

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 3.0×10^5 โคโลนีต่อกรัม ถึง 7.3×10^5 โคโลนีต่อกรัม และเนื้อปลาชะโดมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 4.5×10^5 โคโลนีต่อกรัม ถึง 2.5×10^6 โคโลนีต่อกรัม (ตารางที่ 4.1)

การที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนมากในตัวอย่างแฮมปลาทรายและแฮมปลาชะโด คาดว่าอาจเป็นเพราะเนื้อปลาสดที่ใช้เป็นวัตถุดิบเป็นสับสเตอร์พดีของแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งเป็นกล้าเชื้อในการผลิตแฮมปลา แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเป็นจุลินทรีย์ชนิดสำคัญที่ทำให้เกิดการหมักของผลิตภัณฑ์ โดยการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตให้เป็นสารยับยั้งหลายชนิดได้แก่ ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเบคเทอริโอซิน (Sobrinho และคณะ. 1991 ; Vandenberg. 1993) โดยที่สารยับยั้งเหล่านี้ไม่เป็นอันตรายต่อตัวมันเอง ในปี ค.ศ. 1999 Sander และคณะ กล่าวว่าระหว่างการผลิตหมักแบคทีเรียกรดแลคติกจะต้องสามารถทนต่อการสะสมผลิตภัณฑ์ซึ่งเกิดจากการคาร์โบไฮเดรต เช่น กรดแลคติก และต้องทนต่อสภาพแวดล้อมที่อาจเป็นอันตรายต่อเซลล์ซึ่งจำเป็นต่อการหมักที่เหมาะสมของอาหารชนิดนั้นๆ สารที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกไม่เพียงทำให้รสชาติและกลิ่นของผลิตภัณฑ์อาหารหมักเป็นที่น่าพอใจเท่านั้นแต่ยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารอีกด้วย (De Vuyst และ Vandarmme. 1994 ; Buckenhuskes. 1993 ; Daeschel. 1989) ในปี ค.ศ. 2002 Paludan-Müller และคณะ ได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากปลาสดที่ประกอบด้วย เนื้อปลาชะโด 750 กรัม เกลือ 100 กรัม น้ำมันปาล์ม 125 มิลลิลิตร และข้าวคั่ว 80 กรัม พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 10^8 ถึง 10^9

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

การที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนมากในตัวอย่างเนื้อปลารายและเนื้อปลาชะโดคาดว่าเป็นเพราะแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถปรับตัวให้อาศัยอยู่และเจริญเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมในปลา ซึ่งเกี่ยวข้องกับปัจจัยภายในหลายประการ โดยทั่วไปปัจจัยภายในที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในเนื้อปลาที่พบว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียที่ทำให้เน่าเสียชนิดอื่นสามารถอาศัยอยู่ได้และทำให้เนื้อปลาเกิดการเน่าเสีย ได้แก่ การที่เนื้อปลามีโพสโมรเทม พีเอช (Post-mortem pH) สูง (สูงกว่า 6.0) หลังการตาย ซึ่งเนื่องมาจากการที่เนื้อปลาส่วนใหญ่มีคาร์โบไฮเดรตในปริมาณที่น้อยมาก (น้อยกว่าร้อยละ 0.5) จึงทำให้เกิดกรดแลคติกขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นหลังจากปลาตาย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้จุลินทรีย์ที่ไวต่อกรดสามารถเจริญเติบโตอยู่ในปลาได้ นอกจากนี้ในเนื้อปลายังมีสารประกอบไนโตรเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งละลายน้ำได้เช่น กรดอะมิโนอิสระ และนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นสารประกอบที่จุลินทรีย์จะเอาไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ 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 ใต้ ดับ หัวใจ และม้าม ขณะที่ Gram และ Huss (1996) ได้รายงานไว้ในผลิตภัณฑ์ปลาแห้ง

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	ແໜມປລາກຣາຍ	ตลาดหัวตะเข้ กรุงเทพฯ	2.1×10^9	10
2	ແໜມປລາກຣາຍ	ตลาด ก.ม. 8 กรุงเทพฯ	6.6×10^8	9
3	ແໜມປລາກຣາຍ	ตลาดสี่มุมเมืองกรุงเทพฯ	1.4×10^9	9
4	ແໜມປລາກຣາຍ	ตลาดมีนบุรี กรุงเทพฯ	4.2×10^8	9
5	ແໜມປລາກຣາຍ	ตลาดบางกะปิ กรุงเทพฯ	1.3×10^9	9
6	ແໜມປລາຊະໂດ	ตลาดนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง กรุงเทพฯ	1.8×10^8	9
7	ແໜມປລາຊະໂດ	ตลาดน้ำชัย กรุงเทพฯ	6.8×10^8	9
8	ແໜມປລາຊະໂດ	ตลาดพัฒนาการ กรุงเทพฯ	TNTC	9
9	ແໜມປລາຊະໂດ	ตลาด ก.ม. 8 กรุงเทพฯ	TNTC	13
10	ແໜມປລາຊະໂດ	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 จานเพาะเชื้อมีจำนวนโคโลนีที่มากกว่า 250 โคโลนี

