างๆ มีดังนี้

1. เกิดจากกรดแลกติก (Amster และ Jost. 1980)
2. ผลร่วมระหว่างกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Abdel-Bar และ Harris. 1984 ;

Gilland และ Speck. 1977)

3. สารอื่นๆนอกเหนือจากกรดแลกติกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งได้แก่ สาร Nisin และ Diplococcin ที่ผลิตจากเชื้อ *Streptococcus* spp. (Hirsch. 1951) สาร Lactolin จากเชื้อ *L. plantarum* (Kearney และคณะ. 1990) สาร Acidolin, Lactocidin และ Acidophilin จากเชื้อ *L. acidophilus* (Hamdan และ Mikolajoik. 1975) และสาร Buigarican จากเชื้อ *L. bulgaricus* (Reddy และ Shahani. 1971) โดยสารที่ผลิตขึ้นจากเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกเหล่านี้จะมีฤทธิ์ยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์อื่นๆ

อรนุช อุดรภิชาติ. (2530) ได้ทดสอบ *Pediococcus* spp. 78 สายพันธุ์ และ *Lactobacillus* spp. 34 สายพันธุ์ ในการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* 8 ซีโรไทป์ พบว่าแต่ละสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* ได้แตกต่างกัน และเมื่อคัดเลือก *Pediococcus* sp. และ *Lactobacillus* sp. ที่มีประสิทธิภาพดีนำมาผลิตเป็นก๊าล้างและใช้เป็นก๊าล้างหมักแทนที่เดิม *Salmonella* พบว่าการใช้กล้าเชื้อทั้งสองผสมกันจะให้ผลที่ดีทั้งในด้านการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* และคุณภาพของผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.7 ประโยชน์ของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมีผลดีต่อการแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หลายชนิดด้วยกัน ได้แก่

1. ช่วยลดระยะเวลาการหมัก เช่นการใช้กล้า ACCEL หมักไส้กรอกหลายชนิดจะลดระยะเวลาการหมักที่ใช้อยู่เดิมประมาณ 150 ชั่วโมง ให้เหลือเพียง 32-48 ชั่วโมง (Niinivaara และคณะ. 1964)
2. สามารถควบคุมการหมักและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ง่ายขึ้น
3. ลดการสะสมของไนโตรซามีนอันเป็นสารก่อมะเร็ง กล่าวคือการเติมกล้าเชื้อทำให้การผลิตกรดเป็นไปอย่างรวดเร็วมีผลให้ไนโตรที่ที่เกิดจากการรีดิวส์ไนเตรทหรือที่เติมลงในผลิตภัณฑ์สลายเป็นไนตรัสออกไซด์ จึงทำให้ปริมาณการสะสมของไนโตรที่ลดลง การเกิดไนโตรซามีนจึงลดลงตามด้วย (Doods และ Collins-Thomson. 1984)
4. กล้าเชื้อหลายชนิด เช่น *Pediococcus* spp. และ *Micrococcus* spp. ผลิตเอนไซม์ซูโดแคตาเลส (pseudocatalase) ซึ่งมีปฏิกิริยาเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำและออกซิเจน เป็นการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้หมดไป ซึ่งสารเหล่านี้มีผลทำให้สีของผลิตภัณฑ์ซีดไม่น่ารับประทาน
5. ลดระดับฮีสตามีนในอาหารหมัก การหมักโดยใช้เชื้อจากธรรมชาติโดยปกติในอาหารหมักจะพบจุลินทรีย์ปนกันอยู่หลายชนิด จุลินทรีย์ชนิดที่ผลิตเอนไซม์ฮีสตามีนดีคาร์บอกซิเลสจะเปลี่ยนฮีสตามีนเป็นฮีสตามีน การเติมกล้าเชื้อจะทำให้การหมักเกิดขึ้นรวดเร็วจึงเป็นการยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์เหล่านั้น
6. ยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรค ซึ่งปัจจุบันเป็นวัตถุประสงค์หลักข้อหนึ่งของ การใช้กล้าเชื้อในการแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (นภา โถ่ห้ทอง. 2534)

บทที่ 3

การวิจัยและการดำเนินงาน

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างแฮมปลาและเนื้อปลาสด

ตัวอย่างอาหารหมักที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 15 ตัวอย่าง ได้แก่ แฮมปลา 10 ตัวอย่างจากตลาด ก.ม. 8 ตลาดหัวตะเข้ ตลาดสี่มุมเมือง ตลาดมีนบุรี ตลาดบางกะปิ ตลาดนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง ตลาดน้ำชัย ตลาดพัฒนาการ ตลาด ก.ม. 2 และตลาดพระโขนง เนื้อปลาสด 5 ตัวอย่างจากตลาดมีนบุรี ตลาดหัวตะเข้ ตลาดก.ม. 8 และตลาดนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากตัวอย่าง ได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 และ *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 451 ได้จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และ *Listeria monocytogenes* DMST 11256 ได้จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายที่ใช้ทำเจือจางตัวอย่างและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ de Man Rogosa Sharpe broth/ de Man Rogosa Sharpe Agar/ de Man Rogosa Sharpe Soft Agar (MRS, พีเอช 7.1 ± 0.2 , Difco), Bacteriocin-Screening-Medium Agar (BSM), Tryptic Soy broth/ Tryptic Soy Agar (TSB/TSA, พีเอช 7.1 ± 0.2 , Difco) Tryptic Soy Yeast Extract (TSYE Soft Agar, พีเอช 7.1 ± 0.2) และ Luria-Bertani (LB)

สารละลายที่ใช้ทำเจือจางตัวอย่างและสารเคมี ได้แก่ สารละลายเพปโดน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 สารละลายกรดแลคติก ความเข้มข้นร้อยละ 85 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 5 โมลาร์ เกลีน้าดี โซเดียมคลอไรด์ และแคลเซียมคาร์บอเนต

สารเคมีสำหรับการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส ได้แก่ บัฟเฟอร์ PCR บัฟเฟอร์ TE (Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0) สารละลายบัฟเฟอร์ TE (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0) สารละลายฟีนอลอิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE (Tris-EDTA -buffer saturated phenol)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บัฟเฟอร์ TBE (Tris-HCl 0.89 โมลาร์ กรดโบริก (boric acid) 0.89 โมลาร์ และ EDTA 0.02 โมลาร์) โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โซเดียมอะซิเตต 3 โมลาร์ สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 สารละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 99 สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ สารละลายไดออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) ไพร์เมอร์ FDNA ไพร์เมอร์ RDNA เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase อะกาโรส (agarose) เจลสตาร์ (gelstar) และ ดีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking dye)

สารป้องกันเซลล์ (cryoprotectant) ได้แก่ นมถั่วเหลือง หางนมผง ไข่แดง ซูโครส แลคโตส กลูโคส ทรีฮาโลส และซอร์บิทอล

3.1.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองได้แก่ เครื่องหมุนเหวี่ยง (บริษัท Harmle, รุ่น Z383K) ตู้ปัมเชื้อ (บริษัท Memmert) เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Microplate reader รุ่น iEMS Reader MF, Labsystems) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine, บริษัท Perkin Elmer, รุ่น DNA thermal cycler 480) เครื่องทำแห้งแบบใช้ความเย็น (Freeze-Dry, บริษัท Heto LyoLab, รุ่น 3000)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การวิเคราะห์จำนวนและการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในแฮมปลาและเนื้อปลาสด

3.2.1.1 การตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกในแฮมปลาและเนื้อปลาสด

การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในแฮมปลาและเนื้อปลาสดด้วยเทคนิค spread plate ทำโดยชั่งแฮมปลาและเนื้อปลาสดตัวอย่างละ 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นใส่ลงในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปตีปั่นด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางตัวอย่างแฮมปลาและเนื้อปลาสดจนถึงระดับความเจือจาง $1:10^6$ จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^4 ถึง 10^6 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ในอาหารแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.5 กรัมต่อปริมาตร ระดับความเจือจางละ 3 จาน เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วปลอดปราศจากเชื้อ คว่ำจานแล้วนำไปบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารที่มีจำนวนโคโลนี 25-250 โคโลนี คำนวณหาจำนวนโคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง (อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2542)

3.2.1.2 การแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการแยกเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียกรดแลคติกในข้อ 3.2.1.1 ที่มีวงใส (clear zone) รอบๆโคโลนี สุ่มเลือกจากโคโลนีทั้งหมด 138 โคโลนีโดยใช้เข็มปราศจากเชื้อแตะเชื้อจากโคโลนี ที่เลือกและแทงลงในหลอดอาหารแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 1 กรัมต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในขั้นต่อไป (อดิศร เสตวิวัฒน์. 2542)

3.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์

การทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 138 ไอโซเลต ทำโดยวิธี agar spot test (Fleming และคณะ. 1985) โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกเก็บไว้จากข้อ 3.2.1.2 แต่ละไอโซเลตจำนวน 138 ไอโซเลต ลงในหลอดอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ในข้างต้นมาและบนผิวหน้าอาหาร Bacteriocin Screening Medium (BSM) ซึ่งประกอบด้วย กลูโคส 2 กรัม เนื้อสกัด 2 กรัม ทริปโตน 10 กรัม บิสต์สกัด 4 กรัม tween 80 1 มิลลิลิตร $(\text{NH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6$ 2 กรัม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 กรัม $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05 กรัม $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 8.7 กรัม KH_2PO_4 8 กรัม และผงวุ้น 15 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร (Tichaczek และคณะ. 1992) ที่แบ่งเป็นช่องๆไว้ 8 ช่อง โดยใส่ช่องละ 1 ไอโซเลต ตัวอย่างละ 5 จาน และบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบการผลิตสารยับยั้งได้แก่ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ในอาหารเหลว TSB *P. acidilactici* และ *L. bulgaricus* ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อเหล่านี้แต่ละชนิดในปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ใน de Man Rogosa Sharpe Soft Agar (MRS soft agar) หรือ Tryptic Soy Yeast Extract Soft Agar (TSYE soft agar) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ผสมเชื้อให้กระจายทั่วอาหาร soft agar ด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) จากนั้นเทเชื้อแต่ละชนิดลงบนจานอาหาร BSM ที่บ่มแล้วข้างต้น โดยเชื้อที่ใช้ทดสอบ 1 เชื้อต่อ 1 จาน เกลี่ย soft agar ให้ทั่วจาน นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปทำการบ่ม โดยจานเพาะเชื้อที่ใช้เชื้อ *P. acidilactici* และ *L. bulgaricus* บ่มในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* บ่มในสภาวะมีอากาศที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติก จากนั้นคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่เกิดโซนใสรอบๆ โคโลนีในอาหารที่มีเชื้อที่ใช้ในการทดสอบชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะเลี้ยงและเก็บไว้ใช้ในขั้นต่อไป

3.2.3 การทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์

3.2.3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์จากข้อ 3.2.2 แต่ละไอโซเลตจากอาหารแข็ง MRS 1 ลูบ ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตรและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งและล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลายเพปโทน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยในการล้างแต่ละครั้งจะบีบอัดสารละลายเพปโทนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นทำให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์ด้วยสารละลายเพปโทน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตปรับความเข้มข้นให้เท่ากัน โดยใช้ McFarland Standard เบอร์ 3 จะให้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^7 ถึง 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

3.2.3.2 การทดสอบการทนต่อกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการทดสอบการทนต่อกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยเติมสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้จากข้อ 3.2.3.1 แต่ละไอโซเลตปริมาตรร้อยละ 25 ในอาหารเหลว MRS ที่ปรับค่าพีเอชด้วยกรดแลคติกจนได้ค่าพีเอชที่ต่างกัน 8 ระดับ ได้แก่ 6.30, 5.30, 4.00, 3.70, 3.35, 3.20, 2.90 และ 2.70 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงก่อนบ่มและหลังบ่มด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร หาค่าพีเอชต่ำสุดที่เชื้อแต่ละไอโซเลตสามารถเจริญได้ โดยเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้จนทำให้เกิดความขุ่นที่ค่าพีเอชระดับนี้ (สังเกตจากค่าการดูดกลืนแสงหลังบ่มมากกว่าก่อนบ่ม)

3.2.3.3 การทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.2 ในอาหารเหลว MRS ที่ปรับค่าพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 5 โมลาร์ จนได้ค่าพีเอชที่ต่างกัน 8 ระดับ ได้แก่ 6.30, 5.00, 3.70, 3.00, 2.60, 2.20, 2.00 และ 1.90 หาค่าพีเอชต่ำสุดที่เชื้อแต่ละไอโซเลตเจริญได้

3.2.3.4 การทดสอบการทนต่อโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการทดสอบการทนต่อโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.2 ในอาหารเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นประโยชน์ในการนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสาร กรุณาแจ้งเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อยละ 0, 1.50, 3.00, 4.50, 6.00, 7.50, 9.00 และ 10.50 หากค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงสุดที่เชื้อแต่ละไอโซเลตสามารถเจริญได้

3.2.3.5 การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลกติก

ทำการทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกแต่ละไอโซเลต เช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.2 ในอาหารเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0, 0.75, 1.50, 2.25, 3.00, 3.75, 4.50 และ 5.25 หากความเข้มข้นของเกลือน้ำดีสูงสุดที่เชื้อแต่ละไอโซเลตสามารถเจริญได้

หลังจากการทดสอบการทนต่อกรดแลกติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดี ของเชื้อแต่ละไอโซเลต คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีความสามารถสูงสุดในการทนต่อสารต่างๆเหล่านี้ จำนวน 2 ไอโซเลต

3.2.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติก

3.2.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลกติก 2 ไอโซเลต ซึ่งได้คัดเลือกจากข้อ 3.2.3 นำมาข้อมแกรมโดยเกลี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกแต่ละไอโซเลตลงในหยดน้ำบนสไลด์ ตรึงเช็ดด้วยความร้อน จากนั้นหยดสียคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) ให้ท่วมเชื้อทิ้งไว้ 1 นาที และล้างสียคริสตัลไวโอเลตด้วยน้ำ จากนั้นหยดน้ำยาแกรมไอโอดีนให้ท่วมเชื้ออีกครั้ง และทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที ล้างน้ำยาแกรมไอโอดีนด้วยน้ำแล้วตามด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 20 วินาที หยดสียซาฟรานีน (safranin) และทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ ตรวจสอบรูปร่างและการติดสีของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.2.4.2 การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH

ทำการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.1 โดยปรับความขุ่นของแบคทีเรียกรดแลกติก 2 ไอโซเลตให้มีความขุ่นเป็น 2 เท่าของ McFarland Standard เบอร์ 4 จากนั้นใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดสารแขวนลอยของเซลล์แต่ละไอโซเลตปริมาณ 0.4 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร API 50 CHL medium ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

ทำการแบ่ง API 50 CH strips ออกเป็น 5 strips ย่อยคือ strip 0-9, 10-19, 20-29, 30-39, และ 40-49 รวมทั้งหมด 49 หลอด โดยแต่ละหลอดประกอบด้วยสารต่างๆ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สารที่ใช้ทดสอบลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลกติกโดยใช้ชุดทดสอบ

API50 CH

Cupule	ชนิดสารที่ใช้ทดสอบ	Cupule	ชนิดสารที่ใช้ทดสอบ
0	Control	25	Esuculin ferric citrate
1	Glycerol	26	Salicin
2	Erythritol	27	D-Celibiose
3	D-Arabinose	28	D-Maltose
4	L-Arabinose	29	D-Lactose
5	D-Ribose	30	D-Melibiose
6	D-Xylose	31	D-Saccharose
7	L-Xylose	32	D-Trehalose
8	D-Adonitol	33	Inulin
9	Methyl- β -D-Xylopyranoside	34	D-Melezitose
10	D-Galactose	35	D-Raffinose
11	D-Glucose	36	Amidon
12	D-Fructose	37	Glycogen
13	D-Mannose	38	Xylitol
14	L-Sorbose	39	Genitiobiose
15	L-Rhamnose	40	D-Turanose
16	Dulcitol	41	D-Lyxose
17	Inositol	42	D-Tagatose
18	D-Mannitol	43	D-Fucose
19	D-Sorbitol	44	L-Fucose
20	Methyl- α -D-Mannopyranoside	45	D-Arabinose
21	Methyl- α -D-Glucopyranoside	46	L-Arabinose
22	N-Acetylglucosamine	47	Potassium Gluconate
23	Amyldalin	48	Potassium 2-Ketogluconate
24	Arbutin	49	Potassium 5-Ketogluconate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นเติมสารแขวนลอยของเซลล์แต่ละไอโซเลตที่ได้เตรียมไว้ลงบนชุด API 50 CH strips ที่ได้แบ่งไว้ โดยขณะปล่อยเซลล์จุลินทรีย์ลงในแต่ละหลอดให้เอียง strips เล็กน้อยและตะปลายปิเปตลงบน cupule ของแต่ละหลอดเพื่อป้องกันการเกิดฟอง จากนั้นทำการเติมเชื้อ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรต่อหลอด เติมจนครบทั้ง 50 หลอดและปิดทับด้วย mineral oil นำ strips ทั้งหมดใส่ลงในภาชนะที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดฝาครอบ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้นในช่วงโมเมนต์ 24 และ 48 ถ้าอาหาร เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองแสดงว่าเกิดการหมัก (ให้ผลบวก) ยกเว้นในหลอดที่ 25 ซึ่งเป็นสาร Esuculin ferric citrate ถ้าเกิดการหมัก (ให้ผลบวก) อาหารจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีดำและถ้า อาหารไม่เปลี่ยนสี (สีม่วง) แสดงว่าไม่เกิดการหมัก (ให้ผลลบ) บันทึกผลการทดลองและวิเคราะห์ ผลการทดลองที่ได้โดยใช้โปรแกรม API Identification Software (Bio Merieux) จะทราบถึงชนิด (species) ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่ทดสอบ

3.2.4.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

ก) การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลกติก

นำแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้จำนวน 2 ไอโซเลต แต่ละไอโซเลตตากลงบน อาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เชื้อเชื้อแต่ละไอโซเลตที่เจริญบนอาหาร LB ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ที่มี Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ไลโซไซม์ (lysozyme) 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุม อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายฟีนอลที่อิ่มตัวด้วย บัฟเฟอร์ TE 1 เท่า ปริมาตร 420 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมา ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสขึ้นบนมาสกัดอีก 2 ครั้ง ด้วยฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE 1 เท่า จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนจากการสกัดครั้งสุดท้าย ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติมเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 99 ปริมาตร 440 ไมโครลิตร แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใสด้านบนและล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้งและตากตะกอนให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 20

ไมโครลิตร และเติมสารละลาย RNase ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จะได้จีโนมิกดีเอ็นเอเพื่อนำไปทำการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

ข) การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

เตรียมเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยชั่งอะกาโรส 0.64 กรัม เติมนั้บัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ทำให้ละลายในไมโครเวฟทิ้งไว้ให้อุ่น เติมสารละลายเจลสตาร์ (gelstar) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทใส่แม่พิมพ์เจล เมื่อแผ่นเจลแข็งย้ายแผ่นเจลลงอ่าง (gel chamber) เติมนั้บัฟเฟอร์ TBE ให้ท่วมแผ่นเจล นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดข้างต้น (ก) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อมและหยอดลงในหลุมแผ่นเจล ทำการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเจลไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

ค) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอวิธีนี้เป็น การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขึ้นส่วนเป้าหมาย (target DNA) ในหลอดทดลองโดยให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและซ้ำกันหลายๆ รอบเป็นลูกโซ่ โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและมีองค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาซึ่งมีปริมาณของสารชนิดต่างๆดังนี้

น้ำกลั่น	33.5	ไมโครลิตร
บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5.0	ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์	3.0	ไมโครลิตร
สารละลายไดออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) ความเข้มข้น 10 โมลาร์	1.0	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ FDNA (5'-TCCTACGGAGGCAGCAG-3')	2.5	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ RDNA (5'-TTGTGCGGGCCCCGTCAAT-3')	2.5	ไมโครลิตร
จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.2.4.3 (ก)	2.0	ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.5	ไมโครลิตร

จากนั้นนำหลอดจีโนมิกดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) ที่มีสภาวะดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ขั้นตอนที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1	94	10 นาที
2	94	30 วินาที
	55	30 วินาที
	72	30 วินาที
3	72	10 นาที

จากนั้นเมื่อครบกำหนดเวลานำหลอด PCR ที่บรรจุดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสเช่นเดียวกับข้อ (ข)

ง) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA

นำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลตไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี Big dye Terminator Reaction ด้วยเครื่อง ABIPRISM[®] 3700 DNA Analyzer นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานในธนาคารยีน โดยใช้โปรแกรม BLAST server ของ National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

3.2.5 การศึกษาผลของสารป้องกันเซลล์ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการแช่แข็งแห้ง

3.2.5.1 ผลของสารป้องกันเซลล์ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลคติกหลังการแช่แข็งแห้ง

ทำการเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกจำนวน 2 ไอโซเลตด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.1 ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อแต่ละไอโซเลตปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารป้องกันเซลล์ทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ น้ำนมถั่วเหลือง และสารป้องกันเซลล์ชนิดอื่นๆ ความเข้มข้นร้อยละ 9.1 ในน้ำกลั่นได้แก่หางนม ไข่แดง ซูโครส แลคโตส กลูโคส ทรีฮาโลส และซอร์บิทอล ที่มีปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเก็บตัวอย่างในแต่ละขวดเพื่อตรวจนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยใช้เทคนิค pour plate ด้วยอาหารวุ้น MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar

นำขวดสารละลายที่ผสมกับเชื้อไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และนำเข้าเครื่องแช่แข็งแห้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้ล้าเชื้อแห้ง ซึ่งหาคำนวณของล้าเชื้อ จากนั้นตรวจนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทำแช่แข็งแห้งในแต่ละตัวอย่างโดยใช้เทคนิค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pour plate ด้วยอาหารวุ้น MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพที่มี ออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

คัดเลือกสารป้องกันเซลล์ 6 ชนิดที่ทำให้แบคทีเรียกรดแลกติกจำนวน 2 ไอโซเลตอยู่ รอดได้ดีที่สุดหลังการแช่แข็งแห้งของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4 เพื่อนำมา พัฒนาเป็นสูตรผสมของสารป้องกันเซลล์ในขั้นต่อไป

3.2.5.2 ผลของสูตรสารป้องกันผสมต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลกติกหลังการ แช่แข็งแห้ง

นำสารป้องกันเซลล์ 6 ชนิด ที่ทำให้แบคทีเรียกรดแลกติกจำนวน 2 ไอโซเลตที่คัดเลือก อยู่รอดได้ดี ภายหลังการทำแช่แข็งแห้งได้แก่ นมถั่วเหลือง หางนม แลคโตส ซูโครส ทรีฮาโลส และซอร์บิทอล มาผสมกันทั้งหมด 9 สูตร โดยมีปริมาณส่วนผสมในสูตรสารป้องกันผสมดังนี้ (ตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.3 ส่วนผสมของสารป้องกันเซลล์ทั้งหมด 9 สูตร

สูตรอาหารที่	ปริมาณส่วนผสมในสูตรสารป้องกันผสม (กรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักส่วนผสมทั้งหมด)
1	แลคโตส 0.97 กรัม ซูโครส 0.97 กรัม ทรีฮาโลส 0.97 กรัม และนมถั่วเหลือง 97.10 กรัม
2	แลคโตส 4.35 กรัม ซูโครส 4.35 กรัม ทรีฮาโลส 4.35 กรัม และนมถั่วเหลือง 86.96 กรัม
3	แลคโตส 0.96 กรัม ซูโครส 0.96 กรัม ทรีฮาโลส 0.96 กรัม ซอร์บิทอล 0.96 กรัม และนมถั่วเหลือง 96.15 กรัม
4	หางนมผง 9.65 กรัม แลคโตส 0.88 กรัม ซูโครส 0.88 กรัม ทรีฮาโลส 0.88 กรัม และนมถั่วเหลืองค่อน้ำกลั่น (อัตราส่วน 1:1) 87.72 กรัม
5	หางนมผง 8.73 กรัม แลคโตส 3.97 กรัม ซูโครส 3.97 กรัม ทรีฮาโลส 3.97 กรัม และนมถั่วเหลืองค่อน้ำกลั่น (อัตราส่วน 1:1) 79.40 กรัม
6	หางนมผง 9.57 กรัม แลคโตส 0.87 กรัม ซูโครส 0.87 กรัม ทรีฮาโลส 0.87 กรัม ซอร์บิทอล 0.87 กรัม และนมถั่วเหลืองค่อน้ำกลั่น (อัตราส่วน 1:1) 86.96 กรัม
7	หางนมผง 9.65 กรัม แลคโตส 0.88 กรัม ซูโครส 0.88 กรัม ทรีฮาโลส 0.88 กรัม และน้ำกลั่น 87.72 กรัม
8	หางนมผง 8.73 กรัม แลคโตส 3.97 กรัม ซูโครส 3.97 กรัม ทรีฮาโลส 3.97 กรัม และน้ำกลั่น 79.36 กรัม
9	หางนมผง 9.57 กรัม แลคโตส 0.88 กรัม ซูโครส 0.88 กรัม ทรีฮาโลส 0.88 กรัม ซอร์บิทอล 0.88 กรัม และน้ำกลั่น 86.96 กรัม

เตรียมสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก 2 ไอโซเลต ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.1 โดยปรับความขุ่นของเซลล์โดยใช้ McFarland Standard เบอร์ 4 จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร จากนั้นปีเปิดสารแขวนลอยเซลล์แต่ละไอโซเลต ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารป้องกันเซลล์แต่ละสูตรทั้งหมด 9 สูตรตามตารางที่ 3.3 ที่มีปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตรวจนับจำนวนเชื้อเริ่มต้นโดยใช้เทคนิค pour plate ด้วยอาหารวุ้น MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar จากนั้นนำส่วนผสมของสารป้องกันกับเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลกติกไปแช่แข็งแห้งและตรวจนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งแห้งเช่นเดียวกับข้อ 3.2.5.1 บันทึกผลและคัดเลือกสูตรที่ทำให้การอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลกติกแต่ละไอโซเลตสูงสุด

3.2.6 การศึกษาผลของการปรับตัวต่อความดันออสโมติกและการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นต่อการอยู่รอดหลังแช่แข็งแห้งและเก็บรักษา

3.2.6.1 การเตรียมแบคทีเรียกรดแลกติกที่ไม่ผ่านการปรับตัว

ทำการเตรียมแบคทีเรียกรดแลกติก 2 ไอโซเลตด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.1 และปรับความขุ่นเท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 4 จะได้เชื้อที่ไม่ผ่านการปรับตัวที่มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตรเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.2.6.2 การเตรียมแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก

เตรียมแบคทีเรียกรดแลกติก 2 ไอโซเลตด้วยวิธีการเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.3.1 และปรับความขุ่นด้วย McFarland Standard เบอร์ 4 จากนั้นปีเปิดสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่มีซูโครส ความเข้มข้น 3 โมลาร์ เป็นส่วนประกอบ ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์และปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 4 จะได้เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก

