การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหนมปลากรายและเนื้อปลาสดทั้งหมด 15 ตัวอย่าง พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 3×10^5 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) เมื่อเปรียบเทียบกับการรอดชีวิตในนมถั่วเหลือง และซอร์บิทอลซึ่งให้การป้องกันเซลล์น้อยกว่า ส่วน *L. sakei* นั้นพบว่าสารป้องกันเซลล์ที่ดีที่สุดคือหางนมและนมถั่วเหลือง ซึ่งให้ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งแห้งร้อยละ 65.06 และ 62.80 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามทรีฮาโลส ซูโครส และแลคโตส มีผลทำให้ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตน้อยกว่าในสารป้องกันเซลล์ทั้งสองชนิดนั้น ในบรรดาสารป้องกันเซลล์ทั้งหมดที่ทดสอบ กลูโคสและไข่แดงให้ผลป้องกันเซลล์แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ได้ต่ำสุดหลังการแช่แข็งแห้ง สำหรับการเปรียบเทียบการอยู่รอดของเซลล์ในสูตรสารป้องกันผสม พบว่า *L. lactis* อยู่รอดได้สูงสุดหลังการแช่แข็งแห้ง (ร้อยละ 75.86) ในสารป้องกันเซลล์ผสมที่ประกอบด้วยหางนมผงร้อยละ 8.73 แลคโตสร้อยละ 3.97 ซูโครสร้อยละ 3.97 ทรีฮาโลสร้อยละ 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 ทรีฮาโลสร้อยละ 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 พบว่าการปรับตัวทั้งสองทรีตเมนต์นี้ไม่มีผลช่วยป้องกันเซลล์ของ *L. lactis* หลังการแช่แข็งแห้ง แต่การปรับตัวของเซลล์นี้มีแนวโน้มช่วยส่งเสริมการต้านทานต่อสภาพเครียดของการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำมากโดยช่วยเพิ่มการอยู่รอดของเซลล์ได้เล็กน้อย สำหรับเชื้อ *L. sakei* นั้นต่างกับ *L. lactis* โดยเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งแห้งของ *L. sakei* ที่ผ่านการปรับตัวมีจำนวนสูงกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัว และการปรับตัวทั้งสองทรีตเมนต์ไม่ได้มีผลช่วยป้องกันเซลล์ต่อสภาพเครียดจากการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำมาก

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 $> 2.1\times10^9$ 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

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.