4.2 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบด้วยวิธี Agar Spot Test

4.2.1 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบด้วยวิธี Agar Spot Test

การศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกจากแฮมปลาและเนื้อมีเนื้อมีทั้งหมด 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 ชนิดนี้มีความไวต่อการถูกยับยั้งด้วยสารยับยั้งที่แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกผลิตขึ้นซึ่งอาจเป็นส่วนผสมของสารยับยั้งหลายชนิดได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซิติก เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีริโอซิน (Cowley, 1988) ส่วนเชื้อ *S. aureus* TISTR118 และ *L. monocytogenes* DMST 11256 ที่ไม่พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตใดสามารถยับยั้งได้อาจเป็นไปได้ที่เชื้อทั้งสองสามารถทนต่อสารยับยั้งชนิดต่างๆ ที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้นได้หรืออาจเป็นเพราะสารยับยั้งที่ได้มีความเข้มข้นไม่เพียงพอที่จะต้านการเจริญของเชื้อได้

ในการทดลองนี้ที่พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลาสดและแฮมปลาสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้นั้นสอดคล้องกับการทดลองของนักวิจัยท่านอื่นที่ได้ศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อและปลาหลายชนิด 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*, *Brochetrix 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

L. monocytogenes จำนวน 10^4 โคโลนีต่อกรัม และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน พบว่าอัตราการยับยั้งเซลล์ *L. monocytogenes* ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเชื้อ *L. carnosum* 4010 ที่เติมลงในซันไสักรอก โดยเมื่อเติมเชื้อ *L. carnosum* 4010 จำนวน 1.2×10^5 เซลล์ต่อกรัม พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ในซันไสักรอกได้ แต่เมื่อเติมเชื้อ *L. carnosum* 4010 เพิ่มขึ้นเป็น 6.3×10^6 เซลล์ต่อกรัม พบว่าจำนวนเชื้อ *L. monocytogenes* ในซันไสักรอกลดลงเหลือเพียง 10 เซลล์ต่อกรัม ซึ่งการลดลงของเชื้อ *L. monocytogenes* เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ของ *L. carnosum* 4010 นี้ ผู้ทดลองได้อธิบายว่าอาจเป็นเพราะสารแบคทีริโอซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *L. carnosum* 4010 มีความเข้มข้นสูงขึ้น (Budde และคณะ. 2003) และเมื่อเร็ว ๆ นี้ Thapa และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาผลการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยเชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* SM: T1 ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ปลาตากแห้งและรมควัน (sukako maacha) พื้นเมืองของแถบหิมาลัยตะวันออกของประเทศเนปาลและอินเดียด้วยวิธี agar spot พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *L. innocua* และ *S. aureus* ได้ และในปี ค.ศ. 2006 Ghaffi และคณะได้ทำการศึกษาสารแบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 พบว่าสามารถต้านเชื้อ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ปลาแชลมนรมควันในระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ขณะที่ Ammor และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาคูณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นในไบโอฟิล์ม (biofilm) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดที่สามารถสร้างสารคล้ายแบคทีริโอซินได้แก่ *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 โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากพลาสติกและเหนมปลาจำนวน 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	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรีย กรดแลคติกทั้งหมด (โคโลนีต่อกรัม)	จำนวน ไอโซเลต	จำนวนไอโซเลตที่ สร้างสารยับยั้ง ^a
ແໜມປລາ				
ปลากราย	5	$4.2 \times 10^8 - 2.1 \times 10^9$	46	14
ปลาชะโด	5	$\geq 6.8 \times 10^8$	53	6
ປລາສດ				
ปลากราย	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 การทนต่อการดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติก

ในการทดสอบการทนต่อการดไฮโดรคลอริกของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตสามารถทนต่อการดไฮโดรคลอริกได้แตกต่างกันในอาหารเหลว 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 ที่สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่ำสุดคือร้อยละ 4.5 และไอโซเลตที่สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงสุด (ร้อยละ 9.00) ได้แก่ไอโซเลต 5IS4 และ 14IS8