3.2.6.3 การเตรียมแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็น

ทำการเตรียมแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 2 ไอโซเลตที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.6.2 จากนั้นปีเปิดสารแขวนลอยของเชื้อแต่ละไอโซเลตปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสูตรผสมของสารป้องกันเซลล์ที่ทำให้แบคทีเรียกรดแลกติกแต่ละไอโซเลตมีการอยู่รอดสูงสุดสูตรละ 9 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันและนำไปทำให้เซลล์ปรับตัวต่อความเย็นโดยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการวิจัยเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อที่ผ่านการปรับตัวต่อแรงดันออสโมติกร่วมกับการปรับตัวต่อความเย็นเพื่อตรวจนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยใช้เทคนิค pour plate ด้วยอาหารรุ้น MRS บ่มในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.6.4 การอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่ผ่านการปรับตัว ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก และผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็น

นำสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลตที่ไม่ผ่านการปรับตัวจากข้อ 3.2.6.1 สารแขวนลอยเซลล์ที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกจากข้อ 3.2.6.2 แต่ละไอโซเลตปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสูตรผสมของสารป้องกันเซลล์สูตรที่ทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตมีการอยู่รอดสูงสุดที่มีปริมาตร 9 มิลลิลิตร ตรวจนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นก่อนการแช่แข็งโดยใช้เทคนิค pour plate ด้วยอาหารรุ้น MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar จากนั้นนำสารแขวนลอยที่ผสมกับเชื้อไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องแช่แข็งแห้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้งของกล้ำเชื้อและตรวจนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งแห้งของเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับตัวและเชื้อที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก และเชื้อที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็น นำกล้ำเชื้อไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในวันที่ 0, 3, 7, 14, 21 และ 28 โดยใช้เทคนิค pour plate ด้วยอาหารรุ้น MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.3 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

นำผลการทดลองทั้ง 3 ซ้ำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธี Duncan Multiple Range Test และ Analysis of Variance ด้วยโปรแกรม SPSS Version 12

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการตรวจนับจำนวนและการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในแฮมปลาและเนื้อปลาสด

4.1.1 ผลการตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกในแฮมปลาและเนื้อปลาสด

จากการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในตัวอย่างแฮมปลาทราย 5 ตัวอย่าง แฮมปลาชะโด 5 ตัวอย่าง เนื้อปลาทราย 3 ตัวอย่าง และเนื้อปลาชะโด 2 ตัวอย่าง ในอาหารแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.5 น้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าแฮมปลาทรายมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 4.2×10^8 โคโลนีต่อกรัม ถึง 2.1×10^9 โคโลนีต่อกรัม แฮมปลาชะโดมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมากกว่า 6.8×10^8 โคโลนีต่อกรัม เนื้อปลาทรายมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 3.0×10^7 โคโลนีต่อกรัม ถึง 7.3×10^7 โคโลนีต่อกรัม และเนื้อปลาชะโดมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 4.5×10^7 โคโลนีต่อกรัม ถึง 2.5×10^6 โคโลนีต่อกรัม (ตารางที่ 4.1)

การที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนมากในตัวอย่างแฮมปลาทรายและแฮมปลาชะโด คาดว่าอาจเป็นเพราะเนื้อปลาสดที่ใช้เป็นวัตถุดิบเป็นสับสเตอร์ที่ดิบของแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งเป็นกล่าเชื้อในการผลิตแฮมปลา แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเป็นจุลินทรีย์ชนิดสำคัญที่ทำให้เกิดการหมักของผลิตภัณฑ์ โดยการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตให้เป็นสารยับยั้งหลายชนิดได้แก่ ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีเรียโอซิน (Sobrinho และคณะ. 1991 ; Vandenbergh. 1993) โดยที่สารยับยั้งเหล่านี้ไม่เป็นอันตรายต่อตัวมันเอง ในปี ค.ศ. 1999 Sander และคณะ กล่าวว่าระหว่างการหมักแบคทีเรียกรดแลคติกจะต้องสามารถทนต่อการสะสมผลิตภัณฑ์ซึ่งเกิดจากการคาร์โบไฮเดรต เช่น กรดแลคติก และต้องทนต่อสภาพแวดล้อมที่อาจเป็นอันตรายต่อเซลล์ซึ่งจำเป็นต่อการหมักที่เหมาะสมของอาหารชนิดนั้นๆ สารที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกไม่เพียงทำให้รสชาติและกลิ่นของผลิตภัณฑ์อาหารหมักเป็นที่น่าพอใจเท่านั้นแต่ยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารอีกด้วย (De Vuyst และ Vandamme. 1994 ; Buckenhuskes. 1993 ; Daeschel. 1989) ในปี ค.ศ. 2002 Paludan-Müller และคณะ ได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากปลาสดที่ประกอบด้วย เนื้อปลาชะโด 750 กรัม เกลือ 100 กรัม น้ำมันปลา 1 มิลลิกรัม และข้าวคั่ว 80 กรัม พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 10^8 ถึง 10^9 ค

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคโลนีต่อกรัม ขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากปลาแฮร์ริง ซึ่งประกอบด้วยปลาแฮร์ริงสับ น้ำตาล เกลือ เครื่องเทศ (allspice) และแครอท พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 4.5×10^8 ถึง 2.4×10^9 โคโลนีต่อกรัม (Lyhs และคณะ. 2004) นอกจากนี้ Gram และ Huss (1996) ได้ทำการศึกษาชนิดและจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก พบว่าเมื่อเก็บอาหารหมักไว้หลายๆ สัปดาห์ จำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มขึ้นเป็น 10^7 ถึง 10^8 โคโลนีต่อกรัม ส่งผลให้กลิ่น รสชาติ และเนื้อสัมผัสไม่เป็นที่ยอมรับ

การที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนมากในตัวอย่างเนื้อปลากรายและเนื้อปลาชะโดคาดว่าเป็นเพราะแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถปรับตัวให้อาศัยอยู่และเจริญเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมในปลา ซึ่งเกี่ยวข้องกับปัจจัยภายในหลายประการ โดยทั่วไปปัจจัยภายในที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในเนื้อปลาที่พบว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียที่ทำให้เน่าเสียชนิดอื่นสามารถอาศัยอยู่ได้และทำให้เนื้อปลาเกิดการเน่าเสีย ได้แก่ การที่เนื้อปลามีโพสโมรเทม พีเอช (Post-mortem pH) สูง (สูงกว่า 6.0) หลังการตาย ซึ่งเนื่องมาจากการที่เนื้อปลาส่วนใหญ่มีคาร์โบไฮเดรตในปริมาณที่น้อยมาก (น้อยกว่าร้อยละ 0.5) จึงทำให้เกิดกรดแลคติกขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นหลังจากปลาทาย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้จุลินทรีย์ที่ไวต่อกรดสามารถเจริญเติบโตอยู่ในปลาได้ นอกจากนี้ในเนื้อปลายังมีสารประกอบไนโตรเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งละลายน้ำได้เช่น กรดอะมิโนอิสระ และนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นสารประกอบที่จุลินทรีย์จะเอาไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต นอกจากนี้ในเนื้อปลายังมีไตรเมทิลลามีนออกไซด์ (Trimethylamine oxide, TMAO) ซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนชนิดหนึ่งที่พบในปลาทะเลทั้งหมดและปลาน้ำจืดบางชนิด ไตรเมทิลลามีนออกไซด์นี้เป็นสาเหตุทำให้เนื้อปลามีค่าความต่างศักย์ของออกซิเดชัน-รีดักชัน (redox potential, Eh) สูง หรือมีค่าเป็นบวก อย่างไรก็ตามความสำคัญของค่า Eh ต่อการเน่าเสียของปลายังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่การมี TMAO เกี่ยวข้องกับการเน่าเสียของปลาอย่างแน่นอนโดยเฉพาะในสภาวะที่ขาดออกซิเจน แบคทีเรียที่ทำให้ปลาเน่าเสียได้แก่ *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum* และ *Vibrionaceae* สามารถใช้ TMAO ได้โดยใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการหายใจในสภาวะขาดอากาศ (anaerobic respiration) เป็นผลทำให้เกิดกลิ่นรสผิดปกติของไตรเมทิลเอมีน (trimethylamine, TMA) (Gram และคณะ. 1989)

ในปี ค. ศ. 2006 Bucio และคณะ ได้ทำการจำแนกจุลินทรีย์จากปลาแม่น้ำและปลาจากฟาร์ม พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกชนิด Lactobacilli เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่พบภายในลำไส้ของปลา นอกจากนี้ Ringø และ Gatesoupe (1998) ได้ทำการศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ในปลาพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียกลุ่มสำคัญที่พบในปลา โดยพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดที่เป็นประโยชน์จะอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของปลาและชนิดที่เป็นโทษมักพบตามเยื่อช่องท้อง ไต ตับ หัวใจ และม้าม ขณะที่ Gram และ Huss (1996) ได้รายงานว่าในผลิตภัณฑ์ปลาแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่แจ้งมติและข้อคิดเห็นของกรมประมงเท่านั้น ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และปลารมควันจากประเทศเนปาลมีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนระหว่าง $\log 4.7-8.3$ ถึง $\log 5.1-8.5$ · โคโลนีต่อกรัม นอกจากนี้ได้มีการศึกษาของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในปลา rainbow trout และปลา *Oncorhynchus mykiss* Walbaum พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก 3×10^5 โคโลนีต่อกรัม

ตารางที่ 4.1 จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดและจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

ตัวอย่าง ที่	ชนิดของตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวน แบคทีเรียกรด แลคติกทั้งหมด (โคโลนี/กรัม)	จำนวน ไอโซเลต ที่ คัดเลือก
1	ແໝປລາກຣາຍ	ตลาดหัวตะเข้ กรุงเทพฯ	2.1×10^9	10
2	ແໝປລາກຣາຍ	ตลาด ก.ม. 8 กรุงเทพฯ	6.6×10^8	9
3	ແໝປລາກຣາຍ	ตลาดสี่มุมเมือง กรุงเทพฯ	1.4×10^9	9
4	ແໝປລາກຣາຍ	ตลาดมีนบุรี กรุงเทพฯ	4.2×10^8	9
5	ແໝປລາກຣາຍ	ตลาดบางกะปิ กรุงเทพฯ	1.3×10^9	9
6	ແໝປລາຊະໂດ	ตลาดนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง กรุงเทพฯ	1.8×10^8	9
7	ແໝປລາຊະໂດ	ตลาดน้ำชัย กรุงเทพฯ	6.8×10^8	9
8	ແໝປລາຊະໂດ	ตลาดพัฒนาการ กรุงเทพฯ	TNTC	9
9	ແໝປລາຊະໂດ	ตลาด ก.ม. 8 กรุงเทพฯ	TNTC	13
10	ແໝປລາຊະໂດ	ตลาดพระโขนง กรุงเทพฯ	TNTC	13
11	ເນື້ອປລາກຣາຍ	ตลาดมีนบุรี กรุงเทพฯ	3.0×10^5	9
12	ເນື້ອປລາກຣາຍ	ตลาดหัวตะเข้ กรุงเทพฯ	3.0×10^5	3
13	ເນື້ອປລາກຣາຍ	ตลาด ก.ม. 8 กรุงเทพฯ	7.3×10^5	5
14	ເນື້ອປລາຊະໂດ	ตลาดนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง กรุงเทพฯ	4.5×10^5	9
15	ເນື້ອປລາຊະໂດ	ตลาดมีนบุรี กรุงเทพฯ	2.5×10^6	13
รวม				138

TNTC หมายถึง 1 จานเพาะเชื่อมีจำนวนโคโลนีที่มากกว่า 250 โคโลนี

4.2 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบด้วยวิธี Agar Spot Test

4.2.1 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบด้วยวิธี Agar Spot Test

การศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกจากแหนมปลาและเนื้อปลาสดทั้งหมด 138 ไอโซเลต พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 30 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 21.74 จากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 138 ไอโซเลต ซึ่งแต่ละไอโซเลตสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้แตกต่างกันโดยเชื้อที่ถูกยับยั้งมากที่สุดได้แก่เชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 451 คิดเป็นร้อยละ 80 และเชื้อที่ถูกยับยั้งรองลงมาได้แก่เชื้อ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 คิดเป็นร้อยละ 16.66 จากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 30 ไอโซเลต ส่วนเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Listeria monocytogenes* DMST 11256 พบว่าไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตใดสามารถยับยั้งได้ (ตารางที่ 4.2)

จากผลการทดลองการที่แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ส่วนใหญ่ (ร้อยละ 80) สามารถยับยั้งเชื้อ *L. bulgaricus* TISTR 451 และเชื้อ *P. acidilactici* TISTR 051 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย 2 ชนิดนี้มีความไวต่อการถูกยับยั้งด้วยสารยับยั้งที่แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกผลิตขึ้น ซึ่งอาจเป็นส่วนผสมของสารยับยั้งหลายชนิดได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซิติก เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีริโอซิน (Cowley, 1988) ส่วนเชื้อ *S. aureus* TISTR118 และ *L. monocytogenes* DMST 11256 ที่ไม่พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตใดสามารถยับยั้งได้อาจเป็นไปได้ที่เชื้อทั้งสองสามารถทนต่อสารยับยั้งชนิดต่างๆ ที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้นได้หรืออาจเป็นเพราะสารยับยั้งที่ได้มีความเข้มข้นไม่เพียงพอที่จะด้านการเจริญของเชื้อได้

ในการทดลองนี้ที่พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลาสดและแหนมปลาสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้นั้นสอดคล้องกับการทดลองของนักวิจัยท่านอื่นที่ได้ศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อและปลาหลายชนิด พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้เช่นเดียวกันดังเช่นการทดลองของ Budde และคณะ (2003) ซึ่งได้นำเชื้อ *Leuconostoc carnosum* 4010 ที่แยกจากผิวของชิ้นหมูแฮมที่บรรจุในห่อสุญญากาศ มาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยวิธี spot test พบว่าเชื้อ *L. carnosum* 4010 สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ได้หลายสายพันธุ์ และต้านเชื้อ *L. innocua* และแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิด แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *Brochotrix thermosphacta*, *B. cereus*, *Salmonella infantis*, *S. typhimurium*, *E. coli* และ *Yersinia enterocolitica* ได้ และเมื่อนำเชื้อ *L. carnosum* 4010 จำนวน 1.2×10^5 และ 6.3×10^6 เซลล์ต่อกรัม ในชิ้นไส้กรอกที่มีการเติมเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

L. monocytogenes จำนวน 10^4 โคโลนีต่อกรัม และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน พบว่าอัตราการยับยั้งเซลล์ *L. monocytogenes* ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเชื้อ *L. carnosum* 4010 ที่เติมลงในชิ้นไส้กรอก โดยเมื่อเติมเชื้อ *L. carnosum* 4010 จำนวน 1.2×10^7 เซลล์ต่อกรัม พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ในชิ้นไส้กรอกได้ แต่เมื่อเติมเชื้อ *L. carnosum* 4010 เพิ่มขึ้นเป็น 6.3×10^6 เซลล์ต่อกรัม พบว่าจำนวนเชื้อ *L. monocytogenes* ในชิ้นไส้กรอกลดลงเหลือเพียง 10 เซลล์ต่อกรัม ซึ่งการลดลงของเชื้อ *L. monocytogenes* เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ของ *L. carnosum* 4010 นี้ ผู้ทดลองได้อธิบายว่าอาจเป็นเพราะสารแบคทีริโอซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *L. carnosum* 4010 มีความเข้มข้นสูงขึ้น (Budde และคณะ. 2003) และเมื่อเร็วๆ นี้ Thapa และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาผลการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยเชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* SM: T1 ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ปลาตากแห้งและรมควัน (sukako maacha) พื้นเมืองของแถบหิมาลัยตะวันตกของประเทศเนปาลและอินเดียด้วยวิธี agar spot พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *L. innocua* และ *S. aureus* ได้ และในปี ค.ศ. 2006 Ghalfi และคณะได้ทำการศึกษาสารแบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 พบว่าสามารถต้านเชื้อ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ปลาแช่หมอนรมควันในระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ขณะที่ Ammor และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นในไบโอฟิล์ม (biofilm) โดยแบคทีเรียกรดแลกติกหลายชนิดที่สามารถสร้างสารคล้ายแบคทีริโอซินได้แก่ *Vagococcus carniphilus* 5 สายพันธุ์ *Enterococcus faecium* 3 สายพันธุ์ *L. sakei* 1 สายพันธุ์ และ *Enterococcus* sp. 1 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ *E. faecium* 2 สายพันธุ์ และเชื้อ *V. carniphilus* 3 สายพันธุ์ ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *L. innocua*, *S. aureus* และ *Hafnia alvei* EIE-25 ได้สูงสุด โดยพบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อลงเหลือ $\log 2$, $\log 2.7$ และ $\log 2.4$ โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 4.2 คุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051, *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 451 และ *Listeria monocytogenes* DMST 11256 โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากปลาสดและเหนมปลากันวน 30 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ตัวอย่างที่มาของเชื้อที่แยก	ชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ			
		<i>S. aureus</i> TISTR 118	<i>P. acidilactici</i> TISTR 051	<i>L. bulgaricus</i> TISTR 451	<i>L. monocytogenes</i> DMST 11256
2IS1	2	-	-	+	-
3IS3	3	-	-	+	-
3IS4	3	-	-	-	-
3IS6	3	-	-	+	-
3IS7	3	-	-	+	-
4IS1	4	-	-	+	-
4IS3	4	-	-	+	-
4IS5	4	-	-	+	-
4IS6	4	-	-	+	-
4IS8	4	-	+	-	-
5IS2	5	-	+	-	-
5IS4	5	-	+	-	-
5IS8	5	-	-	+	-
5IS9	5	-	-	+	-
9IS1	9	-	-	+	-
9IS2	9	-	-	+	-
9IS3	9	-	-	+	-
9IS5	9	-	-	+	-
9IS7	9	-	-	+	-
9IS8	9	-	-	+	-
13IS2	13	-	-	+	-
13IS3	13	-	-	+	-
13IS4	13	-	+	+	-
13IS5	13	-	+	+	-
14IS3	14	-	-	+	-
14IS4	14	-	-	+	-
14IS7	14	-	-	+	-
14IS8	14	-	-	+	-
14IS9	14	-	-	-	-
14IS12	14	-	+	-	-

- หมายถึง ไม่สามารถยับยั้งได้

+ หมายถึง สามารถยับยั้งได้

ตารางที่ 4.3 จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดและจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้ง

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด (โคโลนีต่อกรัม)	จำนวนไอโซเลต	จำนวนไอโซเลตที่สร้างสารยับยั้ง ^a
แฮมมปลา				
ปลาทราย	5	$4.2 \times 10^8 - 2.1 \times 10^9$	46	14
ปลาชะโด	5	$\geq 6.8 \times 10^8$	53	6
ปลาสด				
ปลาทราย	3	$3.0 \times 10^5 - 7.3 \times 10^5$	17	4
ปลาชะโด	2	$4.5 \times 10^5 - 2.5 \times 10^6$	22	6

^a ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051, *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 415 และ *Listeria monocytogenes* DMST 11256 ได้อย่างน้อย 1 ชนิด

4.3 ผลการทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก

4.3.1 การทนต่อกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการทดสอบการทนต่อกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติก 30 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตสามารถทนต่อกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชต่างกัน โดยพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้ในอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชด้วยกรดแลคติกที่มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.30 ถึง 4.00 นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 11 ไอโซเลตสามารถเจริญได้ในช่วงพีเอช 6.30 ถึง 3.70 ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 36.66 ส่วนที่ระดับพีเอช 6.30 ถึง 3.35 แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 7 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 23.33 สามารถเจริญได้ แต่ที่ระดับพีเอช 6.30 ถึง 3.20 มีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 2 ไอโซเลตสามารถเจริญได้ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 6.66 และพีเอช 6.30 ถึง 2.90 มีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 2 ไอโซเลตสามารถเจริญได้ คิดเป็นร้อยละ 6.66 จากจำนวนทั้งหมด 30 ไอโซเลต ดังนั้นระดับพีเอชต่ำสุดที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้คือ พีเอช 2.90 ไอโซเลตที่สามารถทนต่อระดับพีเอช 2.90 ได้แก่ ไอโซเลต 13IS4 และ 14IS9

4.3.2 การทนต่อการดื้อไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติก

ในการทดสอบการทนต่อการดื้อไฮโดรคลอริกของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตสามารถทนต่อการดื้อไฮโดรคลอริกได้แตกต่างกันในอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกพบว่าในช่วงพีเอช 6.30 ถึง 2.60 มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้จำนวน 12 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 40 รองลงมาคือพีเอชที่อยู่ในช่วง 6.30 ถึง 3.70 มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญได้ 8 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 26.66 ส่วนระดับพีเอชในช่วง 6.30 ถึง 3.00 มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญได้จำนวน 6 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 20 และพีเอชที่อยู่ในช่วง 6.30 ถึง 2.20 มีแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญได้จำนวน 4 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 13.33 จากจำนวนทั้งหมด 30 ไอโซเลต ดังนั้นค่าพีเอชต่ำสุดที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้คือ พีเอช 2.2 ไอโซเลตที่เจริญได้ที่พีเอชต่ำสุดคือ 5IS9, 13IS3, 13IS4 และ 13IS5

4.3.3 การทนต่อโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการทดสอบการทนต่อโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้คัดเลือกจำนวน 30 ไอโซเลต พบว่าทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0 ถึง 4.50 ในอาหารเหลว MRS ขณะที่โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 ถึง 6.00 พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญได้จำนวน 17 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 56.66 โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 ถึง 9.00 มีแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญได้จำนวน 2 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 6.66 จากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 30 ไอโซเลต และมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกเพียง 1 ไอโซเลต ที่สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่ำสุดคือ ร้อยละ 4.5 และไอโซเลตที่สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงสุด (ร้อยละ 9.00) ได้แก่ ไอโซเลต 5IS4 และ 14IS8

4.3.4 การทนต่อเกลือแร่ของแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดสอบการทนต่อเกลือแร่ของแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ที่ทดสอบ (27 ไอโซเลต หรือร้อยละ 90) สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือแร่ที่มีความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบคือร้อยละ 5.25 ยกเว้นไอโซเลต 3IS3, 3IS6 และ 14IS7 เจริญได้ที่ความเข้มข้นเกลือแร่ระดับต่ำกว่าคือร้อยละ 1.50, 2.25 และ 3.00 ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกส่วนใหญ่สามารถทนต่อการดื้อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ เกลือแร่ ที่มีความเข้มข้นสูงได้ อาจเป็นเพราะโดยธรรมชาติของแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทนต่อสภาวะที่เป็นอันตรายดังกล่าวได้ดีตามที่ Yousef และ Courtney (2003) ได้กล่าวว่าแบคทีเรียกรดแลคติกโดยตั้งแต่กำเนิดจะมีความสามารถ

ในการทนต่อกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ซึ่งความสามารถในการทนต่อกรดจะเพิ่มขึ้นหลังจากเกิดการปรับตัวต่อกรด และแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถอยู่รอดในทางเดินอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยสามารถทนต่อกรด และกลื่อน้ำดีในทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ (Conway และคณะ. 1987 ; Tuomola และคณะ. 2001) ส่วนการที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้ในสภาพที่มีกรดไฮโดรคลอริกที่ค่าพีเอชต่ำกว่ากรดแลคติกอาจเป็นไปได้ที่กรดแลคติกเป็นกรดอ่อน ซึ่งเป็นกรดที่อยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวจึงมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่ากรดไฮโดรคลอริกซึ่งเป็นกรดแก่แตกตัวได้หมดที่ภายนอกเซลล์จึงไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ เนื่องจากธรรมชาติของเซลล์ที่จะไม่ยอมให้ไอออนบวกและไอออนลบผ่านสู่เซลล์ได้โดยง่าย (Kashket. 1987)

ดังนั้นกรดไฮโดรคลอริกจึงมีผลยับยั้งน้อยกว่า โดยการที่กรดอยู่ในรูปไม่แตกตัวสามารถยับยั้งการเจริญได้ดีนั้นเนื่องมาจากกรดที่ไม่แตกตัวนี้สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้อย่างง่ายดายและจะแตกตัวภายในเซลล์ เนื่องจากภายในเซลล์มีค่าพีเอชสูงกว่าภายนอกเซลล์ ด้วยเหตุนี้แบคทีเรียจึงต้องรักษาค่าพีเอชภายในเซลล์ให้ใกล้เคียงกับค่าเป็นกลาง (พีเอช 7) เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน เอนไซม์ กรดนิวคลีอิก และฟอสโฟลิปิด โดยโปรตอนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จากการแตกตัวของกรดอินทรีย์จะมีผลทำให้ไฮโดรพลาสซึมมีสภาพเป็นกรด ดังนั้นเซลล์จึงจำเป็นต้องขับโปรตอนออกสู่ภายนอก ซึ่งการขับโปรตอนออกจากเซลล์นี้จำเป็นต้องใช้พลังงานในรูป ATP ดังนั้นการขับโปรตอนอย่างต่อเนื่องนี้อาจทำให้พลังงานของเซลล์หมดลง ในที่สุด ส่งผลให้การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ช้าลง (Dakin และ Day. 1958) ซึ่งได้มีรายงานว่าเมื่อปรับค่าพีเอชภายนอกเซลล์ของเชื้อ *L. lactis* และ *Streptococcus bovis* ด้วยกรดแลคติกจะมีผลทำให้ค่าพีเอชภายในเซลล์ต่ำกว่าปรับด้วยกรดไฮโดรคลอริก (Poolman และคณะ. 1987 ; Cook และ Russel. 1994)

จากการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก ที่ความเป็นกรดสูง (พีเอชต่ำ) และทนต่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และกลื่อน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งเป็นคุณสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติก โดยจากการทดลองนี้สรุปว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS4 และ 14IS9 สามารถทนต่อกรดแลคติกได้ที่พีเอชต่ำที่สุด (2.90) เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่น ไอโซเลต 5IS9, 13IS3, 13IS4 และ 13IS5 สามารถทนต่อกรดไฮโดรคลอริกได้ที่พีเอชต่ำที่สุด (2.20) เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่น ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4 ซึ่งคาดว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลตนี้จะสามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารและสามารถอยู่รอดได้ Ekkila และ Petaja (2000) ได้กล่าวว่าแม้กรดที่ถูกขับออกมาจากกระเพาะอาหารจะมีค่าพีเอชเท่ากับ 0.9 แต่ค่าพีเอชจะเพิ่มมากขึ้นเป็น 3.0 เมื่อมีอาหารผสมรวมอยู่ในกระเพาะอาหาร นอกจากนี้พบว่าส่วนประกอบบางอย่างของน้ำย่อย

ภายในกระเพาะอาหารอาจช่วยปกป้องเซลล์ของแบคทีเรียทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถอาศัยอยู่ในกระเพาะอาหารได้แม้ว่าจะมีค่าความเป็นกรดต่ำมากก็ตาม (Conway และคณะ. 1987)

