ฐิติกร มหิสนันท์ : ผลของการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งต่อความเสถียรของกล้าเชื้อ (*Bacillus subtilis* SB-MYP-1) ที่เก็บรักษาด้วยแป้งถั่วเหลืองซึ่งเป็นสารปกป้องจากความเย็น (EFFECT OF FREEZE DRYING ON THE STABILITY OF STARTER CULTURE (*Bacillus subtilis* SB-MYP-1) PRESERVED WITH SOYBEAN FLOUR AS A CRYOPROTECTANT) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก, 126 หน้า.

วัตถุประสงค์ของงานวิทยานิพนธ์นี้คือ ศึกษาประสิทธิภาพการยึดเกาะ (surface attachment) ของแป้งถั่วเหลืองต่อการปกป้องเป้าหมายเซลล์ (stress target) เพื่อรักษาความเสถียรของกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* SB-MYP-1 ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งภายใต้สภาวะแบบ sub-lethal ขอบเขตการศึกษาคือ เตรียมเซลล์กล้าเชื้อ *B. subtilis* SB-MYP-1 ด้วยแป้งถั่วเหลืองความเข้มข้น 10% (w/v) โดยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เพื่อให้ได้กล้าเชื้อผงที่มีคุณสมบัติสอดคล้องตามเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพของกล้าเชื้อผง ได้แก่ การรอดชีวิต (>10^7 CFU/g powder) ความชื้น (<7 % wet basis) และปริมาณน้ำอิสระ (<0.6) รวมถึงความเสถียรภาพของเป้าหมายเซลล์กล้าเชื้อเทียบกับคุณภาพของเซลล์กล้าเชื้อสด (fresh cell starter culture) และกล้าเชื้อที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งด้วยการใช้สารปกป้องจากความเย็นทางการค้า 3 ชนิด ได้แก่ soy protein isolate (SPI) soluble starch (ST) และ maltodextrin (MD) จากนั้นติดตามศักยภาพของกิจกรรมเซลล์กล้าเชื้อผงที่มีแป้งถั่วเหลืองเป็นสารปกป้องจากความเย็น เก็บในถุงอะลูมิเนียมฟอยด์ลามิเนตสุญญากาศที่อุณหภูมิ -25 0 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 45 และ 90 วัน

ภายหลังการทำแบบแห้งแช่เยือกแข็ง พบว่า มีการยึดเกาะของแป้งถั่วเหลือง ซึ่งสามารถรักษาความเสถียรภาพของเป้าหมายเซลล์ซึ่งไม่แตกต่างกับเซลล์กล้าเชื้อสด (P>0.05) แต่ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์บางส่วนของกล้าเชื้อผงที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งด้วยการใช้สารปกป้องจากความเย็นทางการค้า 3 ชนิดนั้นถูกทำลาย และเมื่อติดตามประสิทธิภาพในการเก็บรักษากล้าเชื้อผง *B. subtilis* SB-MYP-1 ที่มีแป้งถั่วเหลืองเป็นสารปกป้องจากความเย็น ซึ่งเก็บรักษาในถุงอะลูมิเนียมฟอยด์ลามิเนตสุญญากาศที่อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส ติดตามเป็นเวลา 90 วัน ด้วยวิธีการใช้สมการทำนายด้านจุลินทรีย์ (predictive microbiological equations) พบว่าเป้าหมายเซลล์ยังคงมีความเสถียรภาพ และมีคุณสมบัติตามมาตรฐานคุณภาพกล้าเชื้อผงที่อุณหภูมิ และระยะเวลาของการเก็บรักษาซึ่งไม่แตกต่างจากการตรวจวิเคราะห์จริง (P>0.05)

เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพการทำงานของกล้าเชื้อผงในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าต้นแบบ พบว่าศักยภาพการผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และกรดแกมมาพอลิกลูตามิกในชั่วโมงที่ 36 ของการหมักถั่วเน่าไม่แตกต่างจากการใช้กล้าเชื้อสด (P>0.05)