4.3.4 การทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ที่ทดสอบ (27 ไอโซเลต หรือร้อยละ 90) สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบคือร้อยละ 5.25 ยกเว้นไอโซเลต 3IS3, 3IS6 และ 14IS7 เจริญได้ที่ความเข้มข้นเกลือน้ำดีระดับต่ำกว่าคือร้อยละ 1.50, 2.25 และ 3.00 ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกส่วนใหญ่สามารถทนต่อการดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ เกลือน้ำดี ที่มีความเข้มข้นสูงได้ อาจเป็นเพราะโดยธรรมชาติของแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทนต่อสภาวะที่เป็นอันตรายดังกล่าวได้ดีตามที่ Yousef และ Courtney (2003) ได้กล่าวว่าแบคทีเรียกรดแลคติกโดยตั้งแต่กำเนิดจะมีความสามารถ

ในการทนต่อกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ซึ่งความสามารถในการทนต่อกรดจะเพิ่มขึ้นหลังจากเกิดการปรับตัวต่อกรด และแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถอยู่รอดในทางเดินอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยสามารถทนต่อกรด และกลื่อน้ำดีในทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ (Conway และคณะ. 1987 ; Tuomola และคณะ. 2001) ส่วนการที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้ในสภาพที่มีกรดไฮโดรคลอริกที่ค่าพีเอชต่ำกว่ากรดแลคติกอาจเป็นไปได้ที่กรดแลคติกเป็นกรดอ่อน ซึ่งเป็นกรดที่อยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวจึงมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่ากรดไฮโดรคลอริกซึ่งเป็นกรดแก่แตกตัวได้หมดที่ภายนอกเซลล์จึงไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ เนื่องจากธรรมชาติของเซลล์ที่จะไม่ยอมให้อิออนบวกและอิออนลบผ่านสู่เซลล์ได้โดยง่าย (Kashket. 1987)

ดังนั้นกรดไฮโดรคลอริกจึงมีผลยับยั้งน้อยกว่า โดยการที่กรดอยู่ในรูปไม่แตกตัวสามารถยับยั้งการเจริญได้ดีนั้นเนื่องมาจากกรดที่ไม่แตกตัวนี้สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้อย่างง่ายดายและจะแตกตัวภายในเซลล์ เนื่องจากภายในเซลล์มีค่าพีเอชสูงกว่าภายนอกเซลล์ ด้วยเหตุนี้แบคทีเรียจึงต้องรักษาค่าพีเอชภายในเซลล์ให้ใกล้เคียงกับค่าเป็นกลาง (พีเอช 7) เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน เอนไซม์ กรดนิวคลีอิก และฟอสโฟลิปิด โดยโปรตอนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จากการแตกตัวของกรดอินทรีย์จะมีผลทำให้ไฮโดรพลาสมมีสภาพเป็นกรด 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 ซึ่งคาดว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลตนี้อาจจะสามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารและสามารถอยู่รอดได้ 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 เนื่องจากในแฮมปลา มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 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 การทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์และเกลือน้ำดีในอาหาร
เหลว MRS ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากแหนมปลาและเนื้อปลาสด

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

^a ค่าพีเอชต่ำสุดของกรดแลคติกหรือกรดไฮโดรคลอริกในอาหารเหลว MRS ที่แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้

^b ความเข้มข้นสูงสุดของโซเดียมคลอไรด์หรือเกลือน้ำดีในอาหารเหลว MRS ที่แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้