นอกจากนี้การที่ไอโซเลต 13IS3 สามารถทนต่อกรดแลคติกที่พีเอช 3.20 และโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.00 ในขณะที่ไอโซเลต 13IS4 สามารถทนต่อกรดแลคติกที่พีเอช 2.90 และโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 6.00 ซึ่งความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือที่ความเข้มข้นดังกล่าวเพียงพอที่จะทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลตสามารถอยู่รอดได้ในระหว่างการทำผลิตภัณฑ์ปลาหมักถ้าหากใช้แบคทีเรียทั้งสองเป็นกล้าเชื้อ เนื่องจากในหมยมปลามีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.53 ถึง 5.80 และความเข้มข้นเกลืออยู่ในช่วงร้อยละ 1.61 ถึง 1.97 (มัทนา แสงจินดา วงษ์. 2545) และปลาสดที่มีค่าพีเอช 4.50 ถึง 5.00 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.00 (Paludan-Müller. 2002) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบค่าความขุ่นของเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่เติมกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ หรือ เกลื่อน้ำดีของเชื้อไอโซเลตต่างๆ พบว่าไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4 สามารถเจริญได้ดีกว่าเชื้อไอโซเลตอื่นๆ จึงคาดได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4 อาจนำไปผลิตเป็นกล้าเชื้อโพรไบโอติกสำหรับการทำผลิตภัณฑ์ปลาหมัก



ตารางที่ 4.4 การทนต่อการกดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์และเกลือน้ำดีในอาหาร
เหลว MRS ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากเหนมปลาและเนื้อปลาสด

ไอโซเลต	สภาวะที่ใช้ทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติก			
	กรดแลคติก (พีเอช)	กรดไฮโดรคลอริก (พีเอช)	โซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ)	เกลือน้ำดี (ร้อยละ)
2IS1	4.00	3.70	6.00	5.25 ^๒
3IS3	3.70	3.70	6.00	1.50
3IS4	4.00	3.70	6.00	5.25 ^๒
3IS6	3.70	3.00	6.00	2.25
3IS7	4.00	3.70	7.50	5.25 ^๒
4IS1	4.00	3.70	7.50	5.25 ^๒
4IS3	3.70	3.00	6.00	5.25 ^๒
4IS5	3.70	3.00	7.50	5.25 ^๒
4IS6	4.00	2.60	7.50	5.25 ^๒
4IS8	3.70	3.00	6.00	5.25 ^๒
5IS2	4.00	2.60	6.00	5.25 ^๒
5IS4	4.00	3.00	9.00 ^๒	5.25 ^๒
5IS8	3.70	2.60	6.00	5.25 ^๒
5IS9	3.70	2.20 ^๒	6.00	5.25 ^๒
9IS1	3.70	3.00	6.00	5.25 ^๒
9IS2	4.00	3.70	4.50	5.25 ^๒
9IS3	3.70	3.70	7.50	5.25 ^๒
9IS5	3.20	3.70	7.50	5.25 ^๒
9IS7	3.70	2.60	7.50	5.25 ^๒
9IS8	3.35	2.60	6.00	5.25 ^๒
13IS2	3.35	2.60	6.00	5.25 ^๒
13IS3	3.20	2.20 ^๒	6.00	5.25 ^๒
13IS4	2.90 ^๒	2.20 ^๒	6.00	5.25 ^๒
13IS5	3.35	2.20 ^๒	6.00	5.25 ^๒
14IS3	3.35	2.60	7.50	5.25 ^๒
14IS4	3.35	2.60	6.00	5.25 ^๒
14IS7	3.35	2.60	7.50	3.00
14IS8	3.35	2.60	9.00 ^๒	5.25 ^๒
14IS9	2.90 ^๒	2.60	6.00	5.25 ^๒
14IS12	3.70	2.60	7.50	5.25 ^๒

^๒ ค่าพีเอชต่ำสุดของกรดแลคติกหรือกรดไฮโดรคลอริกในอาหารเหลว MRS ที่แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้

^๒ ความเข้มข้นสูงสุดของโซเดียมคลอไรด์หรือเกลือน้ำดีในอาหารเหลว MRS ที่แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้

4.4 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติก

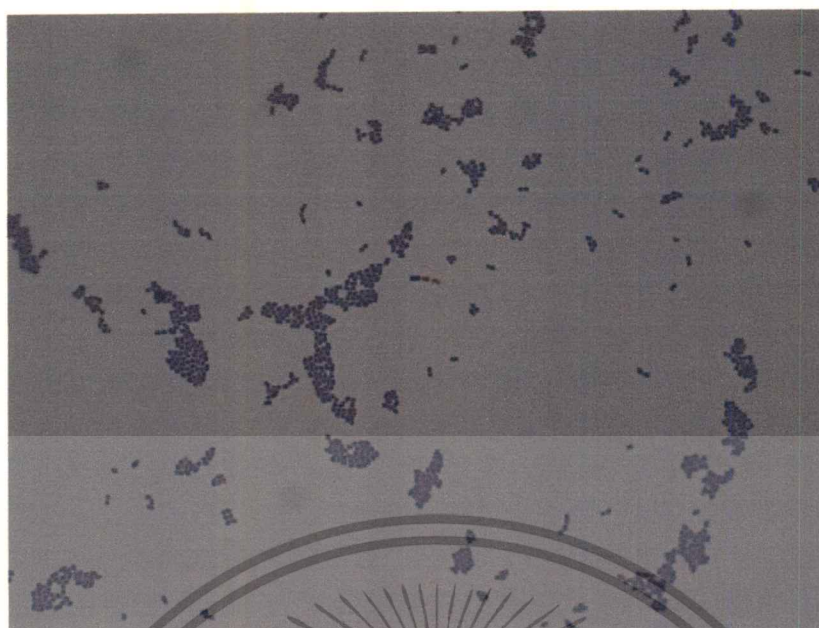
4.4.1 ผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4 ที่แยกได้จากเนื้อปลาทรายสด โดยการย้อมแกรมพบว่าไอโซเลต 13IS3 มีรูปร่างกลม ขณะที่ไอโซเลต 13IS4 มีรูปร่างท่อน ทั้งสองไอโซเลตติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต จึงเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (รูปที่ 4.1) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Ringø และ Gatesoupe (1998) ซึ่งได้ทำการศึกษาชนิดของจุลินทรีย์จากปลาในแหล่งต่างๆ พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่มที่มีลักษณะรูปร่างท่อน และรูปร่างกลม แกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีสปอร์ ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกเป็นแบคทีเรียชนิดสำคัญที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร โพรทอนของท้อง ไต ตับ หัวใจ และม้ามของปลา โดยแบคทีเรียกรดแลกติกบางชนิดที่คัดเลือกจากระบบทางเดินอาหารของปลา มีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์เพื่อสุขภาพ (Probiotic) ซึ่ง ได้แก่เชื้อ *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* และ *Leuconostoc*

4.4.2 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4 โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH

ผลจากการจำแนกชนิดแบคทีเรียกรดแลกติกถึงระดับสปีชีส์โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH และประมวลผลด้วยโปรแกรม API Identification Software (Bio Merieux) พบว่าคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต 13IS3 มีความคล้ายคลึงกับคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Lactococcus lactis* ร้อยละ 99.00 ในขณะที่ไอโซเลต 13IS4 มีคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายคลึงกับเชื้อ *Lactobacillus curvatus* ร้อยละ 43.50

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกโดยใช้ API 50 CH เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยการศึกษาการหมักน้ำตาล 50 ชนิด ร่วมกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ API 50 CH medium (ตารางที่ 4.5) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสีในหลอดชุดทดสอบเกิดจากการผลิตกรดในการหมักสารประกอบต่างๆ ในสภาวะไร้อากาศของแบคทีเรีย แต่การทดสอบด้วยวิธีนี้อาจมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นได้ เพราะการอ่านผลจากสีที่เกิดขึ้นในบางครั้งสีที่เกิดขึ้นไม่ชัดเจนเช่นเกิดสีม่วงอ่อนหรือเขียวอ่อนเป็นต้น (รูปที่ 4.2) ด้วยเหตุนี้จึงต้องทำการจำแนกชนิดโดยอาศัยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ซึ่งเป็นวิธีการจำแนกชนิดแบคทีเรียที่ได้รับการยอมรับว่ามีความถูกต้องในการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์เพื่อให้ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกมีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น (Berthier และ Ehrlich, 1999)



(ก)



(ข)

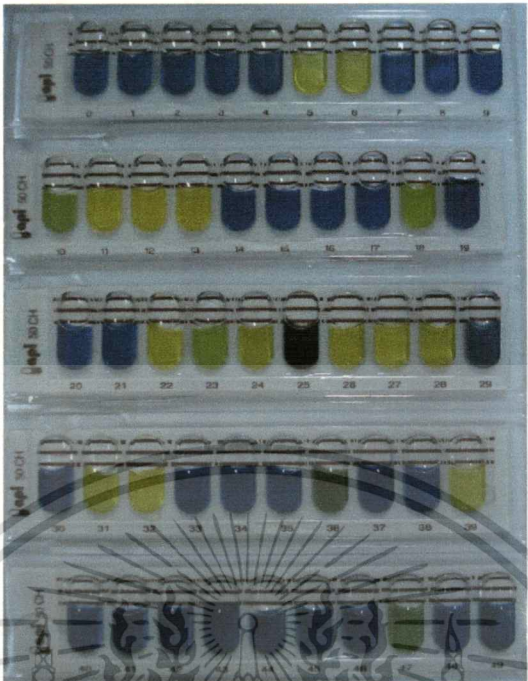
รูปที่ 4.1 รูปร่างและการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต
13IS3 (รูป ก) และไอโซเลต 13IS4 (รูป ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

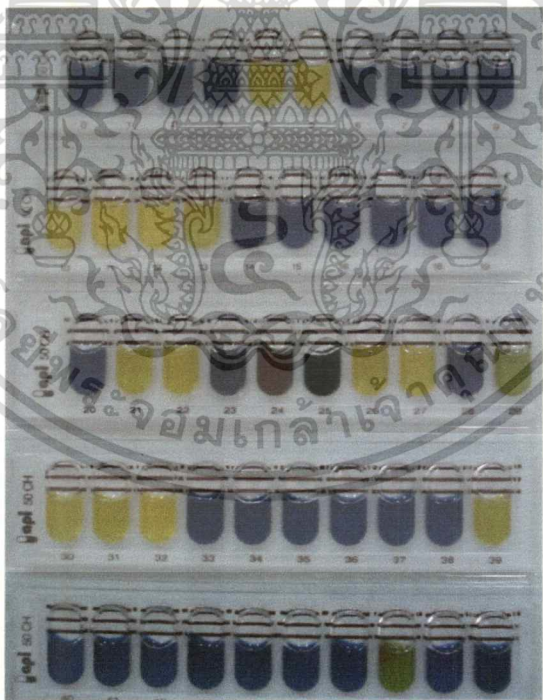
ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4 ด้วยชุดทดสอบ API 50 CH

ชนิดของสารที่ใช้ทดสอบ	ผลการทดสอบ		ชนิดของสารที่ใช้ทดสอบ	ผลการทดสอบ	
	13IS3	13IS4		13IS3	13IS4
Control	-	-	Esuculin ferric citrate	+	+
Glycerol	-	-	Salicin	+	+
Erythritol	-	-	D-Celibiose	+	-
D-Arabinose	-	-	D-Maltose	+	-
L-Arabinose	-	-	D-Lactose	-	-
D-Ribose	+	+	D-Melibiose	-	+
D-Xylose	+	-	D-Saccharose	+	+
L-Xylose	-	-	D-Trehalose	+	+
D-Adonitol	-	-	Inulin	-	-
Methyl-β-D-Xylopyranoside	-	-	D-Melezitose	-	-
D-Galactose	-	+	D-Raffinose	-	-
D-Glucose	+	+	Amidon	-	-
D-Fructose	+	+	Glycogen	-	-
D-Mannose	+	-	Xylitol	-	-
L-Sorbose	-	-	Genitiobiose	+	+
L-Rhamnose	-	-	D-Turanose	-	-
Dulcitol	-	-	D-Lyxose	-	-
Inositol	-	-	D-Tagatose	-	-
D-Mannitol	-	-	D-Fucose	-	-
D-Sorbitol	-	-	L-Fucose	-	-
Methyl-α-D-Mannopyranoside	-	-	D-Arabinose	-	-
Methyl-α-D-Glucopyranoside	-	-	L-Arabinose	-	-
N-Acetylglucosamine	+	+	Potassium Gluconate	-	-
Amyldalin	-	-	Potassium 2-Ketogluconate	-	-
Arbutin	-	-	Potassium 5-Ketogluconate	-	-

+ หมายถึงให้ผลบวกในการทดสอบ (อาหารในหลอดเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองยกเว้น Esuculin ferric citrate เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีดำ)
- หมายถึงให้ผลลบในการทดสอบ (อาหารในหลอดไม่เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองยกเว้น Esuculin ferric citrate ไม่เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีดำ)



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต 13IS3 (รูป ก) และ ไอโซเลต 13IS4 (รูป ข) ด้วยชุดทดสอบ API 50 CH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

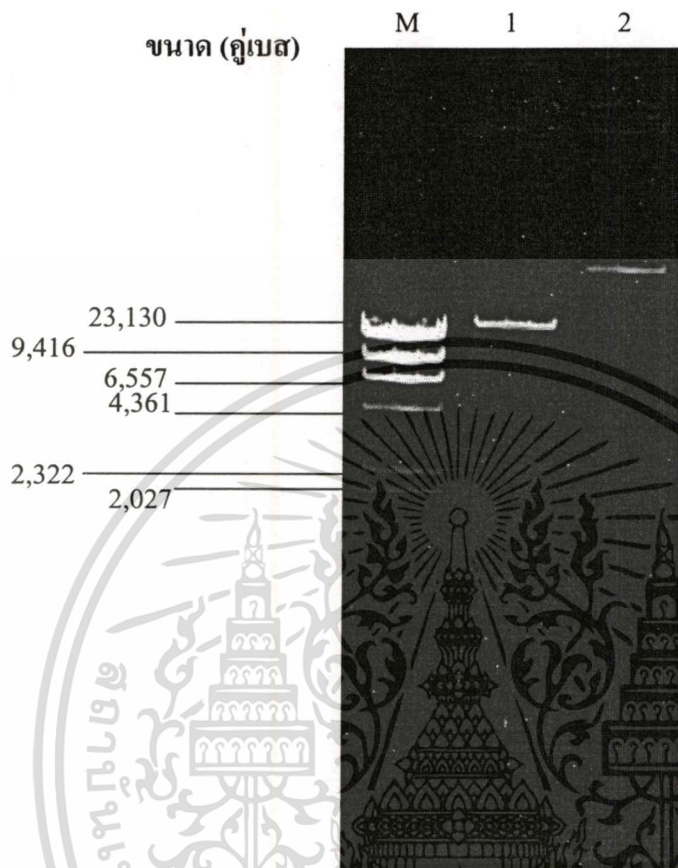
4.4.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน 16S rDNA

4.4.3.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4 ในอาหาร LB และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.8 ด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่าแถบจีโนมิกของดีเอ็นเอทั้งสองไอโซเลตที่สกัดได้มีเพียงแถบเดียว (รูปที่ 4.3) โดยพบว่าไอโซเลต 13IS3 เกิดแถบของจีโนมิกดีเอ็นเออยู่ที่ระดับเดียวกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ขนาด 23.1 กิโลเบส ในขณะที่แถบจีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลต 13IS4 อยู่เหนือแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ขนาด 23.1 กิโลเบส ซึ่งพบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4 มีปริมาณ 135 และ 195 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับ และจะเห็นได้ว่าจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ จากนั้นนำจีโนมิกดีเอ็นเอไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สต่อไป

4.4.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4 โดยการเติมส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สรวมทั้งไพรเมอร์ FDNA และ RDNA จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) และวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.8 และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder พบว่าเมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ไอโซเลตละ 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส (รูปที่ 4.4) จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของทั้งสองไอโซเลต พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 600 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.5 และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม Blast server

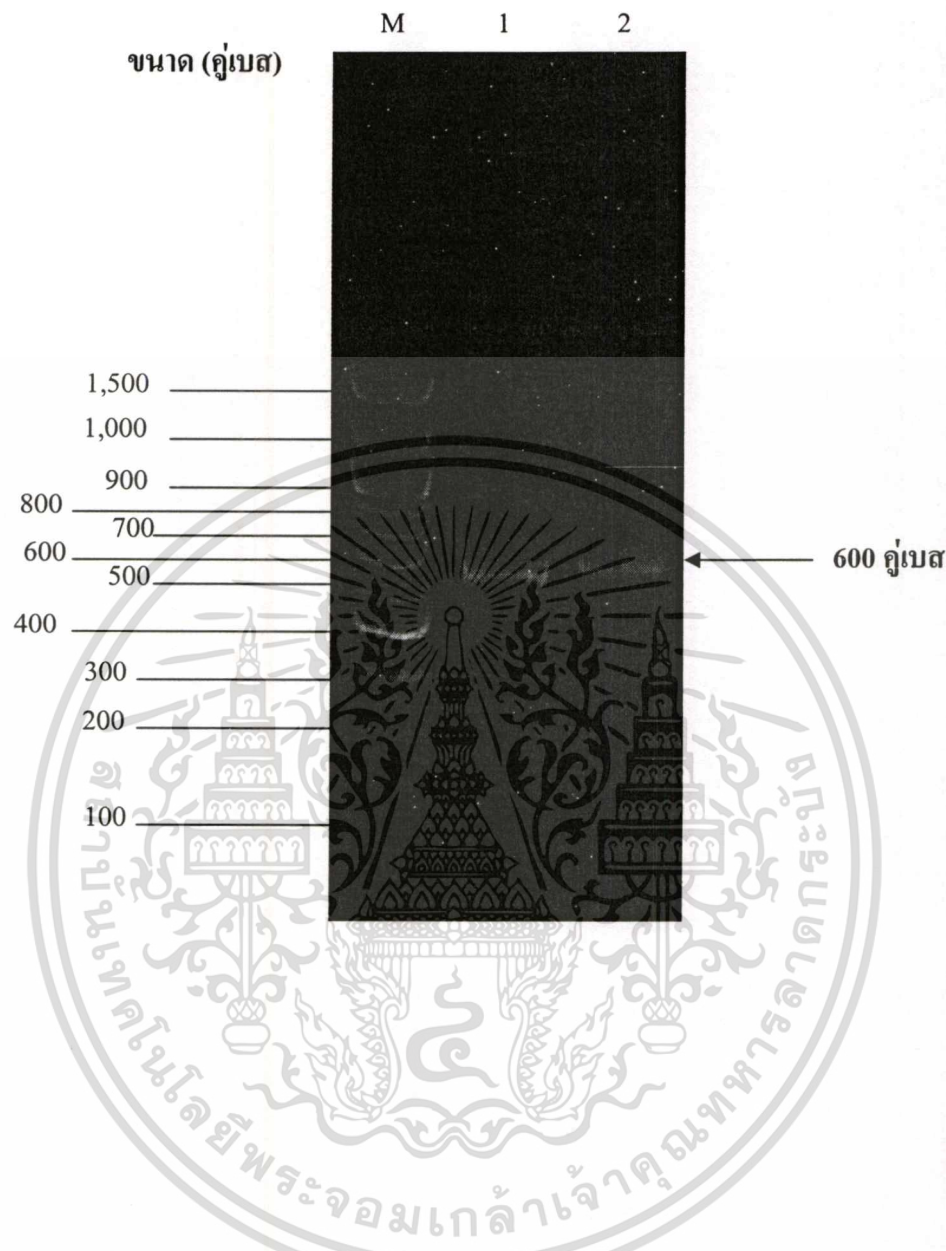


รูปที่ 4.3 จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4 จากการแยกด้วยเทคนิค อิเล็กโตรโฟเรซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 0.8

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

เลน 1 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลต 13IS3

เลน 3 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลต 13IS4

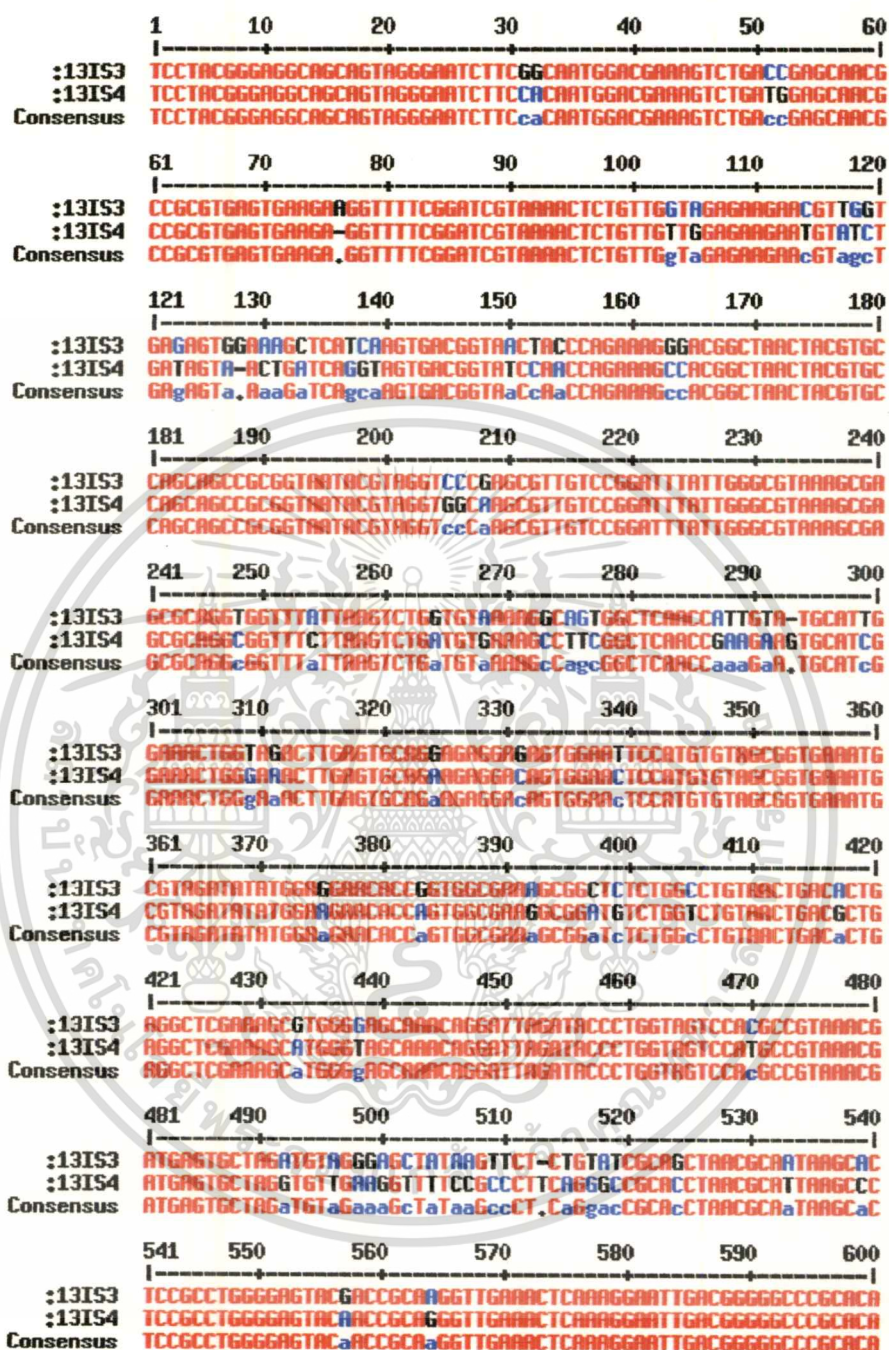


รูปที่ 4.4 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

เลน 1 คือ ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต 13IS3

เลน 2 คือ ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต 13IS4



รูปที่ 4.5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของชิ้น 16S rDNA ขนาด 600 คู่เบสของไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Lactococcus lactis* ร้อยละ 100 ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกในสกุล *Lactococcus lactis* (ตารางที่ 4.6)

สำหรับไอโซเลต 13IS4 จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของ ยีน 16S rDNA กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS4 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Lactobacillus sakei* ร้อยละ 100 และเชื้อ *Lactobacillus curvatus* ร้อยละ 99 และ 98 จึงทำให้ทราบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS4 เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกในสกุล *Lactobacillus sakei* และมีสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับเชื้อ *Lactobacillus curvatus* (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.6 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน

สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	ความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต 13IS3 (ร้อยละ)
<i>Lactococcus lactis</i> (LA35)	100
<i>Lactococcus lactis</i> (CICC6023)	100
<i>Lactococcus lactis</i> (CICC6030)	100
<i>Lactococcus lactis</i> (CICC6017)	100
<i>Lactococcus lactis</i> (CICC6036)	100
<i>Lactococcus lactis</i> (CICC6018)	100
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (CICC6024)	100
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (CICC6021)	100
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (CICC6016)	100
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (CICC6022)	100

ตารางที่ 4.7 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS4 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน

สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	ความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต 13IS4 (ร้อยละ)
<i>Lactobacillus sakei</i>	100
<i>Lactobacillus sakei</i> (TISL2c)	99
<i>Lactobacillus sakei</i> (HNMR52c)	99
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> (DSM 20017)	99
<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>melibiosus</i>	99
<i>Lactobacillus sakei</i> (HJ9)	99
<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	99
<i>Lactobacillus curvatus</i> (YMRS3a)	98
<i>Lactobacillus sakei</i>	98
<i>Lactobacillus curvatus</i> (PSTJA3a)	98

4.4.4 สรุปผลการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4

เมื่อพิจารณาผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 พบว่าผลการทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 50 CH กับผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ให้ผลใกล้เคียงกันคือคล้ายคลึงกับเชื้อ *L. lactis* ร้อยละ 99 และร้อยละ 100 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8) สำหรับการพิจารณาชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS4 ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ให้ผลการทดสอบที่สรุปว่าคล้ายคลึงกับเชื้อ *L. sakei* ถึงร้อยละ 100 ซึ่งต่างกับผลการทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 50 CH ซึ่งให้ผลการทดสอบว่าเป็นเชื้อ *L. curvatus* เพียงร้อยละ 43.5 ดังนั้นสรุปว่าไอโซเลต 13IS4 เป็นเชื้อ *L. sakei* เนื่องจากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์น่าจะมีความถูกต้องมากกว่าผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี Kandler และ Weiss (1986) ได้กล่าวว่า *L. sakei* และ *L. curvatus* เป็นแบคทีเรียที่มีความเกี่ยวข้องกันอย่างใกล้ชิดจึงจะเห็นในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *L. curvatus* และ *L. sakei* กับสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีนพบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก (ตารางที่ 4.7) แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้เคยแยกได้จากผลิตภัณฑ์ผักและเนื้อหมักและยังเป็นแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบในระหว่างการหมักกิมจิ ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีไม่ยากนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นว่าเป็นประโยชน์ในการนำ
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากเชื้อทั้งสองมีความแตกต่างกันเพียงการไฮโดรไลซ์อาร์จินีน (arginine) และผลการหมักมีไลโบโอส (melibiose) เท่านั้น และอาจมีเชื้อ *L. sakei* สายพันธุ์ที่ไม่ปกติ ซึ่งสามารถไฮโดรไลซ์อาร์จินีนได้ทำให้ผลการทดสอบเบี่ยงเบนไปจากมาตรฐานของผลการทดสอบคุณสมบัติชีวเคมีของ *L. sakei* ปกติที่ใช้ melibiose ได้ (Berth และ Ehrlich, 1999) ดังนั้นการจำแนกชนิดของเชื้อทั้งสองด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA จึงน่าจะให้ผลที่เชื่อถือได้มากกว่า

