

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

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหนมปลาทรายและเนื้อปลาสดทั้งหมด 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 ไอโซเลตนี้มาทำเป็นเชื้อสำหรับผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

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 อย่างไรก็ตามทรีฮาโลส ซูโครส และแลคโตส มีผลทำให้ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตน้อยกว่าในสารป้องกันเซลล์ทั้งสองชนิดนั้น ในบรรดาสารป้องกันเซลล์ทั้งหมดที่ทดสอบ กลูโคส และไข่แดงให้ผลป้องกันเซลล์แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ได้ต่ำสุดหลังการแช่แข็งแห้ง 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

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

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. นवलพรรณ ณ ระนอง ผศ. อารี ฤทธิบุญ และ รศ. อรไท สุขเจริญ ซึ่งเป็นคณะกรรมการสอบหัวข้อวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาสละเวลาให้คำปรึกษา และคำชี้แนะในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย บัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและติดต่อประสานงาน ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์และสารเคมี

ขอบคุณเพื่อน พี่ และน้องภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกคน ในความช่วยเหลือและคอยเป็นกำลังใจตลอดมา

และที่สำคัญขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อนคร และคุณแม่จำเนียร ศรีวงษ์ และทุกคนในครอบครัวที่เสียสละ ให้ความรัก ให้กำลังใจผู้วิจัยตลอดมา

สำหรับคุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับคุณพ่อ 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

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 โพลีแอลกอฮอล์ (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 กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกสำหรับผลิตภัณฑ์ปลาหมัก	33
2.6.6 การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกเพื่อยับยั้งและการทำลาย จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค.....	33
2.6.7 ประโยชน์ของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก.....	34

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 การวิเคราะห์หาจำนวนและการแยกแบคทีเรียกรดแลคติก ในเหนมปลาและเนื้อปลาสด	36
3.2.1.1 การตรวจนับจำนวน โคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติก ในเหนมปลาและเนื้อปลาสด.....	36
3.2.1.2 การแยกแบคทีเรียกรดแลคติก	37
3.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์.....	37
3.2.3 การทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือแร่ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์	38
3.2.3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก	38
3.2.3.2 การทดสอบการทนต่อกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติก	38
3.2.3.3 การทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริก ของแบคทีเรียกรดแลคติก	38
3.2.3.4 การทดสอบการทนต่อโซเดียมคลอไรด์ ของแบคทีเรียกรดแลคติก	38
3.2.3.5 การทดสอบการทนต่อเกลือแร่ของแบคทีเรียกรดแลคติก ..	39
3.2.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	39
3.2.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	39
3.2.4.2 การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีโดยใช้ ชุดทดสอบ API 50 CH.....	39
3.2.4.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วย วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA	41
ก) การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรีย	41

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 ผลของสูตรสารป้องกันผสมต่อการอยู่รอด 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

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	47
4.1 ผลการตรวจนับจำนวนและการแยกแบคทีเรียกรดแลกติกในนมปลา และเนื้อปลาสด.....	47
4.1.1 ผลการตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลกติก ในนมปลาและเนื้อปลาสด	47
4.2 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ด้วยวิธี Agar Spot Test	50
4.2.1 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ ที่ใช้ทดสอบด้วยวิธี Agar Spot Test	50
4.3 ผลการทดสอบการทนต่อกรดแลกติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือแร่ของแบคทีเรียกรดแลกติก	53
4.3.1 การทนต่อกรดแลกติกของแบคทีเรียกรดแลกติก	53
4.3.2 การทนต่อกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลกติก.....	54
4.3.3 การทนต่อโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลกติก.....	54
4.3.4 การทนต่อเกลือแร่ของแบคทีเรียกรดแลกติก	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 จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส	62
4.4.4 ผลสรุปการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4	67

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 สภาพที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณเชื้อเอ็นเอ	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 พลาสติกและแฮมปลา 30 ไอโซเลต	52
4.3 จำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกทั้งหมดและจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรีย กรดแลกติกที่ผลิตสารยับยั้ง.....	53
4.4 การทนต่อกรดแลกติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดี ในอาหารเหลว MRS ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกจากแฮมปลาและเนื้อพลาสติก	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

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 ผลของสูตรสารป้องกันผสมต่อการอยู่รอดของเชื้อ <i>Lactococcus lactis</i> และ <i>Lactobacillus sakei</i> หลังการแช่แข็งแห้ง	74
4.11 ผลของการอยู่รอดของเชื้อ <i>Lactococcus lactis</i> ในสารป้องกันผสมสูตรที่ 8 และ <i>Lactobacillus sakei</i> ในสารป้องกันผสมสูตรที่ 5 ที่ไม่ผ่านการปรับตัว ผ่านการ ปรับตัวต่อความดันออสโมติก และผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกพร้อมกับ 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 กลีเซอรอลและน้ำ ซึ่งเป็นฟังก์ชันของความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ ของการแช่แข็งต่างกันระหว่าง -5 และ -50 องศาเซลเซียส	27
4.1 รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเชือกเบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 (รูป ก) และไอโซเลต 13IS4 (รูป ข)	59
4.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 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) ในสารป้องกันผลสมสูตรที่ 8 และ <i>L. sakei</i> (รูป ข) ในสารป้องกันผลสมสูตรที่ 5 ระหว่างเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน	80