4.4 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก

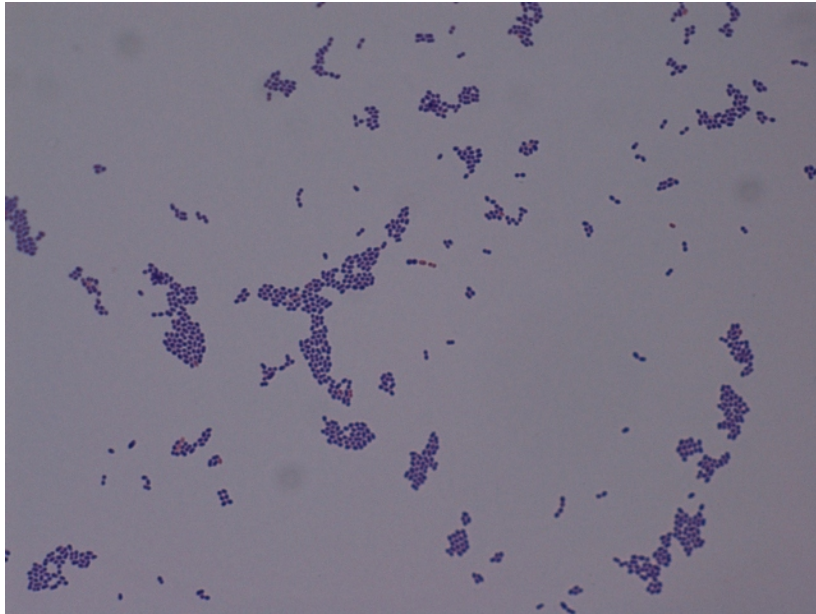
4.4.1 ผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4 ที่แยกได้จากเนื้อปลาทรายสด โดยการย้อมแกรมพบว่าไอโซเลต 13IS3 มีรูปร่างกลม ขณะที่ไอโซเลต 13IS4 มีรูปร่างท่อน ทั้งสองไอโซเลตติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต จึงเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (รูปที่ 4.1) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Ringø และ Gatesoupe (1998) ซึ่งได้ทำการศึกษานิชของจุลินทรีย์จากปลาในแหล่งต่างๆ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มที่มีลักษณะรูปร่างท่อน และรูปร่างกลม แกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีสปอร์ ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียชนิดสำคัญที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร ไพร่ของปลาทูน่า ใต้ หวัง และม้ามของปลา โดยแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดที่คัดเลือกจากระบบทางเดินอาหารของปลา มีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์เพื่อสุขภาพ (Probiotic) ซึ่งได้แก่เชื้อ *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* และ *Leuconostoc*

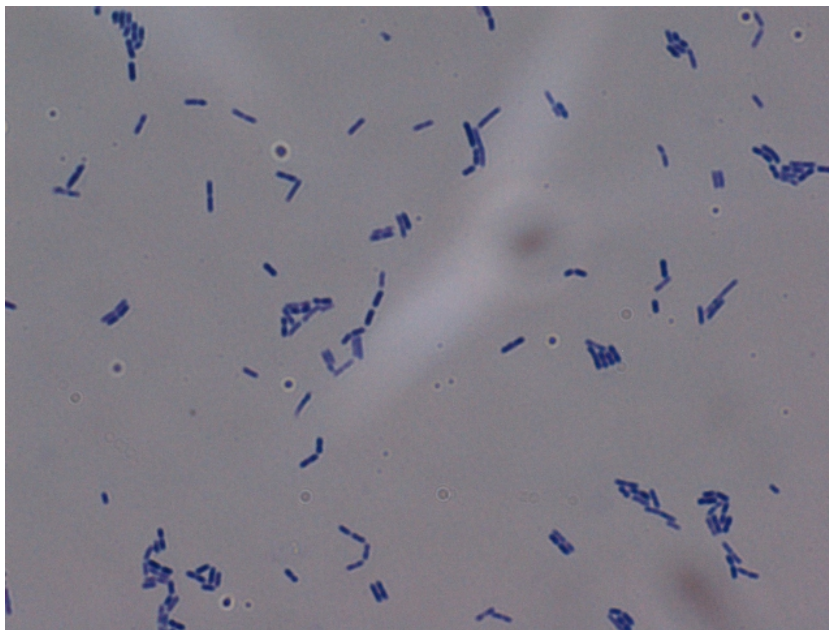
4.4.2 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4 โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH

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

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



(ก)



(ข)

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

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4 ด้วยชุดทดสอบ API

50 CH

ชนิดของสารที่ใช้ทดสอบ	ผลการทดสอบ		ชนิดของสารที่ใช้ทดสอบ	ผลการทดสอบ	
	13IS3	13IS4		13IS3	13IS4
Control	-	-	Esuculin ferric citrate	+	+
Glycerol	-	-	Salicin	+	+
Erythritol	-	-	D-Cellobiose	+	-
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 (อาหารในหลอดเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองขกเว้น Esuculin ferric citrate เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีดำ)

- หมายถึงให้ผลลบในการทดสอบ (อาหารในหลอดไม่เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองขกเว้น Esuculin ferric citrate ไม่เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีดำ)

(ก)

(ข)

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

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 ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ต่อไป

4.4.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4 โดยการเติมส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์รวมทั้งไพรเมอร์ 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 และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม Blast server