ตารางที่ 4.8 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4 โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบชีวเคมี (API 50 CH) และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

การจำแนกชนิดแบคทีเรีย	ไอโซเลต	
	13IS3	13IS4
การย้อมแกรม	แกรมบวก	แกรมบวก
รูปร่าง	กลม	ท่อน
การทดสอบชีวเคมี (API 50 CH)	<i>Lactococcus lactis</i> (99%)	<i>Lactobacillus curvatus</i> (43.5%)
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA	<i>Lactococcus lactis</i> (100%)	<i>Lactobacillus sakei</i> (100%)

จากการที่พบ *L. lactis* (13IS3) และ *L. sakei* (13IS4) ที่แยกได้จากเนื้อปลาทูน่า มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบอาจเป็นเพราะแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองชนิดนี้สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ดังเช่นจากการศึกษาของ Campos และคณะ (2006) ที่ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (*Psetta maxima*) ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* โดยจากการทดลองพบว่าเชื้อ *L. lactis* สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* ได้สูงสุดในระยะคงตัว (stationary phase) นอกจากนี้พบว่าสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตออกมามีความเสถียรเมื่อผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นอกจากนี้ ในปี ค.ศ. 2000 Pongsak และ Parichat ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักท้องถิ่นที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินภายใต้สภาวะที่ไม่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดอินทรีย์พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกชนิด *L. lactis* subsp. *lactis* สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Listeria mesenteroides* TISTR 473 นอกจากนี้สารแบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้างขึ้นได้พบว่าจะมีค่ากิจกรรมสูงสุดในระยะคงตัวและกิจกรรมของสารแบคเทอริโอซินไม่ลดลงเมื่อผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารทบทวนเนื้อหาสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ยืมได้เห็นว่าไม่เหมาะสมในการนำไปใช้ กรุณาแจ้งผู้ยืมทราบทันที และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 30 นาที ในปี ค.ศ. 2003 Noonpakdee และคณะ ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก ที่สร้างสารแบคทีริโอซินจากหมนมพบว่าเชื้อ *Lactococcus lactis* WNC 20 สามารถสร้าง แบคทีริโอซินเพื่อยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *B. cereus* และ *S. aureus* โดยจากการศึกษาทางชีวเคมีพบว่าสารแบคทีริโอซินมีความเสถียรเมื่อผ่านการนึ่งฆ่า เชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในช่วงพีเอช 2 ถึง 10 นอกจากนี้ Vinderola และ Reinheimer (2003) ทำการศึกษาแบคทีเรีย กรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 20 ชนิด พบว่าเชื้อ *L. lactis* สามารถทนต่อกรดและทนต่อเกลือ น้ำดี ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในอาหารเหลว MRS และน้ำย่อยที่มีค่าความเป็นกรดที่พีเอช 2 ได้

Vermeiren และคณะ (2004) ได้รายงานว่เมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจาก ผลิตภัณฑ์เนื้อ 27 ชนิด พบว่าเชื้อ *L. sakei* ที่ได้คัดเลือกสามารถผลิตสารแบคทีริโอซินที่มีฤทธิ์ ต้านเชื้อ *L. monocytogenes*, *L. mesenteroides*, *L. carnosum* และ *Brochotrix thermosphacta* โดยพบว่าเกิดกรคอย่างรวดเร็วในระยะ lag-phase นอกจากนี้เชื้อ *L. sakei* บางไอโซเลตที่คัดเลือก ได้พบว่าให้กลิ่นและรสชาติเป็นที่ยอมรับ ด้วยเหตุนี้เชื้อ *L. sakei* อาจเป็นเชื้อที่เหมาะสมต่อการ นำไปใช้เป็นกลิ่นเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ในปี ค.ศ. 2003 Papamanoli และคณะ ได้ทำการ คัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 147 ไอโซเลตในไส้กรอกแห้ง หมักของประเทศกรีก พบว่าเชื้อ *L. sakei* เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ในไส้กรอกและเชื้อ *L. sakei* ส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 สภาวะ ที่มีเกลือ น้ำดี (พีเอช 5) เข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MRS และ ในอาหารแข็งที่มีอะซิเตต (acetate) นอกจากนี้ *L. sakei* ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* ได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 2005 Ammor และคณะ ได้ทำการคัดเลือกเชื้อ *L. sakei* ที่มีคุณสมบัติในการเป็นกลิ่นเชื้อจากทั้งหมด 30 ไอโซเลต จากไส้กรอกแห้งพื้นเมืองพบว่า เชื้อ *L. sakei* ทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ที่พีเอชในช่วง 4.2 ถึง 9.6 บนอาหารแข็งอะซิเตตที่เติม โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 4 นอกจากนี้ทุกไอโซเลตเกิดกระบวนการหมักแบบ homofermentative และเชื้อ *L. sakei* ร้อยละ 97 เกิดกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลส (catalase) ในขณะที่มีเพียงร้อยละ 3 ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *L. innocua* ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้แยกเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* ซึ่งมี คุณสมบัติเป็นเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกที่เหมาะสมต่อการนำไปผลิตเป็นกลิ่นเชื้อโปรไบโอติก สำหรับผลิตภัณฑ์ปลาหมักและในการผลิตกลิ่นเชื้อในรูปแช่แข็งแห้งพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก สูญเสียการอยู่รอดในระหว่างการแช่แข็งและการทำแห้ง ดังนั้นเพื่อให้เชื้อมีการอยู่รอดสูงจึงได้ ศึกษาผลของสารป้องกันเซลล์และสูตรผสมของสารป้องกันเซลล์ชนิดต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการอยู่ รอดของเชื้อทั้งสองหลังการแช่แข็งแห้งในขั้นต่อไป

4.5 ผลของสารป้องกันเซลล์และสูตรสารป้องกันผลต่อการอยู่รอดของเชื้อ *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus sakei* หลังการแช่แข็งแห้ง

4.5.1 ผลของสารป้องกันเซลล์ต่อการอยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* หลังการแช่แข็งแห้ง

จากการศึกษาผลของสารป้องกันเซลล์ 8 ชนิด (ตารางที่ 4.10) พบว่าเชื้อ *L. lactis* มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูงสุดในแลคโตส (ร้อยละ 64.17) ซึ่งใกล้เคียงกับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตในหางนม (ร้อยละ 61.56) และซูโครส (ร้อยละ 60.96) ขณะที่ในนมถั่วเหลือง ซอร์บิทอล และทรีฮาโลส *L. lactis* มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตน้อยกว่า (ร้อยละ 60.39, 59.72 และ 55.71 ตามลำดับ) ในแลคโตส หางนม และซูโครส แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับการอยู่รอดในกลูโคส (ร้อยละ 46.25) และไข่แดง (ร้อยละ 44.57) นั้นพบว่า *L. lactis* มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตน้อยกว่าในสารอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ในกรณีของเชื้อ *L. sakei* พบว่าหางนมและนมถั่วเหลืองมีผลช่วยส่งเสริมการอยู่รอดได้ดีที่สุด โดยมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตในหางนม (65.06) ใกล้เคียงกับนมถั่วเหลือง (ร้อยละ 62.80) แต่สูงกว่าใน ทรีฮาโลส (ร้อยละ 59.43) ซูโครส (ร้อยละ 58.54) แลคโตส (ร้อยละ 56.42) ซอร์บิทอล (ร้อยละ 55.87) ไข่แดง (ร้อยละ 49.23) และกลูโคส (ร้อยละ 46.35) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากผลการทดลองการที่พบว่าแลคโตส และซูโครส มีผลทำให้ปริมาณเชื้อ *L. lactis* ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งแห้งสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารชนิดอื่น การที่ให้ผลเช่นนี้อาจเป็นเพราะว่าการมีไคแซคคาไรด์ประเภทแลคโตสหรือซูโครสในสภาพของการแช่แข็งที่มีอุณหภูมิต่ำมากๆ จะทำให้มีปริมาณน้ำที่ไม่แข็งตัวในสัดส่วนที่สูง เนื่องจากข้อเท็จจริงที่ว่าในระยะแรกของการแช่แข็งน้ำในสารละลายของ cryoprotectant จะกลายเป็นผลึกน้ำแข็งและเมื่ออุณหภูมิยิ่งลดต่ำลงมากขึ้นความเข้มข้นของสารก็จะยิ่งเพิ่มขึ้น ขณะเดียวกันปริมาณของน้ำอิสระจะค่อยๆ ลดลง เช่นเดียวกับการทำแห้งและเมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงจนถึงจุดๆ หนึ่งน้ำจะไม่กลายเป็นน้ำแข็ง และจากการที่สารมีความเข้มข้นสูงนี้จึงทำให้เกิดความหนืดมากขึ้นทำให้น้ำไม่สามารถเคลื่อนที่ได้และอยู่ในรูปของ อะมอร์ฟัส (amorphous) (Oetjen และ Haseley. 2004) ในสภาพของการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำมากๆ จะมีน้ำส่วนหนึ่งที่ไม่สามารถแข็งตัวเป็นผลึกน้ำแข็งได้ ในสภาพโดยปริมาณน้ำที่ไม่กลายเป็นน้ำแข็งนี้จะมีสัดส่วนต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสาร cryoprotectant ที่เติมลงไป

Riedel (1972) ได้กล่าวว่าในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำ แลคโตสมีปริมาณน้ำที่ไม่แข็งตัวสูงถึงร้อยละ 40.80 ของปริมาณน้ำทั้งหมด ซึ่งสูงกว่าน้ำที่ไม่แข็งตัวในซูโครส (ร้อยละ 35.90) ซอร์บิทอล (ร้อยละ 18.70) และทรีฮาโลส (ร้อยละ 16.70) ตามลำดับ ดังนั้นในสภาพของการแช่แข็งถ้าสารใดมีปริมาณน้ำที่ไม่กลายเป็นผลึกน้ำแข็งในสัดส่วนที่สูง การที่สารจะเกิดผลึกน้ำแข็งก็อาจน้อยลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จึงอาจช่วยลดการบาดเจ็บของจุลินทรีย์ในการเผชิญสภาพเครียดขั้นแรกของการแช่แข็งแห้ง ซึ่งผลการเผชิญต่อสภาพการแช่แข็งและการทำแห้งจะทำให้จุลินทรีย์มีชีวิตลดจำนวนลง การเผชิญสภาพเครียดนี้ยังชักนำการบาดเจ็บแต่ไม่ตาย (sublethal injury) ของจุลินทรีย์อีกด้วย (Ray, 1996) ดังนั้นในสภาพที่มีแลคโตสจึงทำให้เซลล์รอดชีวิตได้สูงสุดและอาจเป็นไปได้ที่ไคแซคคาไรด์ดังกล่าวจะเกิดพันธะกับโปรตีนในสภาพที่มีน้ำน้อยลงเนื่องจาก Carpenter และ Crowe (1989) กล่าวว่าความสามารถของไคแซคคาไรด์ในการทำให้โปรตีนคงตัวในระหว่างการทำแห้งเกิดจากการที่ไคแซคคาไรด์เกิดพันธะไฮโดรเจนกับโปรตีนเมื่อเซลล์สูญเสียน้ำ ดังนั้นจึงช่วยป้องกันโปรตีนจากการเสียสภาพ และผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ Chavarri และคณะ (1988) ซึ่งได้พบว่า แลคโตสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1-10 ช่วยป้องกันเซลล์ของเชื้อ *L. lactis* เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 และ -70 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่ากลีเซอรอล ขณะที่ทรีฮาโลสและซอร์บิทอลได้มีรายงานการวิจัยของ Kono และคณะ (1998) ซึ่งพบว่าซอร์บิทอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 ช่วยทำให้เชื้อ *Lipomyces starkeyi* และ *Saccharomyces exiguous* มีอัตราการอยู่รอดสูงขึ้นเมื่อเก็บรักษาเชื้อเป็นเวลานาน นอกจากนี้ Castro และคณะ (1996) ได้ศึกษาการอยู่รอดของเชื้อ *L. bulgaricus* หลังการแช่แข็งแห้งในสารป้องกันเซลล์ได้แก่ หางนม มอลโตเดกตริน (maltodextrin) กลีเซอรอล ทรีฮาโลส และน้ำ พบว่า ทรีฮาโลส ช่วยให้เชื้อมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตสูงสุด (ร้อยละ 25)

หางนมและน้ำนมถั่วเหลืองมีผลทำให้ *L. lactis* และ *L. sakei* รอดชีวิตได้ดีหลังการแช่แข็งแห้งอาจเป็นเพราะในหางนมและน้ำนมถั่วเหลืองประกอบด้วยอาหารที่มีคุณค่าสูงหลายชนิด ซึ่งอาจช่วยป้องกันเซลล์จากการบาดเจ็บและตายได้ดี เนื่องจากหางนมประกอบด้วยโปรตีน (ร้อยละ 35) และคาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ 51.6) ปริมาณสูง (Caric', 1994) Champagne และคณะ (1991) ได้กล่าวว่าโปรตีนในนมช่วยป้องกันเซลล์ได้โดยการเคลือบเซลล์ไว้ นอกจากนี้การที่แลคโตสเป็นคาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่ที่เป็นส่วนประกอบในหางนม (Muir, 1992) จึงอาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่เซลล์อยู่รอดได้ดีในหางนม ส่วนน้ำนมถั่วเหลืองพบว่ามีโปรตีนในปริมาณสูงเช่นเดียวกัน Sian และ Ishak (1990) ได้รายงานว่าถั่วเหลืองประกอบด้วย crude protein ประมาณร้อยละ 40 ถึง 45 และยังประกอบด้วย แคลเซียม ฟอสฟอรัส ไรโบฟลาวิน (riboflavin) ธาตุเหล็ก ไทอามิน (thiamin) และไนอาซิน (niacin) อีกด้วย (Liener, 1978) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าหางนมนมถั่วเหลือง และสารประเภทไคแซคคาไรด์อาจช่วยส่งเสริมให้เชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* ให้มีการอยู่รอดหลังการแช่แข็งแห้งได้ดีขึ้น ดังนั้นจึงได้นำสาร lyoprotectant นำมาทำเป็นสารป้องกันผสม โดยคาดว่าอาจทำให้การอยู่รอดของเซลล์ทั้งสองชนิดนี้มีการอยู่รอดหลังการแช่แข็งและการเก็บรักษาได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งได้ทำการทดลองในขั้นต่อไป

ขณะที่เชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตในไข่แดงและกลูโคสต่ำกว่าสารชนิดอื่น อาจเนื่องมาจากในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำ (-30 องศาเซลเซียส) ไข่แดงมีปริมาณน้ำในส่วนที่กลายเป็นน้ำแข็งสูงถึงร้อยละ 87 (Riedel, 1972) ของปริมาณน้ำทั้งหมด จากสาเหตุนี้อาจ

ทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์อาจถูกทำลายหรือบาดเจ็บจากการเกิดผลึกน้ำแข็งจำนวนมากได้ ส่วนกลูโคสซึ่งให้ผลการป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งแห้งได้น้อย สอดคล้องกับการทดลองของ Miyajima (1997) ได้ศึกษาบทบาทของแซคคาไรด์ในการทำให้ liposome ที่ผ่านการแช่แข็งแห้งคงตัว โดยได้ทดลองกลไกการทำงานของแซคคาไรด์ เช่น กลูโคส มอลโตส และ โอลิโกเมอร์โมเลกุลใหญ่ชนิดอื่นต่อ egg yolk phosphatidylcholine (EPC) liposome และ dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) liposome ในการแช่แข็งและทำละลาย liposome 2 ชนิด พบว่ากลูโคสและมอลโตส มีผลช่วยป้องกัน liposome ต่อความเย็น (cryoprotective) ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า oligomer ขนาดใหญ่ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของกลูโคสและแลคโตส ต่อการรักษาความคงตัวของ EPS liposome และ DPPC liposome หลังการแช่แข็งแห้ง โดยการศึกษาการรั่วไหลของ inner marker ขนาดของ liposome และผลการเจริญต่อความร้อน พบว่ากลูโคสมีประสิทธิภาพในการรักษาความคงตัวของ EPC liposome ได้ต่ำกว่ามอลโตส

ตารางที่ 4.9 ผลของสารป้องกันเซลล์ต่อการอยู่รอดของเชื้อ *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus sakei* หลังการแช่แข็งแห้ง

ตัวอย่างที่	ชนิดของสารป้องกันเซลล์	การอยู่รอด (ร้อยละ) ^a ± SD	
		<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>
1	หางนมคั้นรูป	61.56 ± 0.56A ^b	65.06 ± 1.13A
2	นมถั่วเหลือง	60.39 ± 0.61AB	62.80 ± 1.67A
3	ไข่แดง	44.57 ± 3.38C	49.23 ± 0.96D
4	ซูโครส	60.96 ± 1.56A	58.54 ± 1.65BC
5	แลคโตส	64.17 ± 3.00A	56.42 ± 2.35BC
6	กลูโคส	46.25 ± 4.01C	46.35 ± 4.73D
7	ทรีฮาโลส	55.71 ± 2.98B	59.43 ± 1.04B
8	ซอร์บิทอล	59.72 ± 1.47AB	55.87 ± 1.87C

^a ตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

^b ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง 3 ซ้ำ

4.5.2 ผลของสารป้องกันผสมต่อการอยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* หลังการแช่แข็งแห้ง

จากการศึกษาการอยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* ในสูตรสารป้องกันผสมทั้งหมด 9 สูตร พบว่าเชื้อ *L. lactis* มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตสูงสุดในสารป้องกันผสมสูตรที่ 8 (ร้อยละ 75.86) โดยมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตเพิ่มขึ้นจากการใช้สารป้องกันเซลล์เพียงอย่างเดียว ร้อยละ 11.69 ถึง 20.15 นอกจากนี้พบว่าปริมาณเซลล์ของเชื้อ *L. lactis* ที่รอดชีวิตของสูตรที่ 8 มีค่าใกล้เคียงสูตรที่ 7 (ร้อยละ 71.88) สูตรที่ 9 (ร้อยละ 71.18) และสูตรที่ 5 (ร้อยละ 70.36) โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ขณะที่สูตรที่ 2 สูตรที่ 4 สูตรที่ 6 สูตรที่ 1 และสูตรที่ 3 มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตน้อยกว่ารองลงมาคือร้อยละ 69.10, 65.95, 64.82, 64.69, และ 61.70 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11)

ขณะที่เชื้อ *L. sakei* มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทำแช่แข็งแห้งในสารป้องกันผสมสูตรที่ 5 (ร้อยละ 74.57) และสูตรที่ 8 (ร้อยละ 74.47) สูงสุด โดยในสูตรที่ 5 พบว่ามีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้สารป้องกันเซลล์เพียงอย่างเดียวร้อยละ 9.51 ถึง 18.15 ส่วนสูตรที่ 8 มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตเพิ่มขึ้นร้อยละ 9.41 ถึง 18.05 โดยปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของทั้งสองสูตรนี้ใกล้เคียงกับสูตรที่ 6 ที่มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งแห้ง ร้อยละ 73.95 โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนในสารป้องกันเซลล์ผสมสูตรที่ 7, 9, 3, 2, 1 และ 4 มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตรองลงมาคือร้อยละ 71.28, 70.11, 70.04, 67.59, 65.25 และ 64.19 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11)

จากการที่พบว่าเชื้อ *L. lactis* มีการอยู่รอดสูงสุดในสูตรสารป้องกันผสมสูตรที่ 8 ในเชื้อ *L. lactis* ส่วนเชื้อ *L. sakei* อยู่รอดได้ดีในสูตรที่ 5 และ 8 คาดว่าเนื่องจากสูตรทั้งหมดมีหางนมเป็นส่วนประกอบที่นิยมใช้เป็นสารป้องกันผสมให้กับกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแบบแช่แข็งแห้ง โดยจากการศึกษาของ Champagne และคณะ (1991) ได้ทำการศึกษาผลของหางนมต่อการป้องกันเซลล์ให้กับเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่าหางนมสามารถป้องกันสภาวะเครียดต่างๆ ที่เกิดจากการแช่แข็งแห้งและการเก็บรักษาให้กับแบคทีเรียกรดแลคติกมากกว่าสารชนิดอื่นๆ ด้วยเหตุนี้จึงนิยมนำหางนมมาใช้เป็นอาหารพื้นฐานให้กับกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ขณะที่นมถั่วเหลืองช่วยป้องกันการแช่แข็งและการแช่แข็งแห้งได้ดีเช่นกันอาจเนื่องมาจากนมถั่วเหลืองประกอบด้วยโปรตีนซึ่งมีปริมาณสูงเช่นเดียวกับนมวัว และยังประกอบด้วยไขมัน คาร์โบไฮเดรต แคลเซียม ฟอสฟอรัส วิตามินบี (riboflavin) ธาตุเหล็ก และไทอามิน (thiamin) และไนอาซิน (niacin) (Liener, 1978) บางทีการมีส่วนประกอบที่มีคุณค่าจำนวนมากเช่นนี้อาจช่วยป้องกันเซลล์และอาจส่งเสริมการเจริญของเชื้อหลังจากแช่แข็งแห้งให้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้การนำสารประกอบประเภทแซคคาไรด์ชนิดต่างๆ ซึ่งได้แก่ แลคโตส ซูโครส ทรีฮาโลส และซอร์บิทอล มาผสมร่วมกับหางนมคั้นรูปหรือนมถั่วเหลืองอาจช่วยเพิ่มการป้องกันเชื้อหุ้มเซลล์ โดยการเพิ่มขึ้น

ที่มีลักษณะเข้มข้นที่บริเวณระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ทำให้ยับยั้งการเกิดผลึกน้ำแข็งและการขยายขนาดของผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ได้ (Font de Valdez และคณะ. 1983) ด้วยเหตุนี้การเติมสารประกอบแซคคาไรด์ร่วมกับหางนมหรือนมถั่วเหลืองจึงอาจเพิ่มการอยู่รอดภายหลังการแช่แข็งแห้งของเชื้อให้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องการทดลองของ Palmfeldt และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาการอยู่รอดของเชื้อ *Pseudomonas chlororaphis* ในสารป้องกันเซลล์ต่อการแช่แข็งแห้งชนิดต่างๆ พบว่าสารป้องกันเซลล์ในสูตรที่ประกอบด้วยหางนม 150 กรัมต่อลิตร ทรีฮาโลส 50 กรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิก 1 กรัมต่อลิตร มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 4.3 ซึ่งสูงกว่าการใช้หางนมเพียงอย่างเดียว (200 กรัมต่อลิตร) ที่มีอัตราการอยู่รอดเพียงร้อยละ 0.6

ตารางที่ 4.10 ผลของสูตรสารป้องกันผสมต่อการอยู่รอดของเชื้อ *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus sakei* หลังการแช่แข็งแห้ง

สูตรอาหารที่	ปริมาณส่วนผสมในสูตรสารป้องกันผสม (กรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักรวมส่วนผสมทั้งหมด)	การอยู่รอด (ร้อยละ) ± SD	
		<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>
1	แลคโตส 0.97 กรัม ซูโครส 0.97 กรัม ทรีฮาโลส 0.97 กรัม และนมถั่วเหลือง 97.10 กรัม	64.69 ± 1.23CD ^a	65.25 ± 2.58EF
2	แลคโตส 4.35 กรัม ซูโครส 4.35 กรัม ทรีฮาโลส 4.35 กรัม และนมถั่วเหลือง 86.96 กรัม	69.10 ± 5.084BC	67.59 ± 1.44DE
3	แลคโตส 0.96 กรัม ซูโครส 0.96 กรัม ทรีฮาโลส 0.96 กรัม ซอร์บิทอล 0.96 กรัม และนมถั่วเหลือง 96.15 กรัม	61.70 ± 3.49D	70.04 ± 1.34CD
4	หางนมผง 9.65 กรัม แลคโตส 0.88 กรัม ซูโครส 0.88 กรัม ทรีฮาโลส 0.88 กรัม และนมถั่วเหลืองค่อน้ำกลั่น (อัตราส่วน 1:1) 87.72 กรัม	65.95 ± 1.58BCD	64.19 ± 0.65F
5	หางนมผง 8.73 กรัม แลคโตส 3.97 กรัม ซูโครส 3.97 กรัม ทรีฮาโลส 3.97 กรัม และนมถั่วเหลืองค่อน้ำกลั่น (อัตราส่วน 1:1) 79.40 กรัม	70.36 ± 4.66ABC	74.57 ± 0.86A
6	หางนมผง 9.57 กรัม แลคโตส 0.87 กรัม ซูโครส 0.87 กรัม ทรีฮาโลส 0.87 กรัม ซอร์บิทอล 0.87 กรัม และนมถั่วเหลืองค่อน้ำกลั่น (อัตราส่วน 1:1) 86.96 กรัม	64.82 ± 0.35CD	73.95 ± 1.08AB
7	หางนมผง 9.65 กรัม แลคโตส 0.88 กรัม ซูโครส 0.88 กรัม ทรีฮาโลส 0.88 กรัม และน้ำกลั่น 87.72 กรัม	71.88 ± 2.90AB	71.28 ± 1.41BC
8	หางนมผง 8.73 กรัม แลคโตส 3.97 กรัม ซูโครส 3.97 กรัม ทรีฮาโลส 3.97 กรัม และน้ำกลั่น 79.36 กรัม	75.86 ± 3.41A	74.47 ± 2.88A
9	หางนมผง 9.57 กรัม แลคโตส 0.88 กรัม ซูโครส 0.88 กรัม ทรีฮาโลส 0.88 กรัม ซอร์บิทอล 0.88 กรัม และน้ำกลั่น 86.96 กรัม	71.18 ± 3.06AB	70.11 ± 1.40CD

^a ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง 3 ซ้ำ

^b ตัวอักษรที่ต่างกันในสดมภ์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

4.6 ผลของการปรับตัวต่อความดันออสโมติกและความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นต่อการอยู่รอดของเชื้อ *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus sakei* หลังการแช่แข็งแห้งและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

4.6.1 ผลของการปรับตัวต่อความดันออสโมติกและการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นต่อการอยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* หลังการแช่แข็งแห้ง

จากการศึกษาผลของการปรับตัวต่อความดันออสโมติกด้วยซูโครส (ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ในอาหารเหลว MRS) และการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ต่อการอยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* ที่ผ่านการแช่แข็งแห้งในสารป้องกันผลสมสูตรที่ 8 พบว่าเชื้อที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก เชื้อที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็น และเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับตัวมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งแห้งก่อนข้างใกล้เคียงกันคือร้อยละ 73.18, 75.46 และ 75.01 ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ในขณะที่ผลของการปรับตัวของเชื้อ *L. sakei* ต่อความดันออสโมติก และการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นในสารป้องกันผลสมสูตรที่ 5 หลังผ่านการแช่แข็งแห้งพบว่าการอยู่รอดของเซลล์ที่ผ่านการปรับตัวของทั้งสองทรีตเมนต์นี้ค่อนข้างสูงคือร้อยละ 79.16 และ 77.22 ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าเชื้อ *L. sakei* ที่ไม่ผ่านการปรับตัว (จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตร้อยละ 71.27) ถึงร้อยละ 7.89 และ 5.95 ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4.12)