ดังนั้นข้อมูลจากผลงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า การใช้แป้งถั่วเหลืองเป็นสารปกป้องจากความเย็นเพื่อเก็บรักษากล้าเชื้อ *B. subtilis* ด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง สามารถรักษาคุณสมบัติของกล้าเชื้อให้มีความเสถียรในสภาวะ sub-lethal ที่เป็นผลกระทบจากกระบวนการทำแห้งได้ รวมถึงศักยภาพการผลิตเมตาบอไลท์สำคัญเมื่อทำหน้าที่ในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์ถั่วเน่า ทั้งนี้สมการทำนายด้านจุลินทรีย์สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการควบคุมหรือติดตามคุณภาพกล้าเชื้อผงในระหว่างการเก็บรักษาได้เช่นกัน นอกจากนี้ต้นแบบของการใช้แป้งถั่วเหลืองเพื่อการเก็บรักษากล้าเชื้อ *B. subtilis* ด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษากล้าเชื้อที่มีสปอร์ในอุตสาหกรรมถั่วเหลืองหมักได้

ปัจจุบันผู้วิจัยได้เก็บรักษากล้าเชื้อ *B. subtilis* SB-MYP-1 ไว้ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย รหัสเชื้อจุลินทรีย์คือ TISTR 2397 เพื่อเป็นประโยชน์ในอุตสาหกรรมถั่วเหลืองหมักที่สนใจต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2559 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

THITIKORN MAHIDSANAN : EFFECT OF FREEZE DRYING ON THE STABILITY OF STARTER CULTURE (*Bacillus subtilis* SB-MYP-1) PRESERVED WITH SOYBEAN FLOUR AS A CRYOPROTECTANT. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PIYAWAN GASALUCK, Ph.D., 126 PP.

FREEZE DRYING STRESS/SOYBEAN FLOUR/CRYOPROTECTANT/ *Bacillus subtilis* SB-MYP-1 STABILITY/THUA-NAO FERMENTATION

The aim of this dissertation was to study the effective surface attachment of soybean flour to protect cell stress targets for preserving the stability of *Bacillus subtilis* SB-MYP-1 after sub-lethal stress of freeze drying. The scope of this study was to prepare the *B. subtilis* SB-MYP-1 cells with 10% (w/v) soybean flour for freeze drying, to which the gains of freeze-dried starter culture properties were accorded to the standard quality of powdered starter culture such as viability (>10^7 CFU/g powder), moisture content (<7% wet basis) and water activity (<0.6). In addition, the stability of cell stress targets was compared to the quality of fresh cell starter culture and freeze-dried starter cultures with three commercial cryoprotectant including soy protein isolate (SPI), soluble starch (ST), and maltodextrin (MD). The activities of freeze-dried cells with soybean flour cryoprotectant kept in a laminate aluminum foil vacuum bag at -25, 0, and 25°C for 0, 45, and 90 days were then monitored to determine their potentials.

After freeze drying, it was found that the surface attachment of soybean flour had occurred, which maintained the stability of cell stress targets were no different from those of the fresh cells (P>0.05), whereas, the partial cell wall and cell membrane

of freeze-dried cells with three commercial cryoprotectants were destroyed. The effective preservation of freeze-dried *B. subtilis* SB-MYP-1 with soybean flour was kept in a laminate aluminum foil vacuum bag at -25°C for 90 days, which was then monitored by predictive microbiological equations. This demonstrated that the stability of its cell stress targets was still provided and relevant to the standard quality of dried starter culture at the storage temperature and time, which were no different from the actual analysis ($P>0.05$).

The potentials of freeze-dried starter culture were then verified in a prototype of Thua-nao fermentation. It was found that the potentialities of amylase, protease and PGA production were no different from those using fresh cells at 36 h during Thua-nao fermentation ($P>0.05$).

Thus, this study revealed that using soybean flour as a cryoprotectant for preserving *B. subtilis* by freeze drying could maintain the stability of starter culture under sub-lethal effect from the drying process, as well as its potentials of significant metabolite production could function in Thua-nao fermentation. In addition, the predictive microbiological equations could be also used as a tool for controlling and monitoring the dried starter culture during storage. Furthermore, the prototype of soybean flour preserved freeze-dried *B. subtilis* could be applied to spore-forming starter cultures preservation in fermented soybean industry.

At present, the researcher has taken the *B. subtilis* SB-MYP-1 to keep at the Thailand Institute of Scientific and Technological Research with the code TISTR 2397 for future interest of the fermented soybean industry.

School of Food Technology — Student's Signature Thitikorn Mahidsanan

Academic Year 2016 — Advisor's Signature Piyawan Sasdu