รูปที่ 4.3 จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4 จากการแยกด้วยเทคนิค
อิเล็กโตรโฟเรซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 0.8
เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*
เลน 1 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลต 13IS3
เลน 3 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลต 13IS4

รูปที่ 4.4 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

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

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

	1	10	20	30	40	50	60
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----						
:13IS3	TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACG						
:13IS4	TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTCTTCACCAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACG						
Consensus	TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTCTTCaCAATGGACGAAAGTCTGAccGAGCAACG						
	61	70	80	90	100	110	120
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----						
:13IS3	CCGCGTGAGTGAGAGAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGGTAGAGAGAAACGTTGGT						
:13IS4	CCGCGTGAGTGAGAGAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAGAAATGATCT						
Consensus	CCGCGTGAGTGAGAGAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGgTaGAGAGAAACgTagcT						
	121	130	140	150	160	170	180
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----						
:13IS3	GAGAGTGGAAGCTCATCAAGTGACGGTAACACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGC						
:13IS4	GATAGTA-ACTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC						
Consensus	GAgAGTa,AaaGaTCAGcaAGTGACGGTAaCcRaCCAGAAAGccACGGCTAACTACGTGC						
	181	190	200	210	220	230	240
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----						
:13IS3	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAGCGA						
:13IS4	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAGCGA						
Consensus	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTccCaAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAGCGA						
	241	250	260	270	280	290	300
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----						
:13IS3	GCGCAGGTGGTTTATTAGTCTGGTGTAAAGGCAGTGGCTCAACCATTTGTA-TGCATTG						
:13IS4	GCGCAGGCGGTTTCTTAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAGTGCACTG						
Consensus	GCGCAGGcGGTTTATTAGTCTGaTGTaAAAGcCagcGGCTCAACCaagA,TGCATcG						
	301	310	320	330	340	350	360
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----						
:13IS3	GAAACTGGTAGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAATG						
:13IS4	GAAACTGGGAAGACTTGAGTGCAGAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAATG						
Consensus	GAAACTGGgaAaACTTGAGTGCAGaAGAGGACaAGTGGAAcTCCATGTGTAGCGGTGAATG						
	361	370	380	390	400	410	420
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----						
:13IS3	CGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGGCTCTCTGGCTGTAACTGACACTG						
:13IS4	CGTAGATATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAAGCGGGATGTCTGGCTGTAACTGACGCTG						
Consensus	CGTAGATATATGGAGaGAACACCaGTGGCGAAAGCGGgaTcTCTGGcTGTAACTGACaCTG						
	421	430	440	450	460	470	480
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----						
:13IS3	AGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG						
:13IS4	AGGCTCGAAAGCATGGGTAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACG						
Consensus	AGGCTCGAAAGCaTGGGgAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAcGCCGTAAACG						
	481	490	500	510	520	530	540
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----						
:13IS3	ATGAGTGCTAGATGTAGGGAGCTATAGTTCT-CTGTATCGCAGCTAACGCAATTAGCAC						
:13IS4	ATGAGTGCTAGGTGTTGAAGGTTTCCGCCCTCAGGGCCGCACCTAACGCAATTAGCCC						
Consensus	ATGAGTGCTAGaTGTaGaaaGcTaTaaGccCT,CaGgacCGCaCTAACGCaATTAGCaC						
	541	550	560	570	580	590	600
	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----						
:13IS3	TCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC						
:13IS4	TCCGCCTGGGGAGTACACCAGAGGTTGAAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC						
Consensus	TCCGCCTGGGGAGTACaACCGCaAGGTTGAAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC						

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

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

สำหรับไอโซเลต 13IS4 จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 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 ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีไม่มากนัก

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) ที่แยกได้จากเนื้อปลาทราย มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบอาจเป็นเพราะแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองชนิดนี้สามารถสร้างสารแบคทีริโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ดังเช่นจากการศึกษาของ Campos และคณะ (2006) ที่ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (*Psetta maxima*) ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* โดยจากการทดลองพบว่าเชื้อ *L. lactis* สามารถผลิตสารแบคทีริโอซินซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* ได้สูงสุดในระยะคงตัว (stationary phase) นอกจากนี้พบว่าสารแบคทีริโอซินที่ผลิตออกมามีความเสถียรเมื่อผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นอกจากนี้ ในปี ค.ศ. 2000 Pongsak และ Parichat ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักท้องถิ่นที่สามารถสร้างสารแบคทีริโอซินภายใต้สภาวะที่ไม่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดอินทรีย์พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกชนิด *L. lactis* subsp. *lactis* สามารถสร้างสารแบคทีริโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Listeria mesenteroides* TISTR 473 นอกจากนี้สารแบคทีริโอซินที่เชื้อสร้างขึ้นได้พบว่ามีค่ากิจกรรมสูงสุดในระยะคงตัวและกิจกรรมของสารแบคทีริโอซินไม่ลดลงเมื่อผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