ตารางที่ 4.11 ผลของการอยู่รอดของเชื้อ *Lactococcus lactis* ในสารป้องกันผลสมสูตรที่ 8 และ *Lactobacillus sakei* ในสารป้องกันผลสมสูตรที่ 5 ที่ไม่ผ่านการปรับตัว ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก และผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นหลังการแช่แข็งแห้ง

ชนิดของเซลล์	ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งแห้ง (ร้อยละ) $\pm$ SD	
	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>
เซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัว	75.01 $\pm$ 2.96A ^b	71.27 $\pm$ 4.96A
เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก	73.18 $\pm$ 0.79A	79.16 $\pm$ 4.24A
เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็น	75.46 $\pm$ 0.84A	77.22 $\pm$ 1.89A

^a ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง 3 ซ้ำ

^b ตัวอักษรที่ต่างกันในสครัมภ์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการปรับตัวต่อความดันออสโมติกด้วยซูโครสไม่มีผลช่วยส่งเสริมการรอดชีวิตของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* หลังการแช่แข็งแห้งอาจเป็นเพราะการปรับตัวต่อความดันออสโมติกด้วยวิธีนี้ไม่ทำให้ภายในเซลล์ของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* เกิดการสะสม compatible solute ซึ่งเป็นสารประกอบที่เซลล์ใช้ในการรักษาสมดุลของความดันเต่งเมื่อภายนอกเซลล์มีความดันออสโมติกสูง (Csonka, 1989 ; Galinski และ Trüper, 1994) สำหรับ compatible solute มีรายงานว่าสะสมภายในเซลล์ของ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML3 คือ ไกลซีนบีเทน (van der Heide และ Poolman, 2000) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้อาจช่วยป้องกันเซลล์ต่อสภาพการแช่แข็งและการทำให้ละลาย และสภาพในการทำแห้งเนื่องจาก compatible solute พิสูจน์ได้ว่ามีผลทำให้เอนไซม์ภายในเซลล์มีความเสถียร และยังมีผลในทางป้องกันเซลล์ไม่เพียงแต่ป้องกันเซลล์ต่อสภาพที่มีเกลือสูงเท่านั้นยังป้องกันเซลล์ต่อสภาพที่มีอุณหภูมิที่สูง สภาพในการแช่แข็งและทำให้ละลาย และสภาพในการทำแห้งได้อีกด้วย (Yancey และคณะ, 1982) Yancey และคณะ (1982) ได้กล่าวถึงการสะสม compatible solute เพิ่มขึ้นภายในเซลล์เมื่อภายนอกเซลล์มีความดันออสโมติกสูงว่าเกิดจากการสังเคราะห์สาร compatible solute ขึ้นเองภายในเซลล์หรือเกิดจากการรับสารบางชนิด เช่น ไกลซีนบีเทน หรือ โพรลีน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออาจช่วยเพิ่มจำนวนเซลล์ที่อยู่รอดเช่นเดียวกับการทดลองของ Hukins และคณะ (1987) ที่ได้นำเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* IFO 3532 มาปรับตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความดันออสโมติกสูงจากโซเดียมคลอไรด์ (1 โมลาร์) พบว่าการเติมไกลซีนบีเทนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จะทำให้เชื่อมีการลำเลียงไกลซีนบีเทนที่อยู่ในอาหารเข้าไปสะสมภายในเซลล์ นอกจากนี้ Ket และ de Bont (1994) ซึ่งได้ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* P743 พบว่าเมื่อเติมไกลซีนบีเทนที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ เพิ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความดันออสโมติกสูงจากโซเดียมคลอไรด์ (0.6 โมลาร์) จะช่วยให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 0.6 โมลาร์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อนำเชื้อมาปรับตัวต่อความดันออสโมติกโดยใช้โซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.6 หรือ 1 โมลาร์ ที่มีไกลซีนบีเทนจะทำให้การอยู่รอดของเชื้อ *L. plantarum* P743 หลังจากถูกทำให้แห้งสูงกว่าเชื้อที่ปรับตัวต่อโซเดียมคลอไรด์โดยไม่เติมไกลซีนบีเทน ส่วนการปรับตัวต่อความเย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ไม่มีผลส่งเสริมให้การอยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* หลังจากผ่านการแช่แข็งแห้งคาดว่าอาจเป็นเพราะอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการปรับตัวของเชื้อไม่สามารถชักนำให้เชื้อทั้งสองเกิดการตอบสนองต่อความเย็นและเกิดการสังเคราะห์ cold shock protein ซึ่ง Béal และคณะ (2001) ได้กล่าวถึง cold shock protein ว่ามีผลทำให้เชื้อสามารถทนต่อความเย็นได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Broadbent และ Lin (1999) พบว่าเชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* FG2 ที่ผ่านการปรับตัวต่อความเย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ไม่ช่วยให้เชื่อมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากผ่านการแช่แข็งแห้งสูงกว่าเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่แต่งขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในทางตรงกันข้ามจากการศึกษาของ Wang และคณะ (2005) พบว่าเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* RD758 ที่ผ่านการปรับตัวต่อความเย็นที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จะทำให้เชื้อสามารถต้านทานต่อความเย็นที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสได้ ซึ่งมีรายงานถึงความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการปรับตัวต่อความเย็นว่ามีผลทำให้เชื้อสามารถต้านทานต่อสภาพเครียดจากการแช่แข็งและถูกละลายได้ต่างกัน โดย Lee (2004) ได้นำเชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* ในระยะคงตัวมาปรับตัวต่อความเย็นที่อุณหภูมิ 4, 10 และ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าการปรับตัวต่อความเย็นที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส ทำให้เชื้อ *L. lactis* ssp. *diacetylactis* มีการอยู่รอดภายหลังการนำเชื้อมาแช่แข็งและนำมาละลายสูงกว่าการปรับตัวต่อความเย็นที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส และเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับตัว

4.6.2 ผลของการปรับตัวต่อความดันออสโมติกและการปรับตัวต่อความดันออสโมติก ร่วมกับความเย็นการอยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* ในกล้าเชื้อผงที่เก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาผลของการปรับตัวของ *L. lactis* ต่อความดันออสโมติกด้วยซูโครส ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ และการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ต่อการอยู่รอดของเชื้อชนิดนี้ในสารป้องกันผลมสูตรที่ 8 หลังผ่านการแช่แข็งแห้ง และเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน พบว่าหลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 3 วัน เชื้อที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็น และเชื้อที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกอย่างเดียวมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตเฉลี่ยร้อยละ 98.33 และ 97.53 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังผ่านการแช่แข็งแห้ง ณ เวลาเริ่มต้นของการเก็บรักษา ซึ่งจำนวนเซลล์ของทั้งสองทรีตเมนต์ลดลงน้อยกว่าจำนวนเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัว (จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตร้อยละ 91.69) โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งการลดลงของจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของทั้งสามทรีตเมนต์เกิดขึ้นเร็วในช่วง 3 วันแรก หลังจากนั้นจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของทั้งสามทรีตเมนต์ค่อยๆ ลดลงเล็กน้อยตามระยะเวลาเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นและเมื่อเก็บรักษาครบ 28 วัน เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตมากที่สุด (ร้อยละ 94.96) หรือลดลงจากปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต ณ เวลาเริ่มต้น $\log 0.117$ โคโลนีต่อกรัม ซึ่งมากกว่าจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของ *L. lactis* ที่ไม่ผ่านการปรับตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัวมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตในวันที่ 28 ร้อยละ 87.97 ซึ่งลดลง $\log 0.595$ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต ณ เวลาเริ่มต้นของการเก็บรักษา แต่อย่างไรก็ตามเมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษาจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของ *L. lactis* ที่ผ่านการปรับตัวด้วยความดันออสโมติกร่วมกับการปรับตัวต่อความเย็น และ *L. lactis* ที่ผ่านการปรับตัวด้วย

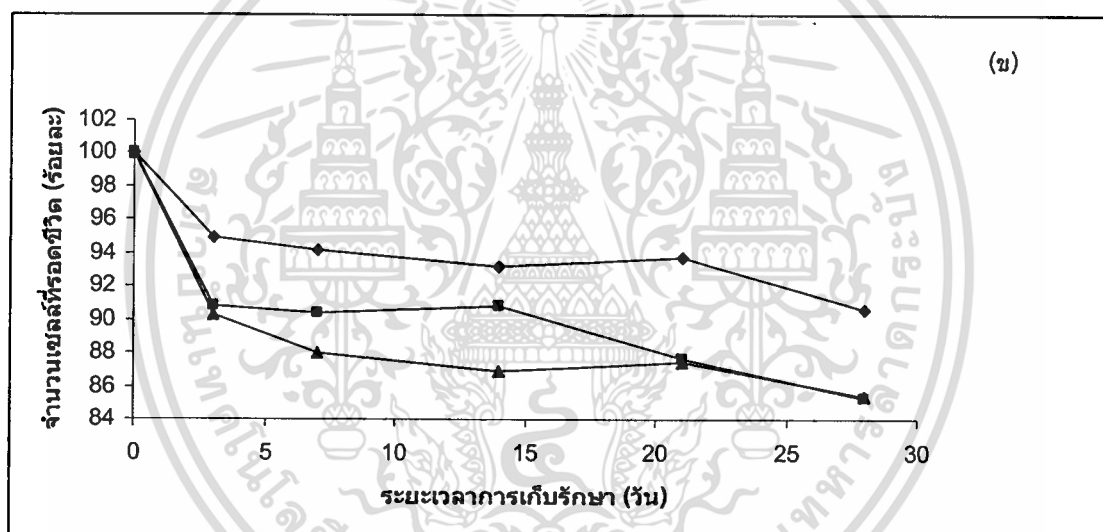
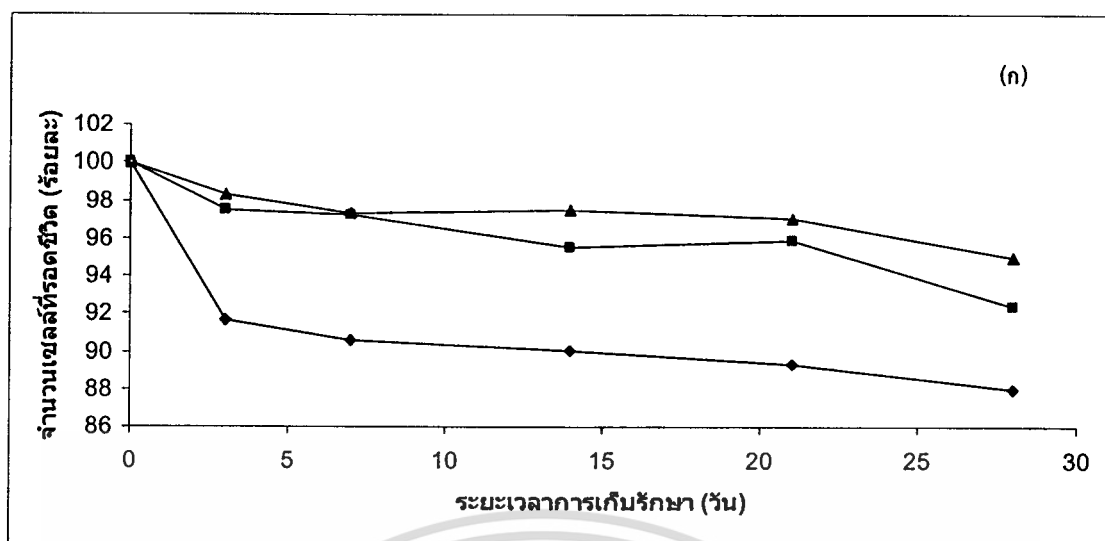
ความดันออสโมติกเพียงอย่างเดียว (จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตร้อยละ 92.34) มีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4.6 (ก))

สำหรับการปรับตัวของ *L. sakei* ต่อความดันออสโมติก และการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นต่อการอยู่รอดของเชื้อชนิดนี้ในสูตรสารป้องกันผลมสูตรที่ 5 หลังเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเก็บรักษาเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ผลที่ได้แตกต่างกับกรณีของเชื้อ *L. lactis* คือเชื้อ *L. sakei* ที่เซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัวมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตที่สูงกว่า (ร้อยละ 94.90) เชื้อที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็น (ร้อยละ 90.33) และเชื้อที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกเพียงอย่างเดียว (ร้อยละ 90.79) โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งการลดลงของจำนวนเซลล์ทั้งสามทรีดเมนต์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรกเช่นเดียวกับเชื้อ *L. lactis* แล้วจากนั้นในช่วงวันที่ 7 ถึง 21 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตมีแนวโน้มค่อยๆ ลดลงเพียงเล็กน้อย โดยเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัวมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูงกว่าเซลล์ที่ผ่านการปรับตัวทั้งสองทรีดเมนต์ทุกช่วงเวลาของการเก็บรักษา และเมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษา (วันที่ 28) เชื้อ *L. sakei* ที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็น และผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกเพียงอย่างเดียวมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตใกล้เคียงกัน (ร้อยละ 85.41 และ 85.25 ตามลำดับ) โดยเชื้อที่ผ่านการปรับตัวทั้งสองทรีดเมนต์มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลง $\log 0.951$ และ $\log 0.948$ ตามลำดับ ซึ่งลดลงมากกว่าเชื้อที่ไม่ผ่านตัวที่มีจำนวนเซลล์ที่ลดลง $\log 0.503$ ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (รูปที่ 4.6 (ข)) ดังนั้นจะเห็นว่าการปรับตัวทั้งสองทรีดเมนต์ไม่มีผลช่วยส่งเสริมการรอดชีวิตของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* หลังจากการแช่แข็งแห้งและเก็บรักษาเป็นเวลานาน (28 วัน)

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการปรับตัวต่อความดันออสโมติกด้วยซูโครสที่มีความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ในอาหารเหลว MRS ไม่ช่วยให้เชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* เกิดความต้านทานต่อการแช่แข็งแห้งและการเก็บรักษา (-80 องศาเซลเซียส) อาจเป็นเพราะเชื้อทั้ง 2 ชนิดไม่เกิดการปรับตัวให้ภายในเซลล์มีการสะสมสาร compatible solute ซึ่งเป็นสารประกอบชนิดที่สำคัญที่เซลล์ใช้รักษาสมดุลภายในเซลล์ (Yancey และคณะ. 1982) และทำให้เชื้อสามารถอยู่รอดได้ในสภาพที่มีความดันออสโมติกสูงอันเกิดจากการแช่แข็งแห้งและการเก็บรักษาได้ดีขึ้น ซึ่ง Glaeser และคณะ (1996) พบว่าเชื้อ *L. plantarum* และแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นๆ เมื่อเผชิญกับสภาพที่มีความดันออสโมติกสูงจะไม่สามารถสังเคราะห์สาร compatible solute ชนิดไกลซีนบีเทน คาร์นิทีน หรือ โพรลีน ขึ้นมาเองได้ ทางเดียวที่แบคทีเรียกรดแลคติกจะสามารถอยู่รอดจากสภาพความดันออสโมติกได้คือรับสาร compatible solute เหล่านี้มาจากภายนอกเซลล์เท่านั้น และจากเหตุผลนี้เองอาจทำให้เชื้อที่ผ่านการปรับตัวและไม่ผ่านการปรับตัว จากการทดลองนี้มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งแห้งและเก็บรักษาไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงคาดว่าหากเติมสารไกลซีนบีเทน หรือ โพรลีน เพิ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความดันออสโมติกสูงด้วยซูโครสอาจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำให้เชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* มีการรับสารเหล่านี้เข้าสู่เซลล์และส่งผลให้จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต หลังการแช่แข็งแห้งและเก็บรักษาสูงมากขึ้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Uguen และคณะ (1999) ซึ่งพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ADRIA 85L030 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม โซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โมลาร์ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจะลดลงประมาณ ร้อยละ 70 แต่เมื่อเติมไกลซีนปิเทนที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์เพิ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี โซเดียมคลอไรด์นี้จะช่วยให้เชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* ADRIA 85L030 มีอัตราการเจริญที่สูงขึ้น ส่วนเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* ที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกพร้อมกับความเย็นไม่สามารถเพิ่มความต้านทานต่อการแช่แข็งจากการเก็บรักษาสูงขึ้นอาจเนื่องมาจากการปรับตัวต่อ ความดันออสโมติกไม่มีผลให้เชื้อเกิดการสะสมสาร compatible solute เพื่อรักษาสมดุลให้กับเซลล์ และการปรับตัวต่อความเย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ไม่ทำให้เชื้อเกิดการ ตอบสนองให้สังเคราะห์ cold shock protein ซึ่งมีหน้าที่ป้องกันอันตรายจากผลึกน้ำแข็งในระหว่าง การแช่แข็งเพื่อเก็บรักษาให้กับเซลล์ (Panoff และคณะ. 1998) ซึ่ง Kim และคณะ (1998) พบว่าเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* LL41-1 จะสามารถสังเคราะห์ cold shock protein ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เท่านั้น ซึ่งเขาได้กล่าวถึงการตอบสนองให้เกิดการสังเคราะห์ cold shock protein ว่าแบคทีเรีย สปีชีส์เดียวกันอาจสังเคราะห์ cold shock protein ที่อุณหภูมิหรือสภาวะที่แตกต่างกัน ในขณะที่ Urraza และ Antoni (1997) ได้ศึกษาสภาวะที่ใช้ในการปรับตัวของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBB เมื่อนำเชื้อชนิดนี้มาปรับตัวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ภายหลังการนำเชื้อมาแช่แข็ง (-20 องศาเซลเซียส) และนำเชื้อมาละลาย (37 องศาเซลเซียส) พบว่า เชื้อมีการอยู่รอดสูงกว่าเมื่อนำเชื้อมาปรับตัวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 180 นาที ดังนั้น หากต้องการให้เชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* เกิดการปรับตัวต่อความเย็นเพื่อเพิ่มความต้านทานต่อ ความเย็นที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อ (-8 องศาเซลเซียส) อาจต้องมีการศึกษาถึงอุณหภูมิและเวลาที่ เหมาะสมที่สามารถทำให้เชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* เกิดการปรับตัวและสังเคราะห์ cold shock protein เพิ่มขึ้น



รูปที่ 4.6 ผลของการปรับตัวต่อความดันออสโมติกและการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นต่อการอยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* (รูป ก) ในสารป้องกันผสมสูตรที่ 8 และ *L. sakei* (รูป ข) ในสารป้องกันผสมสูตรที่ 5 ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน สัญลักษณ์: ◆ เซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัว ■ เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกโดยใช้ซูโครส 0.3 โมลาร์ ▲ เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกโดยใช้ซูโครส 0.3 โมลาร์ ร่วมกับความเย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างแฮมปลาทราย แฮมปลาชะโด เนื้อปลาทราย และเนื้อปลาชะโดทั้งหมด 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 3.0×10^5 ถึงมากกว่า 2.1×10^6 โคโลนีต่อกรัม และได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 138 ไอโซเลต นำมาศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051, *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 451 และ *Listeria monocytogenes* DMST 11256 ด้วยเทคนิค agar spot test พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 30 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบดังกล่าวได้อย่างน้อย 1 ชนิด โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งมากที่สุดได้แก่เชื้อ *L. bulgaricus* และเชื้อที่ถูกยับยั้งรองลงมาได้แก่เชื้อ *P. acidilactici* ส่วนเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ไม่พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตใดสามารถยับยั้งได้ และเมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือกมาทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดี ในอาหารเหลว MRS พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทนต่อกรดแลคติกที่พีเอชต่ำสุด 2.90 แบคทีเรียจำนวน 2 ไอโซเลตทนต่อกรดไฮโดรคลอริกที่พีเอชต่ำสุด 2.20 จำนวน 4 ไอโซเลตทนต่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงสุดร้อยละ 9 จำนวน 2 ไอโซเลต และจำนวน 27 ไอโซเลตทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นสูงสุดร้อยละ 5.25 และได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก 2 ไอโซเลตมาทำการจำแนกชนิด ซึ่งพบว่า ไอโซเลต 13IS3 คือ *Lactococcus lactis* ที่มีคุณสมบัติสามารถยับยั้งเชื้อ *L. bulgaricus* ทนต่อกรดแลคติกที่พีเอช 3.20 กรดไฮโดรคลอริกพีเอช 2.20 โซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 6.00 และเกลือน้ำดีเข้มข้นร้อยละ 5.25 และไอโซเลต 13IS4 คือ *Lactobacillus sakei* ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถยับยั้งเชื้อ *P. acidilactici* และ *L. bulgaricus* ทนต่อกรดแลคติกที่พีเอช 2.90 กรดไฮโดรคลอริกพีเอช 2.20 โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.00 และเกลือน้ำดีความเข้มข้นร้อยละ 5.25

ในการศึกษาผลของสารป้องกันเซลล์ความเข้มข้นร้อยละ 9.1 ทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ หางนม นมถั่วเหลือง ไข่แดง ชูโครส แลคโตส กลูโคส ทรีฮาโลส และซอร์บิทอล ต่อการอยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *L. lactis* สามารถอยู่รอดได้สูงในแลคโตส หางนม ชูโครส นมถั่วเหลือง และซอร์บิทอล ซึ่งสูงกว่าในทรีฮาโลส กลูโคส และไข่แดง ตามลำดับ ขณะที่เชื้อ *L. sakei* สามารถอยู่รอดได้สูงในหางนม และนมถั่วเหลือง รองลงมาเป็นทรีฮาโลส ชูโครส แลคโตส ซอร์บิทอล ไข่แดง และกลูโคส ตามลำดับและเมื่อคัดเลือกสารป้องกันเซลล์ที่ทำให้เชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูงหลังจากแช่แข็งแห้ง 6 ลำดับแรก ซึ่งได้แก่ หางนม นมถั่วเหลือง ชูโครส แลคโตส ทรีฮาโลส และซอร์บิทอล นำมาพัฒนาเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นสูตรผสมของสารป้องกันผสมทั้งหมด 9 สูตร จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *L. lactis* สามารถอยู่รอดได้สูงสุดหลังการแช่แข็งแห้งในสารป้องกันผสมสูตรที่ 8 ซึ่งประกอบด้วยหางนมผง 8.73 กรัม แลคโตส 3.97 กรัม ซูโครส 3.97 กรัม ทรีฮาโลส 3.97 กรัม และน้ำกลั่น 79.36 กรัมต่อ 100 กรัม ของส่วนผสมทั้งหมด ซึ่งพบว่ามีการอยู่รอดร้อยละ 75.86 โดยมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตเพิ่มขึ้นร้อยละ 11.69 ถึง 20.15 เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารป้องกันเซลล์เพียงชนิดเดียว ขณะที่เชื้อ *L. sakei* สามารถอยู่รอดสูงสุดในสูตรสารป้องกันผสมที่ประกอบด้วย หางนมผง 8.73 กรัม แลคโตส 3.97 กรัม ซูโครส 3.97 กรัม ทรีฮาโลส 3.97 กรัม และนมถั่วเหลือง (อัตราส่วน 1:1) 79.40 กรัมต่อ 100 กรัมของส่วนผสมทั้งหมด ซึ่งมีการอยู่รอดร้อยละ 74.57 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตกับการใช้สารป้องกันเซลล์เพียงชนิดเดียวมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตเพิ่มขึ้นร้อยละ 9.51 ถึง 18.15

ในการศึกษาผลของการปรับตัวต่อความดันออสโมติกด้วยซูโครสที่มีความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ในอาหารเหลว MRS การปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ในสารป้องกันเซลล์และไม่ผ่านการปรับตัวต่อการอยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* ภายหลังจากแช่แข็งแห้งพบว่าเชื้อ *L. lactis* ที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็น และไม่ผ่านการปรับตัวในสารป้องกันผสมสูตรที่ 8 มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งแห้งใกล้เคียงกันคือร้อยละ 73.18, 75.46 และ 75.01 ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *L. sakei* ที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก และปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นในสารป้องกันผสมสูตรที่ 5 มีการอยู่รอดใกล้เคียงกัน (จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตร้อยละ 79.10 และ 77.22 ตามลำดับ) ซึ่งสูงกว่าเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับตัว (จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตร้อยละ 71.27)

จากการศึกษาผลของการปรับตัวต่อความดันออสโมติกด้วยซูโครส (ซูโครส 0.3 โมลาร์ ในอาหารเหลว MRS) และการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็น (10 องศาเซลเซียส) ต่อการอยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* ที่ผ่านการแช่แข็งแห้งและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน พบว่าเชื้อ *L. lactis* ที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกและเชื้อที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นมีการอยู่รอดหลังจากแช่แข็งแห้งใกล้เคียงกับเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับตัว และพบว่าเชื้อ *L. lactis* ที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นมีการอยู่รอดในระหว่างเก็บรักษาสูงกว่าเชื้อที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกและเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับตัวเพียงเล็กน้อย ขณะที่เชื้อ *L. sakei* ที่ผ่านการปรับตัวทั้งสองทรีดเมนต์มีการอยู่รอดหลังการแช่แข็งแห้งสูงกว่าเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับตัว แต่ในการเก็บรักษาพบว่าเชื้อ *L. sakei* ปรับตัวทั้งสองทรีดเมนต์ไม่ได้มีผลช่วยป้องกันเซลล์ต่อสภาพเครียดจากการแช่แข็งที่อุณหภูมิที่ต่ำมากได้

จากการทดลองนี้ทำให้ทราบถึงเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดีซึ่งได้แก่เชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* แต่อย่างไรก็ตามความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบของเชื้อ *L. lactis* และเชื้อ *L. sakei* ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเกิดจากการสร้างสารชนิดใด ดังนั้นหากได้ทำการค้นคว้าวิจัยเพิ่มเติมว่าเกิดจากสารชนิดใด สภาวะใดเหมาะต่อการผลิตสารยับยั้ง อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคของเชื้อทั้งสองดียิ่งขึ้น นอกจากนี้การทดลองในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงชนิดของสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งแห้งและสูตรของสารป้องกันผสมที่ทำให้เชื้อมีการอยู่รอดสูงแม้ผ่านการแช่แข็งแห้ง นอกจากนี้ยังทำให้ทราบถึงผลจากการปรับตัวต่อความดันออสโมติกด้วยซูโครส และความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ช่วยเพิ่มความต้านทานต่อการแช่แข็งแห้งและการแช่แข็งเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน ให้กับเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* ได้เพียงเล็กน้อย ดังนั้นหากนำกลไกเชื้อแบบแช่แข็งแห้งที่ได้จากการทดลองมาทำการหมักปลาเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อที่แท้จริงรวมทั้งศึกษาถึงคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่ได้เช่น กลิ่น สี รสชาติที่เกิดขึ้น อาจทำให้เกิดการพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาหมักให้มีจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพปราศจากจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค อีกทั้งมีรสชาติเป็นที่น่าพอใจเพิ่มมากขึ้นอีกด้วย

บรรณานุกรม

- จินดารัตน์ นิตวัฒนพงษ์. 2522. การศึกษาจุลชีววิทยาของอาหารหมักพื้นเมือง ไตปลา และปลาแป้งแดง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธารารัตน์ ศุภศิริ. 2542. PROBIOTIC : แบคทีเรียเพื่อสุขภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์. 53 (6) : 357-360.
- นาถสุดา วิสวงค์. 2522. การศึกษาจุลชีววิทยาของอาหารหมักพื้นเมือง ปลาเจ้า ปลาส้ม และส้มผัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นภา โล่ทอง. 2534. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มัทนา แสงจินดาวงษ์. 2545. ผลิตภัณฑ์ประมงไทย. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมบูรณ์ ธนาสุภวัฒน์. 2544. เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์วิทยาลัย.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อดิสร เสวตวิวัฒน์. 2542. วิธีการเบื้องต้นในการตรวจสอบเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้ง (แบคทีริโอซิน). กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- อรนุช อุดรภิชาติ. 2530. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อซาลโมเนลลาและผลิตกรดไขมันเพื่อใช้หมักแฮม. กรุงเทพฯ : วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Abadias, M., Benabarre, A., Teixidó, N., Usall, J. and Viñas, I. 2001. "Effect of freeze-drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sakei*." **International Journal of Food Microbiology**. 65 : 173-182.
- Abdel-Bar, N. M. and Harris, N. D. 1984. "Psychrotrophic bacteria in associative cultures and in refrigerated food." **Journal of Food Protection**. 47 (1) : 61-64.
- Ammor, S., Dufour, E., Zagorec, M. and Chaillou, S. 2005. "Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures." **Food Microbiology**. 22 : 529-538.
- Amster, H. and Jost, R. 1980. "Antibacterial activity of skim milk fermented with lactic acid bacteria." **Dairy Science Abstracts**. 42 : 8164.