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

Vermeiren และคณะ (2004) ได้รายงานว่เมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจาก ผลิตภัณฑ์เนื้อ 27 ชนิด พบว่าเชื้อ *L. sakei* ที่ได้คัดเลือกสามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินที่มีฤทธิ์ ด้านเชื้อ *L. monocytogenes*, *L. mesenteroides*, *L. carnosum* และ *Brochotrix thermosphacta* โดยพบว่าเกิดการค่อยๆรวดเร็วในระยะ lag-phase นอกจากนี้เชื้อ *L. sakei* บางไอโซเลตที่คัดเลือก ได้พบว่าให้กลิ่นและรสชาติเป็นที่ยอมรับ ด้วยเหตุนี้เชื้อ *L. sakei* อาจเป็นเชื้อที่เหมาะสมต่อการ นำไปใช้เป็นก๊อแลเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ในปี ค.ศ. 2003 Papamanoli และคณะ ได้ทำการ คัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 147 ไอโซเลตในไส้กรอกแห้ง หมักของประเทศกรีซ 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* ที่มีคุณสมบัติในการเป็นก๊อแลเชื้อจากทั้งหมด 30 ไอโซเลต จากไส้กรอกแห้งพื้นเมืองพบว่า เชื้อ *L. sakei* ทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ที่พีเอชในช่วง 4.2 ถึง 9.6 บนอาหารแข็งอะซิเตตที่เดิม โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 4 นอกจากนี้ทุกไอโซเลตเกิดกระบวนการหมักแบบ homofermentative และเชื้อ *L. sakei* ร้อยละ 97 เกิดกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลส (catalase) ในขณะที่มีเพียงร้อยละ 3 ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *L. innocua* ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้แยกเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* ซึ่งมี คุณสมบัติเป็นเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เหมาะสมต่อการนำไปผลิตเป็นก๊อแลเชื้อโพรไบโอติก สำหรับผลิตภัณฑ์ปลาหมักและในการผลิตก๊อแลเชื้อในรูปแบบแช่แข็งแห้งพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก สูญเสียการอยู่รอดในระหว่างการแช่แข็งและการทำแห้ง ดังนั้นเพื่อให้เชื้อมีการอยู่รอดสูงจึงได้ ศึกษาผลของสารป้องกันเซลล์และสูตรผสมของสารป้องกันเซลล์ชนิดต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการอยู่ รอดของเชื้อทั้งสองหลังการแช่แข็งแห้งในขั้นต่อไป

4.5 ผลของสารป้องกันเซลล์และสูตรสารป้องกันผสมต่อการอยู่รอดของเชื้อ *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

จึงอาจช่วยลดการบาดเจ็บของจุลินทรีย์ในการเผชิญสภาพเครียดขั้นแรกของการแช่แข็งแห้ง ซึ่งผลการเผชิญต่อสภาพการแช่แข็งและการทำแห้งจะทำให้จุลินทรีย์มีชีวิตรอดจำนวนลง 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 วิตามินบี (riboflavin) ธาตุเหล็ก ไทอามีน (thiamin) และไนอาซิน (niacin) อีกด้วย (Liener, 1978) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าหางนม นมถั่วเหลือง 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 ในการแช่แข็งและทำลาย liposome 2 ชนิด พบว่ากลูโคสและมอลโตส มีผลช่วยป้องกัน liposome ต่อความเย็น (cryoprotective) ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า oligomer ขนาดใหญ่ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของกลูโคสและแลคโตส ต่อการรักษาความคงตัวของ EPS liposome และ DPPC liposome หลังการแช่แข็งแห้ง โดยการศึกษาการรั่วไหลของ inner marker ขนาดของ liposome และผลการเผชิญต่อความร้อน พบว่ากลูโคสมีประสิทธิภาพในการรักษาความคงตัวของ EPC liposome ได้ดีกว่ามอลโตส

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 และยังประกอบด้วยไขมันคาร์โบไฮเดรต แคลเซียม ฟอสฟอรัส ไรโบฟลาวิน (riboflavin) ธาตุเหล็ก และไทอามิน (thiamin) และไนอาซิน (niacin) (Liener, 1978) บางทีการมีส่วนประกอบที่มีคุณค่าจำนวนมากเช่นนี้อาจช่วยป้องกันเซลล์และอาจส่งเสริมการเจริญของเชื้อหลังจากแช่แข็งแห้งให้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้การนำสารประกอบประเภทแซคคาไรด์ชนิดต่างๆซึ่งได้แก่ แลคโตส ซูโครส ทรีฮาโลส และซอร์บิทอล มาผสมร่วมกับหางนมถั่วเหลืองหรือนมถั่วเหลืองอาจช่วยเพิ่มการป้องกันเชื้อหุ้มเซลล์ 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 กรัมของน้ำหนักส่วนผสมทั้งหมด)	การอยู่รอด (ร้อยละ) ^a ± 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 ^b	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* ที่ผ่านการแช่แข็งแห้งในสารป้องกันผสมสูตรที่ 8 พบว่าเชื้อที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก เชื้อที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็น และเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับตัวมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งแห้งค่อนข้างใกล้เคียงกันคือร้อยละ 73.18, 75.46 และ 75.01 ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ในขณะที่ผลของการปรับตัวของเชื้อ *L. sakei* ต่อความดันออสโมติก และการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นในสารป้องกันผสมสูตรที่ 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* ในสารป้องกันผสมสูตรที่ 8 และ *Lactobacillus sakei* ในสารป้องกันผสมสูตรที่ 5 ที่ไม่ผ่านการปรับตัว ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก และผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นหลังการแช่แข็งแห้ง

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

^a ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง 3 ซ้ำ

^b ตัวอักษรที่ต่างกันในสคริปต์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

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) พบว่าการเติมไกลซีนบีเทนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จะทำให้เชื้อมีการลำเลียงไกลซีนบีเทนที่อยู่ในอาหารเข้าไปสะสมภายในเซลล์ 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* หลังจากผ่านการแช่แข็งแห้งคาดว่าอาจเป็นเพราะอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้การในการปรับตัวของเชื้อไม่สามารถชักนำให้เชื้อทั้งสองเกิดการตอบสนองต่อความเย็นและเกิดการสังเคราะห์ 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 ไม่ช่วยให้เชื้อมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากผ่านการแช่แข็งแห้งสูงกว่าเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับตัว

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 ผลของการปรับตัวต่อความดันออสโมติกและการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นการอยู่รอดของเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* ในกล้าเชื้อผงที่เก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