- Atkinson, D. F. 1969. Limitation of metabolic concentration and the conservation of solvent capacity in the living cell. In Horecker, B. I. and Stadtman, E. R. (eds.). **Current Topics in Cellular Regulation**. NewYork : Academic Press.
- Baumann, D. P. and Reinbold, G. W. 1966. "Freezing of lactic cultures." **Journal of Dairy Science**. 49 : 259-264.
- Béal, C., Fonseca, F. and Corrieu, G. 2001. "Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* is related to membrane fatty acid composition." **Journal of Dairy Science**. 84 : 2347-2356.
- Bendas, G., Wilhelm, F., Richter, W. and Nuhn, P. 1996. "Synthetic glycolipids as membrane-bound cryoprotectants in the freeze-drying process of liposomes." **European Journal of Pharmacological Science**. 4 : 211-222.
- Berthier, F. and Ehrlich, S. D. 1999. "Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and design of PCR primers for it detection using randomly amplified polymorphic DNA." **International Journal of Systematic Bacteriology**. 49 : 997-1007.
- Breierová, E. 1994. "Cryoprotection of psychrophilic yeast species by the use of adaptive media." **Cryobiology**. 15 : 191-197.
- Bremer, E. and Krämer, R. 2000. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds.). **Bacterial Stress Responses**. Washington, DC : American society for microbiology.
- Bridge P. D. and Sneath. P. H. A. 1982. "*Streptococcus gallinum* sp. and *Streptococcus oralis* sp." **International Journal of Systemic Bacteriology**. 32 : 410-415.
- Broadbent, J. R. and Lin, C. 1999. "Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilisation." **Cryobiology**. 39 : 88-102.
- Brown, A. D. 1990. Microbial water stress physiology. In Jhon W. and Sons, C. (eds.). **Principles and Perspectives**. England : Chichester.
- Bucio, A., Hartemink, R., Schrama, J. W., Verreth, J. and Rombouts, F. M. 2006. "Presence of lactobacilli in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with a recirculation system." **Food Microbiology**. 23 : 476-482.
- Buckenhuskas, H. K. 1993. "Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities." **FEMS Microbiology Review**. 12 : 253-271.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Budde, B. B., Hornæk, T., Jacobsen, T., Barkholt, V. and Koch, A. G. 2003. "Leuconostoc carnosum 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation bacteriocin identification and meat application experiments." **International Journal of Food Microbiology**. 83 : 171-184.
- Bunning, V. K., Crawford R. G., Tierney, J. T. and Peller, J. T. 1990. "Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after sublethal heat shock." **Applied and Environmental Microbiology**. 56 : 3216-3219.
- Campos, C. A., Rodríguez, O., Calo-Mata, P., Prado, M. and Barros-Velázquez, J. 2006. "Preliminary characterization of bacteriocin from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strain isolated from turbot (*Psetta maxima*)." **Food Research International**. 39 : 356-364.
- Carpenter, J. F. and Crowe, J. H. 1989. "An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins." **Biochemistry**. 28 : 3916-3922.
- Caric', M. 1994. Milk powder production of specific products. In Hui, Y. H. **Food Science and Technology**. (ed.). USA : VCH Publishers.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X. and Gibbs, P. 2004. "Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria." **International Dairy Journal**. 14 : 835-847.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X. and Gibbs, P. 2003. "Effect of various factors thermotolerance and survival during storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*." **Journal of Food Science**. 68 (8) : 2538-2541.
- Castro, H. P., Teixeira, P. M. and Kirby, R. 1996. "Change in the membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying." **Biotechnology Letters**. 18 : 99-104.
- Champagne, C. P., Gardner, N., Brochu, E. and Beaulieu, Y. 1991. "The freeze-drying of lactic acid bacteria." **A review Canadian Institute of Science and Technology Journal**. 24 : 118-128.
- Chavarri, F. J., Paz, M. D. and Neez, M. M. 1988. "Cryoprotective agents for frozen concentrated starter form non-bitter *Streptococcus lactis* strains" **Biotechnology Letters**. 10 : 11-16.
- Conway, P. L., Goruach, S. L. and Goldin, B. R. 1987. "Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells." **Journal of Dairy Science**. 70 : 1-12.

- Cook, G. M. and Russ, J. B. 1994. "The effect of extracellular pH and lactic acid on pH homeostasis in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus bovis*." **Current Microbiology**. 28 : 165-168.
- Coutinho, C. E. B., Felix, D., Panek, A. D. 1988 "Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast strains." **Journal of Biotechnology**. 7 : 23-32.
- Cowley, G., 1988. **The Microbe that ate *Salmonella***. Newsweek. August 22. pp. 56.
- Cronan, J. E. and Rock, C. O. 1987. Biosynthesis of membrane lipids. In Neidhardt, F. C. , Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umbarger, H. E. (eds.). ***Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology**. Washington, DC : American Society for Microbiology.
- Crowe, J. H., Hoekstra, F. A., Nguyen, K. H. N. and Crowe, L. M. 1996. "Is vitrification involved in depression of the phase transition temperature in dry phospholipids." **Biochemical and Biophysical Research Communications Acta**. 1280 : 187-196.
- Csonka, L. N. 1989. "Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress." **Department of Biological Science**. 53 : 121-147.
- Csonka, L. M. and Epstein, W. 1996. Osmoregulation. In Neidhardt, F. C. (ed.). ***Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and Molecular Biology**. 2nd Washington, DC : ASM Press.
- Daeschel, M. A. 1989. "Antibacterial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives." **Food Technology**. 43 : 164-167.
- Daily, W. A. and Higgins, C. E. 1973. "Preservation and storage of microorganisms in the gas phase of liquid nitrogen." **Cryobiology**. 10 : 364-367.
- Dakin, J. C. and Day, P. M. 1958. "Yeasts causing spoilage in acetic acid preserves." **Journal of Applied Bacteriology**. 21 : 94-98.
- Davenport, H. W. 1977. **Physiology of the digestive tract**. Chicaco : Year Book Medical.
- Dave, R. I. and Shah, N. P. 1998. "Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yougurt." **Journal of Dairy Science**. 81 : 2804-2816.
- De Antoni, G. L., Perez, P., Abraham, A., Anon, M. C. 1989. "Trehalose a cryoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus*." **Cryobiology**. 26 : 149-153.

- Denilova, M. V., Nadirona, T. M. and Estseva, T. V. 1981. "Dependence of the viability of lyophilized bacteria stored for long periods on the quantity of residual humidity." **Microbiology Abstract Section A Industrial and Applied Microbiology**. 16 : 884-916.
- De Mendoza, D. and Cronan, J. E. 1983. "Thermal regulation of membrane lipid fluidity in bacteria." **Trends Biochemical Science**. 8 : 49-52.
- Derzelle, S., Hallet, B., Ferain, T. Delcour. J. and Hols, P. 2003. "Improved adaptation to cold-shock, stationary-phase and freezing stresses in *Lactobacillus plantarum* overproducing cold-shock proteins." **Applied and Environmental Microbiology**. 69 : 4285-4290.
- de Quervain, M. R. 1975. Crystallization of water. In **Freeze-Drying and Advanced Food Technology**. New York : Academic Press.
- De Urraza, P. G. and De Antoni, G. L. 1997. "Induced cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBB by preincubation at suboptimal temperatures with a fermentable sugar." **Cryobiology**. 35 : 159-164.
- De Vuyst, L. and Vandermme, E. J. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In De Vuys. L. and Vandarmme E. J. (eds.). **Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria**. New York : Blackie Academic and Professional.
- De Vuyst, L. and Vandermme, E. J. 1994. Lactic acid bacteria and bacteriocins their practical importance. In De Vuyst, L. and Vandermme, E. J. (eds.). **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology Genetics and Applications** . San Diego : Academic Press.
- Diniz-Mendes, L., Bernardes, E., de Araujo, P. S., Panek, A. D. and Paschoalin, V. M. F. 1999. "Preservation of frozen yeast cells by trehalose." **Biotechnology and Bioengineering**. 65 : 572-578.
- Doebbler, G. F. 1966. "Cryoprotective compounds: review and discussion of structure and function." **Cryobiology**. 3 : 2-11.
- Doods, K. and Collins-Thomson, D. 1984. "Incidence of nitrite-depleting lactic acid bacteria in used meat starter culture." **Journal of Food Proteins**. 47 : 7-10.
- Erkkila, S. and Petaja, E. 2000. "Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use." **Meat Science**. 55 : 297-300.

- Fernandez Murga, M. L., Cabrera, G. M., Font De Valdez, G., Disalvo, A. and Seldez, A. M. 2000. "Influence of growth temperature on crytolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*." **Journal of Applied Microbiology**. 88 : 342-348.
- Fleming, H. P., Mcfeeters, R. F. and Daesohel, M. A. 1985. The Lactobacilli, Pediococcus and Leuconostoc : vegetable products. In Gilland, S. E. (ed.). **Bacterial Starter Cultures for Foods**. Boca Raton, Florida : CRC press.
- Fonseca, F., Béal, C. and Corrieu, G. 2001. "Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage." **Cryobiology**. 43 : 189-198.
- Font de Valdez, G., de Giori, G., de Ruiz Holgado, A. P. and Oliver, G. 1983. "Protective effect of adonitol on lactic acid bacteria subjected to freeze-drying." **Journal of Applied Bacteriology**. 66 : 365-378.
- Fonseca, A. H., Crowe. J. H., Nguyen, K. H. N. and Crowe, L. M. 1996. "Is vitrification involved in depression of the phase transition temperature in dry phospholipids." **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 1280 : 187-196.
- Fuller, R. 1989. "Probiotic in manozen an animals." **Journal of Applied Bacteriology**. 66 : 365-378.
- Fuller, R. 1992. **Probiotic-The Scientific Basis**. London : Champman and Hall.
- Galinski, E. A. and Trüper, H. G. 1994. "Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems." **FEMS Microbiology Review**. 15 : 95-108.
- Gibson, C. A., Landerkin, G. B., Morse. P. M. 1966 "Effect of additives on survival of lactic streptococci in frozen storage." **Applied Microbiology**. 14 : 665-669.
- Gelman, A., Drabkin, V. and Glatman, L. 2001. "Evaluation of lactic acid bacteria isolated from a lightly preserved fish products as starter culture for new fish-based food product." **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. 1 : 219-226.
- German, B., Schifffrin, E. J., Reniero, R., Mollet, B., Pfeiffer, A. and Neeser, J. R. 1999. "The development of functional food :Lessons from the gut." **TIBTECH**. 17 : 492-499.
- Ghalfi, H., Allaoui, A., Destain, J., Benkerroum, N. and Thonart, P. 2006. "Bacteriocin activity by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4 °C storage." **Journal of Food Protection**. 5 : 1066-1071.
- Gilland, S. E., Staley, T. E. and Bush, L. J. 1984. "Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct." **Journal of Dairy Science**. 67 : 3045-3051.

- Gilland, S. E. 1985. **Lactic Acid Bacteria as Starter Cultures for Foods**. Boca Raton, Florida : CRC Press.
- Gilland, S. E. and Speck, M. L. 1977. "Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food-borne pathogenic in associative cultures." **Journal of Food Protection**. 40 : 820-823.
- Glaasker, E., Konings, W. N. *et al.* 1996. "Glycine betaine fluxes in *Lactobacillus plantarum* during osmotic stress and hyper-osmotic and hypo-osmotic shock." **Journal of Biological Chemistry**. 27 : 10060-10065.
- Gölker, C. 1993. Final recovery steps: Lyophilisation, spray-drying. In Rehm, H. J., Reed, G. And Reed, G. and Stephanopoulos, G. (eds.). **Biotechnology**. 2nd Germany : VCH 3. Weinheim.
- Gomes, A. M., Malcata, F. X. and Klaver, F. A. 1998. "Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by milk hydrolyzates." **Journal of Dairy Science**. 81 : 2817-2825.
- Gram, L. and Huss, H. H. 1996. "Microbiological spoilage of fish and fish products." **International Journal of Food Microbiology**. 33 : 121-137.
- Gram, L., Trolle, G. and Huss, H. H. 1987. "Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0 °C) and high (20 °C) temperatures." **International Journal of Food Microbiology**. 4 : 65-72.
- Gram, L., Oundo, J. and Bon, J. 1989. "Storage life of Nile perch (*Lates niloticus*) dependent on storage temperature and initial bacterial load." **Tropical Science**. 29 : 221-236.
- Gram, L., Wedell-Neergaard, C. and Huss, H. H. 1990. "The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*)." **International Journal of Food Microbiology**. 10 : 303-316.
- Graumann, P., Wendrich, T. M., Weber, M. H., Schroder, K. and Marahiel, M. A. 1997. "A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures." **Molecular Microbiology**. 25 : 741-756.
- Gross, M. 1999. "La parade cellulaire aux variation thermiques." **La Recherche**. 317: 82-86.
- Haenel, H. and Bendig, J. 1975. "Intestinal flora in health and disease." **World Food Programme Journal**. 1 : 21-64.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Hamdan, I. Y. and Mikolajoik, E. N. 1975. "Acidolin: an antibiotic produced by *Lactobacillus acidophilus*." **Journal of Antibiotics**. 27 (8) : 631-636.
- Hebard, C. E., Flick, G. J. J. and Martin, R. E. 1982. Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shellfish. In Hebard C. E. (ed.). **Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products**. Westport, Connecticut : AVI Publishing.
- Helander, I. M., von Wright, A. and Mattila-Sandholm, T. M. 1997. "Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria." **Trends in Food Science and Technology**. 8 :146-150.
- Hirsch, A. 1951. "Growth and nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*." **Journal of General Microbiology**. 5 : 208-221.
- Honer, C. 1995. Culture shift. In **Dairy Field**. 178 : 54-58.
- Hubálek, Z. 2003. "Protectant used in the cryopreservation of microorganisms." **Cryobiology**. 46 : 205-299.
- Huss, H. H. and Larsen, A. 1979. The post-mortem changes in the oxidation-reduction potential (Eh) of fish muscle and internal organs. In Sobolenska-Ceronik, K., Ceronik, E. and Zaleski, S. (eds.). **Food as Ecological Environment for Pathogenic and Index Microorganisms**. Warsaw, Poland : Ars Polona.
- Hutkins, R. W., Ellefson, W. L. *et al.* 1987. "Betaine transport imparts osmotolerance on a strain of *Lactobacillus acidophilus*." **Applied and Environmental Microbiology**. 53 : 2275-2281.
- Ishibashi, N. and Shimamura, S. 1993. "Bifidobacteria: research and development in Japan." **Food Technology**. pp. 126-135.
- Ingraham, J. L. and Marr, A. G. 1996. Effect of temperature, pressure, pH and osmotic stress on growth. In Neidhardt, F. C. (ed.). **Escherichia coli and Salmonella : Cellular and Molecular Biology**. Washington, DC : ASM Press.
- Ivanova, L. and Dzhevizov, S. 1985. "Some aspects of freeze-drying preservation of bacterial strain used as starters in manufacture of meat product." **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**. 18 (8) : 155-159.

- Jeppesen, V. F. and Huss, H. H. 1993. "Characteristics and antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from chilled fish product." **International Journal of Food Microbiology**. 18 : 305-320.
- Johannsen, E., 1972. "Malt extract as protective medium for lactic acid bacteria in cryopreservation." **The Journal of Applied Bacteriology**. 35 : 423-429.
- Johnson, J. A. C. and Etzel, M. R. 1993. Inactivation of lactic acid bacteria during spray drying. In Barbosa-Canovas, G. V. and Okos, M. R. (eds.). **Food Dehydration**. AECHE symposium series.
- Juneja, V. K. and Novak, J. S. 2003. Adaptation of foodborne pathogens to stress from exposure to physical intervention strategies. In Yousef, A. E. and Juneja, V. K. (eds.). **Microbial Stress Adaptation and Food Safety**. Florida : Boca Raton, CRC Press.
- Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Genus *Lactobacillus*. In Sneath Mair, P. H. A., Sharpe, N. S. and Holt, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore : Williams & Wikins.
- Kashket, E. R. 1987. "Bioenergetic of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance." **FEMS Microbiology Review**. 46 : 233-244.
- Kearney, L., Upton, M. and Mclonghlin, A. 1990. "Meat fermentation with immobilized lactic acid bacteria." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 33 (6) : 648-651.
- Keith, S. C. 1913. "Factors influencing the survival of bacteria at temperatures in vicinity of freezing point of water." **Science**. 37 : 877-879.
- Kets, E. P. W. and de Bont, J. A. M. 1994. "Protective effect of betaine on survival of *Lactobacillus plantarum* subjected to drying." **FEMS Microbiology Letter**. 116 : 251-256.
- Kilara, A., Shahani, K. M. and Das, N. K. 1977. "Effect of cryoprotective agents on freeze-drying and storage of lactic cultures." **Dairy Science Abstracts**. 39 : 2628.
- Kim, W. S. and Dunn, N. W. 1997. "Identification of cold shock gene in lactic acid bacteria and effect of cold shock on cryotolerance." **Current Microbiology**. 35 : 59-63.
- Kim, W. S., Khunajakr, N. and Dunn, N. W. 1998. "Effect of cold shock on protein synthesis and on cryotolerance of cell frozen for long periods in *Lactococcus lactis*." **Cryobiology**. 37 : 86-91.

- Kim, W. S., Ren, J. and Dunn, N. W. 1999. "Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and *cremoris* strains by their adaptive response to stresses." **FEMS Microbiology Letter**. 171 : 57-65.
- Kono, S., Kuwano, K. and Saga, N. 1998. "Cryopreservation of *Eisenia bicyclis* (Laminariales, Phaeophyta) in liquid nitrogen." **The Journal of Marine Biotechnology**. 6 : 220-223.
- Kurmann, J. A. 1988. Starters for fermented milks. In **Fermented Milks-Science and Technology**. Brussels : IDF Bulletin.
- Lee, K. 2004. "Cold Shock response in *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis*: a comparison of the protection generated by brief pre-treatment at less severe temperature." **Process Biochemistry**. 39 : 2233-2239.
- Leslie, S. B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J. H. and Crowe, L. M. 1995. "Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying." **Applied and Environmental Microbiology**. 61 (10) : 3592-3597.
- Lilly, G. and Stillwell, S. L. 1965. "Lactic acid bacteria and human health." **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. 22 : 37-41
- Linders, L. J. M., de Jong, G. I. W., Meerdink, G. and van't Riet, K. 1997. "Carbohydrates and the dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*: the role of moisture distribution and water activity." **Journal of Food Engineering**. 31 : 237-250.
- Liener, I. E. 1978. Nutritional value of food protein products. In Smith, A. K. and Circle, S. J. (eds.). Proteins. 2nd **Soybeans Chemistry and Technology**. Westport : AVI Publishers.
- Lotong, N., Sunthornandh, P., Daengsubha, W. and Utarapichat, O. 1987. "Microbial quality and safety of the traditional fermented pork II. Selection of salmonella-inhibiting lactic acid bacteria for nham fermentation annual report." **Thailand ASEAN Technology Research and Development Project**.
- Lou, Y. and Yousef, A. E. 1996. "Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environment stresses." **Journal of Food Protection**. 59 : 465-471.
- Lovelock, J. E. 1954. "The protective action of neutral solute against hemolysis by freezing and thawing." **Biochemical Journal**. 56 : 265-270.
- Luyet, B. 1969. "On the amount of water remaining amorphous in frozen aqueous solution." **Biodynamica**. 10 : 277-291.

- Lyhs, U., Koort, J. M. K., Lundström, H-S. and Björkroth, K. J. 2004. "*Leuconostoc gelidum* and *Leuconostoc gasicomitatum* strains dominated the lactic acid bacterium population associated with strong slime formation in an acetic-acid herring preserve." **International Journal of Food Microbiology**. 90 : 207-218.
- Mäyrä-Mäkinen, A. and Bigret, M. 1998. Industrial use and production of lactic acid bacteria. In Salminen, S. and von Wright, A. (eds.). **Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects**. New York : Marcel Dekker.
- Marteau, P., Gerhardt, M. F., Myara, A., Bouvier, E., Trivin, F. and Rambaud, J. C. 1995. "Metabolism of bile salts by alimentary bacteria during transit in human small intestine." **Microbial Ecology**. 8 : 151-157.
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R. and Saarela, M. 2002. "Technological challenges for future probiotic foods." **International Dairy Journal**. 12 : 173-182.
- Meryman, H. T. 1968. The minimum cell volume modes of freezing injury. In **Nature and International Institute of Refrigeration (IIR) (Comm.X)**. Washington, DC.
- Mignard, S. and Flandrois, J. P. "16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment." **Journal of Microbiological Methods**. 67 : 574-581.
- Miyajima, K. 1997. "Role of saccharides for the freeze-thawing and freeze-drying of liposomes." **Advanced Drug Delivery Reviews**. 24 :151-159.
- Mogensen, G. and Friis. M. 1997. "*Lactobacillus casei* 431-A strategic probiotic strain." **The World of Ingredients**. 1 : 41-42.
- Muir, D. D. 1992. Milk chemistry and nutritive In Early, R. (ed.). **The Technology of Dairy Products**. Newyork : VCH Publisher.
- Nambudiry, D. D. 1986. "Mixed culture fermentation as predominant biological phenomenon in the production of fermented fish products." **Proceeding of the Symposium on Coastal Agriculture**. 6 : 1474.
- Naghmouh, M. R., Girguis, E. S., Guirguj A. H. and Fahmi, A. H. 1979. "Effect of storage on behaviour of some freeze-dried lactic acid culture." **Dairy Science Abstracts**. 41 : 1513.
- Nash, T., Postgate, J. R. and Hunter. J. R. 1963. "Similar effects of various neutral solutes on survival of *Aerobacter aerogenes* and of red blood cells a after freezing and thawing." **Nature Cell Biology**. 199 : 1113.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Nickerson, T. A. 1970. Lactose. In Webb, B. H. and Whittier, E. O. (eds.). **By Products From Milk**. Wesport, CT : AVI Publishing Company.
- Niinivaara, F. P., Pohja, M. S. and Komulainen, S. E. 1964. "Some aspects about using bacteria pure cultures in the manufacture of fermented sausages." **Food Technology**. 18 :147-153.
- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K. and Panyim, S. 2003. "Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from *nham*, a traditional Thai fermented sausage." **International Journal of Food Microbiology**. 81 : 137-145.
- Oberman, H. and Libudzisz, Z. 1998. Fermented milks. In Wood, B. J. B. (ed.). **Microbiology of Fermented Foods**. London : Blackie Academic and Professional.
- Oetjen, G-W. and Haseley, P. 2004. **Freeze-drying**. Federal Republic, Germany : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Orla-Jensen, S. 1919. "The lactic acid bacteria. Cited by : Stiles, M. E. and Hozapfel, W. H. Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy." **International Journal of Food Microbiology**. 36 : 1-29.
- Palmfeldt, J., Rådström, P. and Hahn-Hägerdal, B. 2003. "Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*." **Cryobiology**. 47 : 21-29.
- Paludan-Müller, C., Madsen, M., Sophanodora, P., Gram, L. and Møller, P. L. 2002. "Fermentation and microflora of plaasom a Thai fermented fish product prepared with different salt concentrations." **International Journal of Food Microbiology**. 73 : 61-70.
- Panoff, J-M., Thammavongs, B., Guéguen, M. and Boutibonnes, P. 1998. "Cold stress responses in mesophilic bacteria." **Cryobiology**. 36 : 75-83.
- Panoff, J-M., Corroler, D. and Thammavongs, B. 1997. "Differentiation between cold shock proteins and cold acclimation proteins in mesophilic gram-positive bacterium. *Enterococcus faecalis* JH2-2." **Journal of Bacteriology**. 179 (13) : 4451-4454.
- Panoff, J-M., Legrand, S., Thammavongs, B. and Boutibonnes, P. 1994. "The cold shock response in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*." **Current Microbiology**. 29 : 231-216.
- Panoff, J-M., Thammavongs, B. and Guéguen, M. 2000. "Cryoprotectants lead to phenotypic adaptation to freeze-thaw stress in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CIP 101027T." **Cryobiology**. 40 : 264-269.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Kotzekidou, P. 2003. "Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties." **Meat Science**. 65 : 859-867.
- Peppler, H. J. and Perlman, D. 1979. Lactic starter culture concentrates. **Microbial Technology**. New York : Academic Press.
- Porubcan, R. S. and Sellars, R. L. 1979. Lactic starter culture concentrates. In Peppler, H. J. and Perlman, D. (eds.). **Microbial Technology**. New York : Academic Press.
- Pongsak, R. and Parichat, P. 2000. "A bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* isolated from Thai fermented foods." **ScienceAsia**. 26 : 195-200.
- Poolman, B. and Driessen, A. J. *et al.* 1987. "Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*." **Journal of Bacteriology**. 169 (12) : 604-5597.
- Ray, B. 1996. **Fundamental Food Microbiology**. New York : CRC Press.
- Ray, B. and Speck, M. L. 1973. **Critical Review of Clinical Laboratory Science**. 4 : 161-213
- Reddy, G. V. and Shahani, K. M. 1971. "Isolation of antimicrobiotic from *Lactobacillus bulgaricus*." **Journal of Dairy Science**. 34 (1) : 748.
- Riedel, L. 1972. Enthalpy-water content dia-gram for lean beef (also valid for other meats with fat content below 4%). In **Recommendations for The Processing and Handling of Frozen Foods**. 2nd International Institute of Refrigeration (IIR). Paris.
- Ringø, E. and Gatesoupe, F-J. 1998. "Lactic acid bacteria in fish: a review." **Aquaculture**. 160 : 177-203.
- Ringø, E. 1993. "Does chromic oxide (Cr₂O₃) affect faecal lipid and intestinal bacterial flora in arctic charr, *salvelinus alpinus*." **Aquaculture and Fisheries Management**. 24 : 767-776.
- Robinson, R. K., Batt, C. A. and Patel, P. H. 2002. **Encyclopedia of Food Microbiology**. San Diego : Academic Press. 3 : 1570-1591.
- Russell, N. J. 1997. "Psychrophilic bacteria molecular adaptations of membrane lipids." **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part A: Physiology. 118 : 489-493.
- Russell, N. J., Evans, R. I., Ter Steeg, P. F. Hellemons, J., Verheul A. and Abee, T. 1995. "Membranes as a target for stress adaptation." **International Journal of Food Microbiology**. 28 : 255- 261.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Russell, N. J. 1990. **Cold adaptation of microorganisms**. London : Phil. Trans. R. Soc.
- Sander, J. W., Venema, G. *et al.* 1999. "Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*." **FEMS Microbial Review**. 23 : 483-501.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mätto, J. and Mattila-Sandholm, T. 2000. "Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties." **Journal of Biotechnology**. 84 : 197-215.
- Shama, N. and Gandhi, D. N. 1982. "Preparation of acidophilin I selection of the starter culture." **Dairy Science Abstracts**. 44 (1) : 56.
- Sian, N. K. and Ishak, S. 1990. "Effect of pH on yield, chemical composition and boiling resistance of soybean protein-lipid film." **Cereal Food World**. 35 : 748-752.
- Smittle, R. B., Gilliland, S. E., Speck, M. L. and Walter, W. M. J. 1974. "Relationship of cellular fatty acid composition to survival of *Lactobacillus bulgicus* in liquid nitrogen." **Applied Microbiology**. 27 : 738-743.
- Sobrinho, O. J., Rodriguez, J. M., Moreira, W. L., Fernandez, M. F., Sanz, B. and Hernandez, P. E. 1991. "Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages." **International Journal of Food Microbiology**. 13 : 1-10.
- Souzu, H. 1992. Freeze-drying of microorganisms. In Lederberg, J. (ed.). **Encyclopedia of Microbiology**. San Diego : Academic Press.
- Speck, M. L., Cowman, R. A. 1970. Preservation of Lactic Streptococci at low temperatures. In Iizuka, H. and Hasegawa, T. (eds.). **Culture Collections of Microorganisms**. Tokyo : University. Press.
- Strachan, T. 1992. **The human genome**. Oxford : Bios Scientific Publisher. p. 160.
- Suma, K., Misra, M. and Varadaraj, M. 1998. "Plantacin LP84 a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium." **International Journal of Food Micrology**. 40 : 17-25.
- Svensson, U. 1999. Industrial perspectives. In Tannock, G. W. (ed.). **Probiotics: A Critical Review**. Wymondham : Horizon Scientific Press.
- Takano, M., Sado, J. I., Ogawa, T. and Terui, G. 1973 "Freezing and freeze-drying of *Spirulina platensis*." **Cryobiology**. 10 : 440-444.