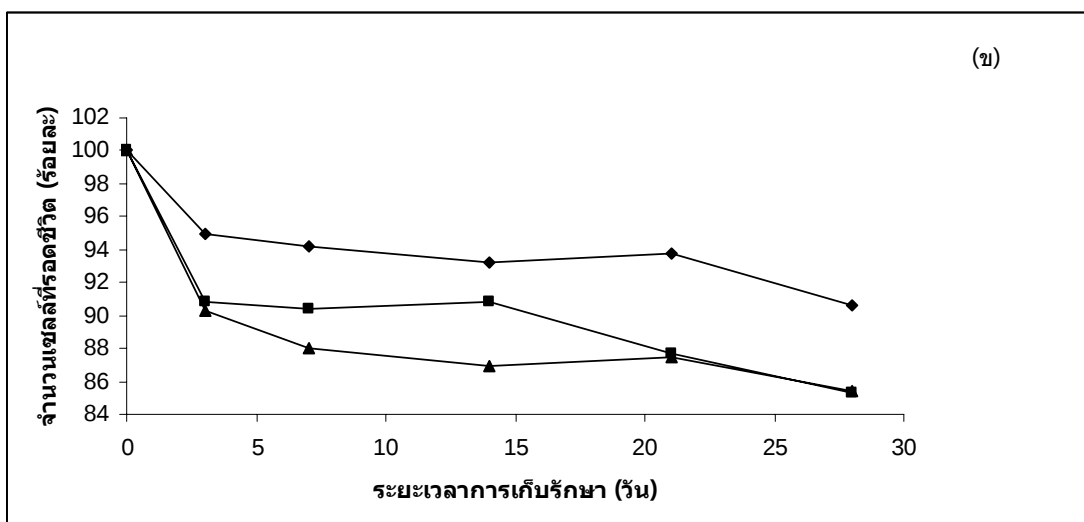
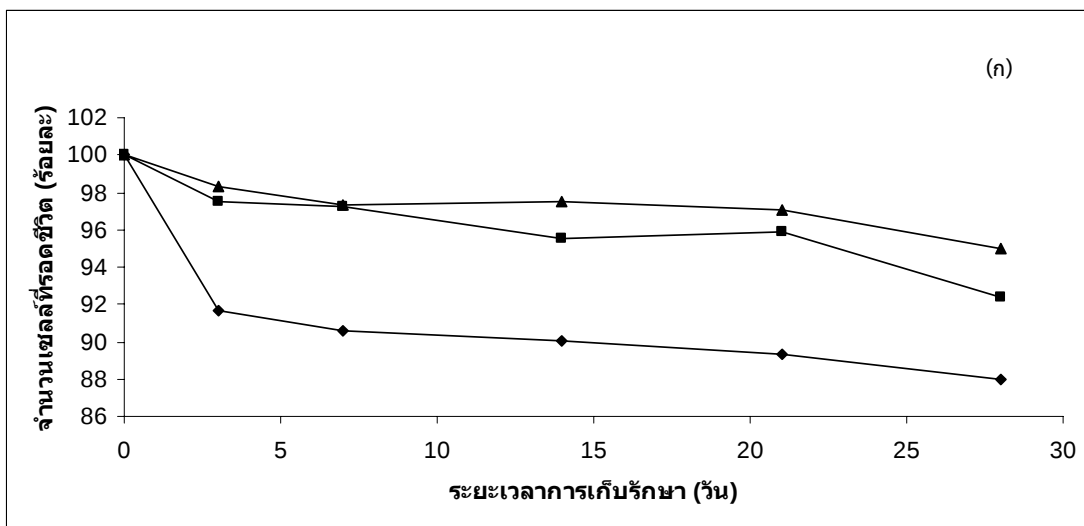
จากการศึกษาผลของการปรับตัวของ *L. lactis* ต่อความดันออสโมติกด้วยซูโครส ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ และการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ต่อการอยู่รอดของเชื้อชนิดนี้ในสารป้องกันผลสมสูตรที่ 8 หลังผ่านการแช่แข็งแห้งและเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 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 และการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นต่อการอยู่รอดของเชื้อชนิดนี้ในสูตรสารป้องกันผสมสูตรที่ 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 ($P < 0.05$) ซึ่งการลดลงของจำนวนเซลล์ทั้งสามทรีตเมนต์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรกเช่นเดียวกับเชื้อ *L. lactis* แล้วจากนั้นในช่วงวันที่ 7 ถึง 21 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตมีแนวโน้มค่อยๆ ลดลงเพียงเล็กน้อยโดยเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับตัวมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตสูงกว่าเซลล์ที่ผ่านการปรับตัวทั้งสองทรีตเมนต์ทุกช่วงเวลาของการเก็บรักษา และเมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษา (วันที่ 28) เชื้อ *L. sakei* ที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็น และผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกเพียงอย่างเดียวมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตใกล้เคียงกัน (ร้อยละ 85.41 และ 85.25 ตามลำดับ) โดยเชื้อที่ผ่านการปรับตัวทั้งสองทรีตเมนต์มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลง $\log 0.951$ และ $\log 0.948$ ตามลำดับ ซึ่งลดลงมากกว่าเชื้อที่ไม่ผ่านตัวที่มีจำนวนเซลล์ที่ลดลง $\log 0.503$ ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (รูปที่ 4.6 (ข)) ดังนั้นจะเห็นว่าการปรับตัวทั้งสองทรีตเมนต์ไม่มีผลช่วยส่งเสริมการรอดชีวิตของเชื้อ *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 Glaasker และคณะ (1996) พบว่าเชื้อ *L. plantarum* และแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นๆ เมื่อเผชิญกับสภาพที่มีความดันออสโมติกสูงจะไม่สามารถสังเคราะห์สาร compatible solute ชนิดไกลซีนบีเทน คาร์นิทีน หรือ โพรลีน ขึ้นมาเองได้ ทางเดียวที่แบคทีเรียกรดแลคติกจะสามารถอยู่รอดจากสภาพความดันออสโมติกได้คือรับสาร compatible solute เหล่านี้มาจากภายนอกเซลล์เท่านั้น และจากเหตุผลนี้เองอาจทำให้เชื้อที่ผ่านการปรับตัวและไม่ผ่านการปรับตัว จากการทดลองนี้มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งแห้งและเก็บรักษาไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงคาดว่าหากเติมสารไกลซีนบีเทน หรือ โพรลีน เพิ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความดันออสโมติกสูงด้วยซูโครสอาจ

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 แต่เมื่อเติมไกลซีนปิเพนที่มีความเข้มข้น 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 ร่วมกับ ความเย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