- Tanaka, N., Traisman, E., Lee, M. H. I., Cassens, R. G. and Foster, E. M. 1980. "Inhibition of botulinum toxin formation in bacon by acid development." **Journal of Food Protection.** 43 : 450-452.
- Thapa, N., Pal, J. and Tamang, J. P. 2006. "Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of Eastern Himalayas." **International Journal of Food Microbiology.** 107 : 33-38.
- Tichaczek, P. S., Pohle, S. B., Vogel, R. F. and Hammes, W. P. 1995 "Dry sausages fermented with bacteriocin producers." **Trend in Food Science & Technology.** 6 (9) : 317.
- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E. and Salminen, S. 2001. "Quality assurance criteria for probiotic bacteria." **American Journal of Clinical Nutrition.** 73 : 393-398.
- Uguen, P. Hamelin, J. *et al.* 1999. "Influence of osmolarity and the presence of an osmoprotectant on *Lactococcus lactis* growth and bacteriocin production." **Applied and Environmental Microbiology.** 65 : 291- 293.
- Urraza, P. D. and Antoni, G. D. 1997. "Induced cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBB preincubation at suboptimal temperatures with a fermentable sugar." **Cryobiology.** 35 : 159-164.
- Vandamme, P., Plot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. and Swing, J. 1996. "Polyphasic taxonomy a consensus approach to bacterial systematics." **Microbiology Review.** 60 : 407-438.
- Vandenbergh, P. A. 1993. "Lactic acid bacteria their metabolic products and interference with microbial growth." **FEMS Microbial Review.** 12 : 37-221.
- van der Heide, T. and Poolman, B. 2000. "Glycine betaine transport in *Lactococcus lactis* is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity." **Journal of Bacteriology.** 182 : 203-206.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F. and Debevere, J. 2004. "Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products." **International Journal of Food Microbiology.** 96 : 149-164.
- Vinderola, C. G. and Reinheimer, J. A. 2003. "Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological barrier resistance." **Food Research International.** 36 : 895-504.

- Vincent, J. G., Robert, C. V. and Richard, F. R. 1957. "Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*." **Journal of Bacteriology**. 78 : 477-484.
- Walderhaug, M. O., Dosch, D. C. and Epstein, W. 1987. Potassium transport in bacteria. In Rosen B. P. and Silver, S. (eds.). **Ion Transport in Prokaryotes**. San Diego : Academic Press.
- Wang, Y., Corrieu, G. and Béal, C. 2005. "Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758." **Journal of Dairy Science**. 88 : 21-19.
- Wang, G. and Doyle, M. 1998. "Survival of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water." **Journal of Food Protection**. 61 (60) : 662-667.
- Wenrong, G. and Griffiths, M. W. 2000. "Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads." **Journal of Food Microbiology**. 61 : 17-25.
- Wisselink, H. W., Weusthuis, R. A., Eggink, G., Hugenholtz, J. and Grobbee, G. J. 2002. "Mannitol production by lactic acid bacteria: A review." **International Dairy Journal**. 12 : 156-161.
- Wouters, J. A., Mailhes, M., Rombouts, F. M., De Vos, W. M., Kuipers, O. P. and Abee, T. 2000. "Physiological and regulatory effects of *Lactococcus lactis* MG1363." **Applied and Environmental Microbiology**. 66 : 3756-3763.
- Wouters, J. A., Rombouts, F. M., De Vos, W. M., Kuipers, O. P. and Abee, T. 1999. "Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302." **Applied and Environmental Microbiology**. 65 : 4436-4442.
- Yancey, P. H., Clark, M. F., Hand, S. C., Bowlus, R. D. and Somero, G. N. 1982. "Living water stress evolution of osmolyte systems." **Science**. 217 : 1214-1227.
- Yoo, B. and Lee, C. M. 1993. "Thermoprotective effect of sorbitol on proteins during dehydration." **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 41 : 190-192.
- Yoon, H. D., Lee, D. S., Ji, C. I. and Suh, S. B. 1997. "Studies on the utilization of wastes from fish processing characteristic of lactic acid bacteria for preparing skipjack tuna viscera silage." **Journal of the Korean Fish Society**. 30 : 1-7.

- Yousef, A. E. and Courtney, P. D. 2003. Basics of stress adaptation and implication in new-generation food. In Yousef, A. E. and Juneja, V. K. (eds.). **Microbial Stress Adaptation and Food Safety**. Florida : CRC Press. Boca Raton.
- Zavaglia, G. A., Disalvo, A. E. and De antoni, L. G. 2000. "Fatty acid composition and freeze-thaw resistance in lactobacilli." **Journal of Dairy Research**. 67 : 241-247.
- Zeidler, G., Pasin, G. and King, A. 1994. Removing cholesterol from liquid egg yolk by carbon dioxide-supercritical. In Sim, J. S. and Nakai, S. (eds.). **Egg Uses and Processing Technologies New Development**. Guidford : Biddiles.



ภาคผนวก ก

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 สูตรอาหาร BSM (Bacteriocin Screening Medium) (Fleming และคณะ. 1985)

มีดังนี้

กลูโคส	2.0	กรัม
เนื้อสกัด	2.0	กรัม
ทรีปโตน	10.0	กรัม
ยีสต์สกัด	4.0	กรัม
K_2HPO_4	8.7	กรัม
KH_2PO_4	8.0	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.05	กรัม
Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
Citric acid diammonium salt	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอช 6.8-7.0 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 สูตรอาหาร Tryptic Soy Yeast Extract Soft Agar (TSYE Soft Agar)

Tryptic soy broth	1,000	มิลลิลิตร
ยีสต์สกัด	6	กรัม
ผงวุ้น	10	กรัม

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 Luria-Bertani Agar (LB Agar)

Bacto tryptone	10	กรัม
ยีสต์สกัด	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.4 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์

ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สารละลายทำเจือจาง

2.1 การเตรียมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 5 โมลาร์

ละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 37 ปริมาตร 414.49 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วทำให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2.2 การเตรียมสารป้องกันเซลล์

- หางนมกั้นรูปความเข้มข้นร้อยละ 9.1 น้ำหนักโดยน้ำหนัก โดยการชั่งหางนมผง 10 กรัม และละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- ไข่แดงความเข้มข้นร้อยละ 9.1 น้ำหนักโดยน้ำหนัก โดยการเปิดไข่แดงปริมาตร 10 มิลลิลิตร และละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- สารละลายซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 9.1 น้ำหนักโดยน้ำหนัก โดยการชั่งซูโครส 10 กรัม และละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- สารละลายแลคโตสความเข้มข้นร้อยละ 9.1 น้ำหนักโดยน้ำหนัก โดยการชั่งแลคโตส 10 กรัม และละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- สารละลายกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 9.1 น้ำหนักโดยน้ำหนัก โดยการชั่งกลูโคส 10 กรัม และละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- สารละลายทรีฮาโลสความเข้มข้นร้อยละ 9.1 น้ำหนักโดยน้ำหนัก โดยการชั่งทรีฮาโลส 10 กรัม และละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- สารละลายซอร์บิทอลความเข้มข้นร้อยละ 9.1 น้ำหนักโดยน้ำหนัก โดยการชั่งซอร์บิทอล 10 กรัม และละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.3 การเตรียมสูตรสารป้องกันผสม

- สูตรที่ 1 เตรียมโดย ชั่งแลคโตส 1 กรัม ซูโครส 1 กรัม ทรีฮาโลส 1 กรัม และละลายด้วยนมถั่วเหลืองปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- สูตรที่ 2 เตรียมโดย ชั่งแลคโตส 5 กรัม ซูโครส 5 กรัม ทรีฮาโลส 5 กรัม และละลายด้วยนมถั่วเหลืองปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- สูตรที่ 3 เตรียมโดย ชั่งแลคโตส 1 กรัม ซูโครส 1 กรัม ทรีฮาโลส 1 กรัม ซอร์บิทอล 1 กรัม และละลายด้วยนมถั่วเหลืองปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- สูตรที่ 4 เตรียมโดย ชั่งหางนมผง 11 กรัม แลคโตส 1 กรัม ซูโครส 1 กรัม ทรีฮาโลส 1 กรัม ละลายด้วยนมถั่วเหลืองปริมาตร 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

- สูตรที่ 5 เตรียมโดย ชั่งหางนมผง 11 กรัม แลคโตส 5 กรัม ซูโครส 5 กรัม ทรีฮาโลส 5 กรัม ละลายด้วยนมถั่วเหลืองปริมาตร 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
- สูตรที่ 6 เตรียมโดย ชั่งหางนมผง 11 กรัม แลคโตส 1 กรัม ซูโครส 1 กรัม ทรีฮาโลส 1 กรัม ซอร์บิทอล 1 กรัม ละลายด้วยนมถั่วเหลืองปริมาตร 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
- สูตรที่ 7 เตรียมโดย ชั่งหางนมผง 11 กรัม แลคโตส 1 กรัม ซูโครส 1 กรัม ทรีฮาโลส 1 กรัม และละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- สูตรที่ 8 เตรียมโดย ชั่งหางนมผง 11 กรัม แลคโตส 5 กรัม ซูโครส 5 กรัม ทรีฮาโลส 5 กรัม และละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- สูตรที่ 9 เตรียมโดย ชั่งหางนมผง 11 กรัม แลคโตส 1 กรัม ซูโครส 1 กรัม ทรีฮาโลส 1 กรัม ซอร์บิทอล 1 กรัม และละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร



ภาคผนวก ข

1. การคำนวณโคโลนีต่อมิลลิลิตร

$$\text{โคโลนีต่อมิลลิลิตร} = \frac{C}{V \times (n_1 + (0.1 \times n_2)) \times d}$$

C = ผลรวมของโคโลนีที่นับได้ทุกจาน

V = ปริมาณของตัวอย่างที่เติมลงไปในแต่ละจาน

n_1 = จำนวนของจานที่นับได้ที่ระดับความเจือจางต่ำ

n_2 = จำนวนของจานที่นับได้ที่ระดับความเจือจางสูง

d = ระดับความเจือจางต่ำที่นับโคโลนีได้

2. การคำนวณการอยู่รอดของกล้าเชื้อผงหลังการแช่แข็งแห้งในสารป้องกันเซลล์ต่อกรัม

สารแขวนลอยเชื้อ 1 มิลลิลิตร มีเชื้อ	A	โคโลนี
สารแขวนลอยเชื้อ 10+B มิลลิลิตร มีเชื้อ	$A \times (10+B)$	โคโลนี
ดังนั้น สารแขวนลอย 10.04 กรัม มีเชื้อ	$A \times (10+B)$	โคโลนี
ถ้ากล้าเชื้อผง 1 กรัม มีเชื้อ	$A \times (10+B)$	โคโลนี
	10.04	

จำนวนโคโลนีโดย (เฉลี่ย) ต่อมิลลิลิตร = A

หนักแห้งของเชื้อ (กรัม) = B

น้ำหนักสารละลายเปปโตน 10 มิลลิลิตร = 10.04 กรัม

3. การคำนวณร้อยละของการอยู่รอดหลังการแช่แข็งแห้ง

$$\text{ร้อยละของการอยู่รอดของเชื้อหลังแช่แข็งแห้ง} = \frac{E \times 100}{D}$$

ค่า log ของการจำนวนเชื้อก่อนแช่แข็งแห้ง (กรัม) = D

ค่า log ของการจำนวนเชื้อหลังการแช่แข็งแห้ง (กรัม) = E

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ค.1 การทนต่อกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งจำนวน 30 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ค่าพีเอชในอาหารเหลว MRS ที่ปรับค่าพีเอชด้วยกรดแลคติก							
	6.30	5.30	4.00	3.70	3.35	3.20	2.90	2.70
2IS1	+	+	+	-	-	-	-	-
3IS3	+	+	+	+	-	-	-	-
3IS4	+	+	+	-	-	-	-	-
3IS6	+	+	+	+	-	-	-	-
3IS7	+	+	+	-	-	-	-	-
4IS1	+	+	+	-	-	-	-	-
4IS3	+	+	+	+	-	-	-	-
4IS5	+	+	+	+	-	-	-	-
4IS6	+	+	+	-	-	-	-	-
4IS8	+	+	+	+	-	-	-	-
5IS2	+	+	+	-	-	-	-	-
5IS4	+	+	+	-	-	-	-	-
5IS8	+	+	+	+	-	-	-	-
5IS9	+	+	+	+	-	-	-	-
9IS1	+	+	+	+	-	-	-	-
9IS2	+	+	+	-	-	-	-	-
9IS3	+	+	+	+	-	-	-	-
9IS5	+	+	+	+	+	+	-	-
9IS7	+	+	+	+	-	-	-	-
9IS8	+	+	+	+	+	-	-	-
13IS2	+	+	+	+	+	-	-	-
13IS3	+	+	+	+	+	+	-	-
13IS4	+	+	+	+	+	+	+	-
13IS5	+	+	+	+	+	-	-	-
14IS3	+	+	+	+	+	-	-	-
14IS4	+	+	+	+	+	-	-	-
14IS7	+	+	+	+	+	-	-	-
14IS8	+	+	+	+	+	-	-	-
14IS9	+	+	+	+	+	+	+	-
14IS12	+	+	+	+	-	-	-	-

หมายเหตุ + สามารถทนต่อกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS ได้
- ไม่สามารถทนต่อกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS ได้

ตารางที่ ค.2 การทนต่อกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งจำนวน 30 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ค่าพีเอชในอาหารเหลว MRS ที่ปรับค่าพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริก							
	6.3	5.0	3.7	3.0	2.6	2.20	2.00	1.90
2IS1	+	+	+	-	-	-	-	-
3IS3	+	+	+	-	-	-	-	-
3IS4	+	+	+	-	-	-	-	-
3IS6	+	+	+	+	-	-	-	-
3IS7	+	+	+	-	-	-	-	-
4IS1	+	+	+	-	-	-	-	-
4IS3	+	+	+	+	-	-	-	-
4IS5	+	+	+	+	-	-	-	-
4IS6	+	+	+	+	+	-	-	-
4IS8	+	+	+	+	-	-	-	-
5IS2	+	+	+	+	+	-	-	-
5IS4	+	+	+	+	-	-	-	-
5IS8	+	+	+	+	+	-	-	-
5IS9	+	+	+	+	-	-	-	-
9IS1	+	+	+	+	-	-	-	-
9IS2	+	+	+	-	-	-	-	-
9IS3	+	+	+	-	-	-	-	-
9IS5	+	+	+	-	+	-	-	-
9IS7	+	+	+	+	+	-	-	-
9IS8	+	+	+	+	+	-	-	-
13IS2	+	+	+	+	+	+	-	-
13IS3	+	+	+	+	+	+	-	-
13IS4	+	+	+	+	+	+	-	-
13IS5	+	+	+	+	+	-	-	-
14IS3	+	+	+	+	+	-	-	-
14IS4	+	+	+	+	+	-	-	-
14IS7	+	+	+	+	+	-	-	-
14IS8	+	+	+	+	+	-	-	-
14IS9	+	+	+	+	+	-	-	-
14IS12	+	+	+	+	+	-	-	-

หมายเหตุ + สามารถทนต่อกรดไฮโดรคลอริกในอาหารเหลว MRS ได้

- ไม่สามารถทนต่อกรดไฮโดรคลอริกในอาหารเหลว MRS ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3 การทนต่อเกลือน้ำเค็มของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารยับยั้งจำนวน 30 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ความเข้มข้นน้ำเค็มเกลือในอาหารเหลว MRS (ร้อยละ)							
	0	0.75	1.50	2.25	3.00	3.75	4.50	5.25
2IS1	+	+	+	+	+	+	+	+
3IS3	+	+	+	-	-	-	-	-
3IS4	+	+	+	+	+	+	+	+
3IS6	+	+	+	+	-	-	-	-
3IS7	+	+	+	+	+	+	+	+
4IS1	+	+	+	+	+	+	+	+
4IS3	+	+	+	+	+	+	+	+
4IS5	+	+	+	+	+	+	+	+
4IS6	+	+	+	+	+	+	+	+
4IS8	+	+	+	+	+	+	+	+
5IS2	+	+	+	+	+	+	+	+
5IS4	+	+	+	+	+	+	+	+
5IS8	+	+	+	+	+	+	+	+
5IS9	+	+	+	+	+	+	+	+
9IS1	+	+	+	+	+	+	+	+
9IS2	+	+	+	+	+	+	+	+
9IS3	+	+	+	+	+	+	+	+
9IS5	+	+	+	+	+	+	+	+
9IS7	+	+	+	+	+	+	+	+
9IS8	+	+	+	+	+	+	+	+
13IS2	+	+	+	+	+	+	+	+
13IS3	+	+	+	+	+	+	+	+
13IS4	+	+	+	+	+	+	+	+
13IS5	+	+	+	+	+	+	+	+
14IS3	+	+	+	+	+	+	+	+
14IS4	+	+	+	+	+	+	+	+
14IS7	+	+	+	+	+	-	-	-
14IS8	+	+	+	+	+	+	+	+
14IS9	+	+	+	+	+	+	+	+
14IS12	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + สามารถทนต่อน้ำเค็มเกลือในอาหารเหลว MRS ได้

- ไม่สามารถทนต่อน้ำเค็มเกลือในอาหารเหลว MRS ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.4 การทนต่อโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งจำนวน 30 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเหลว MRS (ร้อยละ)							
	0	1.50	3.00	4.50	6.00	7.50	9.00	10.05
2IS1	+	+	+	+	+	-	-	-
3IS3	+	+	+	+	+	-	-	-
3IS4	+	+	+	+	+	-	-	-
3IS6	+	+	+	+	+	-	-	-
3IS7	+	+	+	+	+	+	-	-
4IS1	+	+	+	+	+	+	-	-
4IS3	+	+	+	+	+	-	-	-
4IS5	+	+	+	+	+	+	-	-
4IS6	+	+	+	+	+	+	-	-
4IS8	+	+	+	+	+	-	-	-
5IS2	+	+	+	+	+	-	-	-
5IS4	+	+	+	+	+	+	+	-
5IS8	+	+	+	+	+	-	-	-
5IS9	+	+	+	+	+	-	-	-
9IS1	+	+	+	+	+	-	-	-
9IS2	+	+	+	+	-	-	-	-
9IS3	+	+	+	+	+	+	-	-
9IS5	+	+	+	+	+	+	-	-
9IS7	+	+	+	+	+	+	-	-
9IS8	+	+	+	+	+	-	-	-
13IS2	+	+	+	+	-	-	-	-
13IS3	+	+	+	+	+	-	-	-
13IS4	+	+	+	+	+	-	-	-
13IS5	+	+	+	+	+	-	-	-
14IS3	+	+	+	+	+	+	-	-
14IS4	+	+	+	+	+	-	-	-
14IS7	+	+	+	+	+	+	-	-
14IS8	+	+	+	+	+	+	+	-
14IS9	+	+	+	+	+	-	-	-
14IS12	+	+	+	+	+	+	-	-

หมายเหตุ + สามารถทนต่อโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเหลว MRS ได้

- ไม่สามารถทนต่อโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเหลว MRS ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.5 การยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* หลังการแช่แข็งแห้งในสารป้องกันเซลล์ 8 ชนิด ครั้งที่ 1

ตัวอย่าง (ครั้งที่1)	ชนิดของสาร ป้องกันเซลล์	ก่อนแช่แข็งแห้ง		หลังแช่แข็งแห้ง			การยู่รอด (ร้อยละ)
		โคโลนีต่อ มิลลิลิตร (เฉลี่ย)	10g โคโลนี ต่อ มิลลิลิตร	น้ำหนัก เซลล์ (กรัม)	โคโลนี ต่อกรัม (เฉลี่ย)	10g โคโลนีต่อ กรัม	
<i>L. lactis</i>	หางนม	31.66×10^9	10.50	0.121	48.80×10^5	6.690	63.70
	นมถั่วเหลือง	40.00×10^8	9.602	0.085	66.10×10^4	5.82	60.61
	ไข่แดง	55.00×10^9	10.740	0.558	60.27×10^3	4.797	44.67
	แลกโตส	28.50×10^9	10.450	0.108	29.34×10^5	6.470	61.91
	ซูโครส	87.66×10^9	10.940	0.090	69.10×10^5	6.840	62.52
	กลูโคส	230.33×10^9	12.360	0.129	16.59×10^4	5.22	42.23
	ทรีฮาโลส	55.00×10^9	10.740	0.085	10.49×10^5	6.201	56.06
	ซอร์บิทอล	165.50×10^8	10.22	0.104	10.76×10^5	6.032	58.85
<i>L. sakei</i>	หางนม	30.00×10^8	9.477	0.084	12.58×10^5	6.100	64.38
	นมถั่วเหลือง	20.00×10^8	9.301	0.063	79.50×10^5	5.895	63.39
	ไข่แดง	18.85×10^9	10.274	0.322	89.65×10^3	4.952	48.20
	แลกโตส	26.66×10^8	9.426	0.094	26.20×10^4	5.418	57.48
	ซูโครส	30.00×10^7	8.470	0.104	63.75×10^3	4.804	56.72
	กลูโคส	11.33×10^9	10.054	0.147	19.92×10^3	4.299	42.70
	ทรีฮาโลส	56.90×10^8	9.755	0.110	59.76×10^4	5.776	59.09
	ซอร์บิทอล	26.00×10^8	9.415	0.106	94.62×10^3	4.976	54.43

ตารางที่ ค.6 การยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* หลังการแช่แข็งแห้งในสารป้องกันเซลล์ 8 ชนิด ครั้งที่ 2

ตัวอย่าง (ครั้งที่2)	ชนิดของ สารป้องกัน เซลล์	ก่อนแช่แข็งแห้ง		หลังแช่แข็งแห้ง			การอยู่รอด (ร้อยละ)
		โคโลนีต่อ	10g	น้ำหนัก	โคโลนี	10g	
		มิลลิลิตร (เฉลี่ย)	โคโลนี ต่อ มิลลิลิตร	เซลล์ (กรัม)	ต่อกรัม (เฉลี่ย)	โคโลนีต่อ กรัม	
<i>L. lactis</i>	หางนม	40.33×10^9	10.605	0.091	28.22×10^5	6.452	60.82
	นมถั่ว	41.33×10^8	9.616	0.090	7.14×10^5	5.853	60.87
	เห็ด						
	ไข่แดง	55.00×10^9	10.740	0.382	13.94×10^4	5.144	47.90
	แลคโตส	252.50×10^8	10.40	0.081	35.86×10^5	6.550	63.02
	ซูโครส	23.00×10^9	10.360	0.105	-	-	-
	กลูโคส	189×10^9	11.262	0.110	45.80×10^4	5.66	50.26
	ทรีฮาโลส	46.00×10^9	10.662	0.093	40.20×10^4	5.604	52.56
	ซอร์บิทอล	180×10^8	10.25	0.132	19.75×10^5	6.295	61.42
	<i>L. sakei</i>	หางนม	42.30×10^9	10.626	0.142	11.66×10^7	7.059
นมถั่ว		63.33×10^8	9.802	0.080	93.63×10^4	5.971	60.92
เห็ด							
ไข่แดง		11.55×10^9	10.062	0.389	10.96×10^4	5.040	50.09
แลคโตส		79.00×10^7	9.89	0.091	20.58×10^5	5.326	53.72
ซูโครส		50.00×10^6	7.698	0.137	34.5×10^3	4.538	58.95
กลูโคส		66.66×10^6	7.824	0.137	50.00×10^2	3.699	47.28
ทรีฮาโลส		56.90×10^8	9.755	0.100	52.12×10^4	5.717	58.60
ซอร์บิทอล		28.33×10^8	9.452	0.130	30.21×10^4	5.480	57.98

ตารางที่ ค.7 การยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* หลังการแช่แข็งแห้งในสารป้องกันเซลล์ 8 ชนิด ครั้งที่ 3

ตัวอย่าง (ครั้งที่3)	ชนิดของสาร ป้องกันเซลล์	ก่อนแช่แข็งแห้ง		หลังแช่แข็งแห้ง			การอยู่รอด (ร้อยละ)
		โคโลนีต่อ	10g	น้ำหนัก	โคโลนี	10g	
		มิลลิลิตร	โคโลนี	เซลล์	ต่อกรัม	โคโลนี	
		เฉลี่ย	ต่อ	(กรัม)	เฉลี่ย	กรัม	
มิลลิลิตร							
<i>L. lactis</i>	หางนม	40.33×10 ⁹	10.605	0.087	24.10×10 ⁵	6.380	60.16
	นมถั่วเหลือง	41.33×10 ⁸	9.616	0.067	55.10×10 ⁴	5.741	59.70
	ไข่แดง	55.00×10 ⁹	10.740	0.411	19.90×10 ³	4.299	41.13
	แลกโตส	19.52×10 ⁷	9.290	0.065	18.92×10 ⁵	6.276	67.57
	ซูโครส	90.00×10 ⁸	9.78	0.099	65.40×10 ⁴	5.815	59.46
	กลูโคส	19.00×10 ⁷	8.278	0.173	-	-	-
	ทรีฮาโลส	46.00×10 ⁹	10.662	0.081	17.26×10 ⁵	6.237	58.50
	ซอร์บิทอล	180×10 ⁸	10.25	0.132	10.46×10 ⁵	6.201	58.90
<i>L. sakei</i>	หางนม	30.00×10 ⁸	9.477	0.084	12.58×10 ⁵	6.10	64.37
	นมถั่วเหลือง	200×10 ⁷	9.301	0.063	78.69×10 ⁴	5.895	63.39
	ไข่แดง	188.5×10 ⁸	10.278	0.322	89.65×10 ³	4.952	48.20
	แลกโตส	26.66×10 ⁸	9.426	0.094	26.20×10 ⁴	5.418	57.48
	ซูโครส	30.00×10 ⁷	8.470	0.104	63.75×10 ³	4.804	56.72
	กลูโคส	113.30×10 ⁸	10.054	0.147	19.92×10 ³	4.299	42.76
	ทรีฮาโลส	56.90×10 ⁸	9.755	0.110	59.76×10 ⁴	5.776	59.09
	ซอร์บิทอล	26.00×10 ⁸	9.415	0.106	94.62×10 ³	4.976	54.43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.8 การยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* หลังการแช่แข็งแห้งในสารป้องกันผสม 9 สูตร ครั้งที่ 1

ตัวอย่าง (ครั้งที่1)	สารป้องกัน ผสม	ก่อนแช่แข็งแห้ง		หลังแช่แข็งแห้ง			การยู่รอด (ร้อยละ)
		โคโลนีต่อ มิลลิลิตร (เฉลี่ย)	10g โคโลนี ต่อ มิลลิลิตร	น้ำหนัก เซลล์ (กรัม)	โคโลนีต่อ กรัม (เฉลี่ย)	10g โคโลนีต่อ กรัม	
<i>L. lactis</i>	สูตรที่ 1	44.00×10^8	9.643	0.130	147.30×10^4	6.168	63.96
	สูตรที่ 2	36.66×10^8	9.564	0.210	57.70×10^5	6.761	70.69
	สูตรที่ 3	32.33×10^8	9.591	0.103	60.76×10^4	5.784	60.83
	สูตรที่ 4	39.00×10^8	9.290	0.065	183.27×10^4	6.263	65.30
	สูตรที่ 5	54.00×10^8	9.732	0.213	108.60×10^5	7.036	72.30
	สูตรที่ 6	65.33×10^8	9.815	0.118	25.17×10^5	6.400	65.21
	สูตรที่ 7	40.00×10^8	9.602	0.124	152.10×10^5	7.182	74.80
	สูตรที่ 8	34.00×10^8	9.531	0.203	178.40×10^5	7.251	76.38
	สูตรที่ 9	43.67×10^8	9.640	0.133	105.60×10^5	7.024	72.86
<i>L. sakei</i>	สูตรที่ 1	31.66×10^7	8.500	0.112	24.13×10^4	5.382	63.32
	สูตรที่ 2	39.67×10^7	8.564	0.168	84.67×10^4	5.928	69.22
	สูตรที่ 3	20.33×10^7	8.308	0.129	87.32×10^4	5.941	71.57
	สูตรที่ 4	74.00×10^7	8.869	0.121	55.28×10^4	5.742	64.72
	สูตรที่ 5	86.70×10^6	7.938	0.216	74.64×10^4	5.873	73.98
	สูตรที่ 6	80.00×10^6	7.90	0.127	83.17×10^4	5.927	75.02
	สูตรที่ 7	24.67×10^7	8.392	0.127	84.67×10^4	5.928	70.63
	สูตรที่ 8	16.33×10^7	8.212	0.202	124.84×10^4	6.096	74.24
	สูตรที่ 9	21.33×10^7	8.328	0.138	87.98×10^4	5.944	71.38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.9 การยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* หลังการแช่แข็งแห้งในสารป้องกันผสม 9 สูตร ครั้งที่ 2

ตัวอย่าง (ครั้งที่2)	สารป้องกัน ผสม	ก่อนแช่แข็งแห้ง		หลังแช่แข็งแห้ง			การอยู่รอด (ร้อยละ)
		โคโลนีต่อ	10g	น้ำหนัก เซลล์ (กรัม)	โคโลนีต่อ	10g	
		มิลลิลิตร	โคโลนี		กรัม	โคโลนีต่อ	
		(เฉลี่ย)	ต่อ มิลลิลิตร		(เฉลี่ย)	กรัม	
<i>L. lactis</i>	สูตรที่ 1	38.33×10 ⁸	9.580	0.119	21.55×10 ⁵	6.333	66.11
	สูตรที่ 2	39.66×10 ⁸	9.598	0.195	12.35×10 ⁵	6.092	63.47
	สูตรที่ 3	25.00×10 ⁸	9.398	0.128	145.42×10 ⁴	6.163	65.58
	สูตรที่ 4	40.66×10 ⁸	9.609	0.110	32.47×10 ⁵	6.511	67.76
	สูตรที่ 5	44.33×10 ⁸	9.647	0.204	130.20×10 ⁵	7.114	73.74
	สูตรที่ 6	56.66×10 ⁸	9.753	0.115	19.64×10 ⁵	6.293	64.52
	สูตรที่ 7	37.66×10 ⁸	9.576	0.134	76.12×10 ⁵	6.881	71.86
	สูตรที่ 8	24.33×10 ⁸	9.386	0.202	258.98×10 ⁵	7.413	78.98
	สูตรที่ 9	48.33×10 ⁸	9.684	0.134	11.85×10 ⁶	7.073	73.04
<i>L. sakei</i>	สูตรที่ 1	31.50×10 ⁷	8.498	0.114	62.25×10 ⁴	5.798	68.18
	สูตรที่ 2	43.50×10 ⁷	8.638	0.167	62.25×10 ⁴	5.794	67.07
	สูตรที่ 3	22.00×10 ⁷	8.342	0.124	62.25×10 ⁴	5.794	69.46
	สูตรที่ 4	74.00×10 ⁷	8.869	0.123	42.49×10 ⁴	5.628	63.46
	สูตรที่ 5	60.00×10 ⁶	7.778	0.215	75.37×10 ⁴	5.877	75.56
	สูตรที่ 6	77.50×10 ⁶	7.889	0.128	55.81×10 ⁴	5.747	72.85
	สูตรที่ 7	22.00×10 ⁷	8.342	0.127	120.53×10 ⁴	6.801	72.89
	สูตรที่ 8	24.33×10 ⁷	8.386	0.155	103.18×10 ⁴	6.014	71.71
	สูตรที่ 9	36.00×10 ⁷	8.556	0.139	104.26×10 ⁴	6.018	70.34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.10 การยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* หลังการแช่แข็งแห้งในสารป้องกันผสม 9 สูตร ครั้งที่ 3

ตัวอย่าง (ครั้งที่3)	สารป้องกัน ผสม	ก่อนแช่แข็งแห้ง		หลังแช่แข็งแห้ง			การยู่รอด (ร้อยละ)
		โคโลนีต่อ	10g	น้ำหนัก	โคโลนีต่อ	10g	
		มิลลิลิตร (เฉลี่ย)	โคโลนี ต่อ มิลลิลิตร	เซลล์ กรัม (กรัม)	กรัม (เฉลี่ย)	โคโลนี ต่อกรัม	
<i>L. lactis</i>	สูตรที่ 1	64.50×10^8	9.809	0.122	18.92×10^5	6.277	63.99
	สูตรที่ 2	61.60×10^7	9.775	0.198	140.80×10^5	7.148	73.27
	สูตรที่ 3	32.33×10^8	9.509	0.131	38.85×10^4	5.589	58.77
	สูตรที่ 4	29.00×10^8	9.462	0.112	13.55×10^5	6.132	64.80
	สูตรที่ 5	43.00×10^8	9.633	0.217	18.41×10^5	6.265	65.04
	สูตรที่ 6	57.00×10^8	9.756	0.117	20.64×10^5	6.315	64.73
	สูตรที่ 7	54.66×10^8	9.738	0.126	15.08×10^5	6.718	68.99
	สูตรที่ 8	53.33×10^8	9.727	0.201	10.59×10^6	7.025	72.22
	สูตรที่ 9	44.00×10^8	9.643	0.136	33.40×10^5	6.524	67.65
<i>L. sakei</i>	สูตรที่ 1	33.50×10^7	8.252	0.110	30.05×10^4	5.478	64.26
	สูตรที่ 2	43.50×10^7	8.638	0.170	55.28×10^4	5.742	66.48
	สูตรที่ 3	20.50×10^7	8.312	0.120	55.28×10^4	5.742	69.09
	สูตรที่ 4	74.00×10^7	8.869	0.118	51.30×10^4	5.710	64.38
	สูตรที่ 5	70.00×10^6	7.845	0.227	55.45×10^4	5.744	73.21
	สูตรที่ 6	58.67×10^6	7.768	0.127	55.80×10^4	5.647	73.99
	สูตรที่ 7	34.00×10^7	8.530	0.128	99.61×10^4	5.998	70.31
	สูตรที่ 8	51.67×10^6	7.713	0.196	94.13×10^4	5.974	77.45
	สูตรที่ 9	55.33×10^7	8.743	0.138	99.61×10^4	5.998	68.61

ตารางที่ ค.11 การอยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* ที่ไม่ผ่านการปรับตัว ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก และความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นหลังการแช่แข็งแห้งและเก็บรักษา (สารป้องกันผลมสูตรที่ 8) ครั้งที่ 1

เชื้อ <i>L. lactis</i> /วันที่ (ครั้งที่ 1)	การปรับตัว	ก่อนแช่แข็งแห้ง		หลังแช่แข็งแห้ง			การอยู่รอด (ร้อยละ)
		โคโลนีต่อ มิลลิลิตร (เฉลี่ย)	10g โคโลนี ต่อมิลลิลิตร	น้ำหนักเซลล์ (กรัม)	โคโลนีต่อ กรัม (เฉลี่ย)	10g โคโลนี ต่อกรัม	
วันที่ 0	ไม่ปรับตัว	75.00×10 ⁷	8.875	0.212	49.80×10 ⁵	6.697	75.45
	ปรับตัวด้วยซูโครส	20.50×10 ⁸	9.311	0.216	63.25×10 ⁵	6.801	73.04
	ปรับตัวด้วยซูโครส	7.00×10 ⁸	9.431	0.224	106.58×10 ⁵	7.028	74.52
	ร่วมกับความเย็น						
วันที่ 3	ไม่ปรับตัว	-	-	0.218	328.72×10 ⁴	6.517	97.31
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.255	37.85×10 ⁵	6.578	96.72
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.185	105.59×10 ⁵	7.024	99.94
	ร่วมกับความเย็น						
วันที่ 7	ไม่ปรับตัว	-	-	0.209	265.96×10 ⁴	6.425	95.94
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.246	41.34×10 ⁵	6.616	97.28
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.222	70.23×10 ⁵	6.846	97.41
	ร่วมกับความเย็น						
วันที่ 14	ไม่ปรับตัว	-	-	0.224	213.17×10 ⁴	6.329	94.51
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.197	31.87×10 ⁵	6.503	95.62
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.317	70.72×10 ⁵	6.849	97.45
	ร่วมกับความเย็น						
วันที่ 21	ไม่ปรับตัว	-	-	0.245	163.86×10 ⁴	6.214	92.79
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.259	54.79×10 ⁵	6.738	99.07
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.227	55.78×10 ⁵	6.746	95.99
	ร่วมกับความเย็น						
วันที่ 28	ไม่ปรับตัว	-	-	0.262	145.43×10 ⁴	6.163	92.03
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.224	41.84×10 ⁵	6.621	97.35
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.189	46.32×10 ⁵	6.666	94.85
	ร่วมกับความเย็น						

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.12 การอยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* ที่ไม่ผ่านการปรับตัว ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก และความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นหลังการแช่แข็งแห้งและเก็บรักษา (สารป้องกันผสมสูตรที่ 8) ครั้งที่ 2

เชื้อ <i>L. lactis</i> /วันที่ (ครั้งที่ 2)	การปรับตัว	ก่อนแช่แข็งแห้ง		หลังแช่แข็งแห้ง			การอยู่รอด (ร้อยละ)
		โคโลนีต่อ มิลลิตร (เฉลี่ย)	10g โคโลนี ต่อมิลลิตร	น้ำหนักเซลล์ (กรัม)	โคโลนีต่อ กรัม (เฉลี่ย)	10g โคโลนี ต่อกรัม	
วันที่ 0	ไม่ปรับตัว	20.00×10 ⁸	9.301	0.214	25.70×10 ⁶	7.401	79.57
	ปรับตัวด้วยซูโครส	33.00×10 ⁸	9.519	0.231	11.15×10 ⁶	7.047	74.03
	ปรับตัวด้วยซูโครส	21.00×10 ⁸	9.322	0.207	114.51×10 ⁵	7.058	75.71
	รวมกับความเย็น						
วันที่ 3	ไม่ปรับตัว	-	-	0.270	197.01×10 ⁴	6.294	85.04
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.220	59.77×10 ⁵	6.776	96.15
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.206	75.70×10 ⁵	6.879	97.46
	รวมกับความเย็น						
วันที่ 7	ไม่ปรับตัว	-	-	0.237	162.86×10 ⁴	6.212	83.94
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.260	59.77×10 ⁵	6.776	96.15
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.201	65.21×10 ⁵	6.814	96.54
	รวมกับความเย็น						
วันที่ 14	ไม่ปรับตัว	-	-	0.208	160.87×10 ⁴	6.206	83.85
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.243	58.77×10 ⁵	6.769	95.90
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.371	72.72×10 ⁵	6.861	97.21
	รวมกับความเย็น						
วันที่ 21	ไม่ปรับตัว	-	-	0.252	168.34×10 ⁴	6.226	84.12
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.219	58.27×10 ⁵	6.765	96.00
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.193	79.69×10 ⁵	6.901	97.78
	รวมกับความเย็น						
วันที่ 28	ไม่ปรับตัว	-	-	0.216	149.41×10 ⁴	6.174	83.42
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.216	149.41×10 ⁴	6.174	83.42
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.217	49.81×10 ⁵	6.697	94.89
	รวมกับความเย็น						

ตารางที่ ค.13 การอยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* ที่ไม่ผ่านการปรับตัว ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก และความดันออสโมติกร่วมกับความเย็น หลังการแช่แข็งแห้งและเก็บรักษา (สารป้องกันผลมสูตรที่ 8) ครั้งที่ 3

เชื้อ <i>L. lactis</i> /วันที่ (ครั้งที่ 3)	การปรับตัว	ก่อนแช่แข็งแห้ง		หลังแช่แข็งแห้ง			การอยู่รอด (ร้อยละ)
		โคโลนีต่อ มิลลิลิตร (เฉลี่ย)	10g โคโลนี ต่อมิลลิลิตร	น้ำหนักเซลล์ (กรัม)	โคโลนีต่อ กรัม (เฉลี่ย)	10g โคโลนี ต่อกรัม	
วันที่ 0	ไม่ปรับตัว	55.00×10^7	8.740	0.224	62.26×10^5	6.794	77.73
	ปรับตัวด้วยซูโครส	36.00×10^8	9.556	0.232	84.17×10^5	6.925	72.47
	ปรับตัวด้วยซูโครส ร่วมกับความเย็น	19.00×10^8	9.278	0.218	116.05×10^5	7.065	76.15
วันที่ 3	ไม่ปรับตัว	-	-	0.204	199.22×10^4	6.299	92.71
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.239	80.68×10^5	6.906	99.72
	ปรับตัวด้วยซูโครส ร่วมกับความเย็น	-	-	0.211	78.69×10^5	6.896	97.61
วันที่ 7	ไม่ปรับตัว	-	-	0.224	171.33×10^4	6.234	91.76
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.222	64.75×10^5	6.811	98.35
	ปรับตัวด้วยซูโครส ร่วมกับความเย็น	-	-	0.207	84.67×10^5	6.927	98.05
วันที่ 14	ไม่ปรับตัว	-	-	0.211	171.83×10^4	6.235	91.77
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.244	39.35×10^5	6.594	95.22
	ปรับตัวด้วยซูโครส ร่วมกับความเย็น	-	-	.221	0.68×10^5	6.907	97.76
วันที่ 21	ไม่ปรับตัว	-	-	0.251	152.95×10^4	6.185	91.04
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.216	25.40×10^5	6.405	92.49
	ปรับตัวด้วยซูโครส ร่วมกับความเย็น	-	-	0.202	75.50×10^5	6.878	97.35
วันที่ 28	ไม่ปรับตัว	-	-	0.247	102.10×10^4	6.009	88.45
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.229	46.32×10^5	6.666	96.26
	ปรับตัวด้วยซูโครส ร่วมกับความเย็น	-	-	0.184	52.79×10^5	6.722	95.15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.14 การอยู่รอดของเชื้อ *L. sakei* ที่ไม่ผ่านการปรับตัว ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก และความดันออสโมติกร่วมกับความชื้นหลังการแช่แข็งแห้งและเก็บรักษา (สารป้องกันสูตรที่ 5) ครั้งที่ 1

เชื้อ <i>L. sakei</i> /วันที่ (ครั้งที่ 1)	การปรับตัว	ก่อนแช่แข็งแห้ง		หลังแช่แข็งแห้ง			การอยู่รอด (ร้อยละ)
		โคโลนีต่อ มิลลิลิตร (เฉลี่ย)	10g โคโลนี ต่อมิลลิลิตร	น้ำหนักเซลล์ (กรัม)	โคโลนีต่อ กรัม (เฉลี่ย)	10g โคโลนี ต่อกรัม	
วันที่ 0	ไม่ปรับตัว	16.50×10 ⁴	9.217	0.193	24.90×10 ⁵	6.396	69.39
	ปรับตัวด้วยซูโครส	95.00×10 ⁴	7.978	0.362	47.32×10 ⁵	6.675	83.67
	ปรับตัวด้วยซูโครส ร่วมกับความชื้น	16.00×10 ⁷	8.204	0.205	18.97×10 ⁵	6.278	76.52
วันที่ 3	ไม่ปรับตัว	-	-	0.218	101.59×10 ⁴	6.007	93.92
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.263	76.20×10 ⁴	5.880	86.89
	ปรับตัวด้วยซูโครส ร่วมกับความชื้น	-	-	0.271	103.60×10 ⁴	6.015	95.81
วันที่ 7	ไม่ปรับตัว	-	-	0.207	17.48×10 ⁵	6.242	97.59
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.210	75.70×10 ⁴	5.879	88.07
	ปรับตัวด้วยซูโครส ร่วมกับความชื้น	-	-	0.209	59.77×10 ⁴	5.776	92.00
วันที่ 14	ไม่ปรับตัว	-	-	0.210	13.25×10 ⁵	6.122	95.72
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.344	75.71×10 ⁴	5.879	88.01
	ปรับตัวด้วยซูโครส ร่วมกับความชื้น	-	-	0.214	6.64×10 ⁴	5.967	95.05
วันที่ 21	ไม่ปรับตัว	-	-	0.203	23.90×10 ⁵	6.378	99.72
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.414	10.46×10 ⁵	6.019	90.17
	ปรับตัวด้วยซูโครส ร่วมกับความชื้น	-	-	0.215	54.29×10 ⁴	5.735	91.35
วันที่ 28	ไม่ปรับตัว	-	-	0.203	22.61×10 ⁵	6.354	99.34
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.235	97.60×10 ⁴	5.989	89.72
	ปรับตัวด้วยซูโครส ร่วมกับความชื้น	-	-	0.212	99.61×10 ³	4.998	79.61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.15 การอยู่รอดของเชื้อ *L. sakei* ที่ไม่ผ่านการปรับตัว ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก และความดันออสโมติกร่วมกับความชื้นหลังการแช่แข็งแห้งและเก็บรักษา (สารป้องกันผสมสูตรที่ 5) ครั้งที่ 2

เชื้อ <i>L. sakei</i> /วันที่ (ครั้งที่ 2)	การปรับตัว	ก่อนแช่แข็งแห้ง		หลังแช่แข็งแห้ง			การอยู่รอด (ร้อยละ)
		โคโลนีต่อ มิลลิลิตร (เฉลี่ย)	10g โคโลนี ต่อมิลลิลิตร	น้ำหนักเซลล์ (กรัม)	โคโลนีต่อ กรัม (เฉลี่ย)	10g โคโลนี ต่อกรัม	
วันที่ 0	ไม่ปรับตัว	48.00×10 ⁷	8.681	0.201	47.35×10 ⁵	6.675	76.89
	ปรับตัวด้วยซูโครส	70.00×10 ⁷	8.845	0.225	45.32×10 ⁵	6.656	75.25
	ปรับตัวด้วยซูโครส	20.00×10 ⁷	8.301	0.207	38.85×10 ⁵	6.589	79.37
	ร่วมกับความชื้น						
วันที่ 3	ไม่ปรับตัว	-	-	0.206	20.37×10 ⁵	6.308	94.50
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.221	10.16×10 ⁵	6.007	90.25
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.213	72.72×10 ⁴	5.862	88.97
	ร่วมกับความชื้น						
วันที่ 7	ไม่ปรับตัว	-	-	0.212	25.75×10 ⁵	6.410	96.03
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.236	94.13×10 ⁴	5.974	89.75
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.207	45.32×10 ⁴	5.656	85.84
	ร่วมกับความชื้น						
วันที่ 14	ไม่ปรับตัว	-	-	0.214	22.56×10 ⁵	6.353	95.18
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.377	88.66×10 ⁴	5.947	89.35
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.291	13.45×10 ⁴	5.128	77.83
	ร่วมกับความชื้น						
วันที่ 21	ไม่ปรับตัว	-	-	0.334	24.106×10 ⁵	6.382	95.61
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.233	13.05×10 ⁵	6.116	91.89
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.221	50.80×10 ⁴	5.706	86.60
	ร่วมกับความชื้น						
วันที่ 28	ไม่ปรับตัว	-	-	0.201	80.96×10 ⁴	5.908	88.51
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.221	90.65×10 ⁴	5.957	89.50
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.212	96.12×10 ⁴	5.983	90.80
	ร่วมกับความชื้น						

ตารางที่ ค.16 การอยู่รอดของเชื้อ *L. sakei* ที่ไม่ผ่านการปรับตัว ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก และความดันออสโมติกร่วมกับความเข้มข้นหลังการแช่แข็งแห้งและเก็บรักษา (สารป้องกันผลสมสูตรที่ 5) ครั้งที่ 3

เชื้อ <i>L. sakei</i> /วันที่ (ครั้งที่ 3)	การปรับตัว	ก่อนแช่แข็งแห้ง		หลังแช่แข็งแห้ง			การอยู่รอด (ร้อยละ)
		โคโลนีต่อ มิลลิลิตร (เฉลี่ย)	10g โคโลนี ต่อมิลลิลิตร	น้ำหนักเซลล์ (กรัม)	โคโลนีต่อ กรัม (เฉลี่ย)	10g โคโลนี ต่อกรัม	
วันที่ 0	ไม่ปรับตัว	90.5×10 ⁷	8.957	0.244	112.06×10 ⁴	6.049	67.53
	ปรับตัวด้วยซูโครส	90.00×10 ⁶	7.954	0.226	17.73×10 ⁵	6.248	78.55
	ปรับตัวด้วยซูโครส	103.50×10 ⁷	9.015	0.206	68.01×10 ⁵	6.832	75.78
	ร่วมกับความเย็น						
วันที่ 3	ไม่ปรับตัว	-	-	0.204	66.74×10 ⁴	5.824	96.28
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.226	89.15×10 ⁴	5.950	95.23
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.265	77.70×10 ⁴	5.890	86.21
	ร่วมกับความเย็น						
วันที่ 7	ไม่ปรับตัว	-	-	0.211	24.40×10 ⁴	5.387	89.05
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.221	65.24×10 ⁴	5.814	93.05
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.220	75.70×10 ⁴	5.879	86.05
	ร่วมกับความเย็น						
วันที่ 14	ไม่ปรับตัว	-	-	0.309	35.36×10 ⁴	5.548	88.80
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.244	39.35×10 ⁵	6.594	95.22
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.312	99.12×10 ⁴	5.996	87.76
	ร่วมกับความเย็น						
วันที่ 21	ไม่ปรับตัว	-	-	0.273	156.39×10 ³	5.194	85.87
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.210	11.70×10 ⁴	5.068	81.11
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.214	59.77×10 ⁴	5.776	84.54
	ร่วมกับความเย็น						
วันที่ 28	ไม่ปรับตัว	-	-	0.203	121.52×10 ³	5.085	84.06
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.034	11.45×10 ⁴	4.783	76.55
	ปรับตัวด้วยซูโครส	-	-	0.256	73.21×10 ⁴	5.864	85.83
	ร่วมกับความเย็น						

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.17 การอยู่รอดของเชื้อ *Lactococcus lactis* ในสารป้องกันผสมสูตรที่ 8

วันที่	ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งแห้ง (ร้อยละ) $\pm$ SD		
	เซลล์ที่ไม่ผ่าน การปรับตัว	เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวต่อความ ดันออสโมติก	เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวต่อ ความดันออสโมติกพร้อมกับ ความเย็น
3	91.69 $\pm$ 6.20BCDE	97.53 $\pm$ 1.92AB ^b	98.33 $\pm$ 1.39AB
7	90.55 $\pm$ 6.09CDE	97.26 $\pm$ 1.10ABC	97.33 $\pm$ 0.76ABC
14	90.04 $\pm$ 5.53DE	95.51 $\pm$ 0.46ABCD	97.47 $\pm$ 0.27AB
21	89.32 $\pm$ 4.58DE	95.85 $\pm$ 3.29ABCD	97.04 $\pm$ 0.93ABC
28	87.97 $\pm$ 4.32E	92.34 $\pm$ 7.75BCDE	94.96 $\pm$ 0.16ABCD

^a ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง 3 ซ้ำ

^b ตัวอักษรที่ต่างกันในสคมภ์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ ค.18 การอยู่รอดของเชื้อ *Lactobacillus sakei* ในสารป้องกันผสมสูตรที่ 5

วันที่	ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งแห้ง (ร้อยละ) $\pm$ SD		
	เซลล์ที่ไม่ผ่าน การปรับตัว	เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวต่อความ ดันออสโมติก	เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวต่อ ความดันออสโมติกพร้อมกับ ความเย็น
3	94.90 $\pm$ 1.23AB	90.79 $\pm$ 4.20AB ^b	90.33 $\pm$ 4.94B
7	94.22 $\pm$ 4.55AB	90.35 $\pm$ 2.640B	87.96 $\pm$ 3.504B
14	93.23 $\pm$ 3.85AB	90.86 $\pm$ 3.83AB	86.88 $\pm$ 8.64B
21	93.73 $\pm$ 7.11AB	87.72 $\pm$ 5.79B	87.50 $\pm$ 3.50B
28	90.64 $\pm$ 7.86AB	85.25 $\pm$ 7.54B	85.41 $\pm$ 5.60B

^a ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง 3 ซ้ำ

^b ตัวอักษรที่ต่างกันในสคมภ์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ประวัติผู้เขียน

นางสาวนิระชา ศรีวงษ์ เกิดวันที่ 25 เมษายน 2522 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานครฯ สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจาก โรงเรียนพรตพิทยพยัต ปีการศึกษา 2540 เข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2544 เข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2546 ถึงปีการศึกษา 2549



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้