รหัสโครงการ SUT3-305-60-24-04

รายงานการวิจัย

ผงสำเร็จรูปผสมกล้าเชื้อเพื่อการแปรรูปผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดองน้ำเกลือ

(Instant ingredient powder with starter culture for processing of fruits and vegetable brine pickle)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-305-60-24-04

รายงานการวิจัย

ผงสำเร็จรูปผสมกล้าเชื้อเพื่อการแปรรูปผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดองน้ำเกลือ

(Instant ingredient powder with starter culture for processing of fruits and vegetable brine pickle)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ดร.สุวิมล เจตะวัฒนะ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2559-2560

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มีนาคม 2565

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณผู้มอบทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560-2561 ที่ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี รวมทั้งขอบคุณหน่วยงานอาคารศูนย์เครื่องมือ 3 อาคารศูนย์เครื่องมือ 10 อาคารศูนย์เครื่องมือ 11 และอาคารศูนย์เครื่องมือ 14 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา ที่อนุเคราะห์สถานที่ในการวิจัยทดลอง ตลอดจนศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นแหล่งให้ข้อมูลประกอบงานวิจัยและเอกสารอ้างอิงต่างๆ เพื่อจัดทำรายงานการวิจัยเล่มนี้ให้สำเร็จได้ด้วยดี

รศ.ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก

มีนาคม 2565

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การหมักดองผักและผลไม้ให้มีความสม่ำเสมอของผลิตภัณฑ์นั้นต้องมีการควบคุมปัจจัยของกระบวนการที่มีผลต่อการทำงานของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ผลิตสารยับยั้ง (Inhibitory metabolites) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารถนอมอาหารจากธรรมชาติ (Food biopreservatives) จากงานวิจัยที่ผ่านมาที่ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากผักและผลไม้รสเปรี้ยวจำนวน 2 ไอโซเลท (NCR7 และ NCR12) ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียแล็กติก ในการวิจัยนี้ได้นำแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 2 ชนิด ทำการคัดเลือกและจัดจำแนกในระดับชนิด (Species) ด้วยชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูปแบบ API 50 CHL พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranium* ร้อยละ 99.90 และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ละ 99.90 จึงนำมาผลิตเป็นกล้าเชื้อผงสำเร็จรูปด้วยการใช้ sodium chloride และ maltodextrin เป็นสารปกป้องจากความเย็นโดยเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีการระเหิดแห้ง พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ sodium chloride 15 20 (%w/v) และ maltodextrin 30 (%w/v) ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการผลิต (% yield) ของผงแห้งคือ 92 94 และ 90 (% yield) และปริมาณน้ำอิสระไม่เกิน 0.4 หลังจากนั้นนำไปทดสอบคุณสมบัติของกล้าเชื้อ พบว่าหลังจากผ่านกระบวนการการทำแห้งด้วยวิธีการระเหิดแห้ง มีกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides/dextranium* และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp *delbrueckii* หลงเหลือ 8-10 log cfu/g เมื่อทดสอบคุณสมบัติของกล้าเชื้อผงสำเร็จรูปในสภาวะจำลองการดองเกลือ (brine) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แบบ facultative anaerobe ปรับความเข้มข้นของน้ำเกลือเป็น 5 6 7 และ 8 %(w/v) ร่วมกับการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ในระดับ pH 2 และ 4 และศึกษาอายุการเก็บรักษาของผงสำเร็จรูปกล้าเชื้อสำหรับแปรรูปผักผลไม้ดองโดยใช้บรรจุภัณฑ์คือถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ มีอายุการเก็บรักษาอย่างน้อย 3 เดือนที่อุณหภูมิ 15 และ 25 องศาเซลเซียส จึงได้นำกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides/dextranium* ทดสอบคุณสมบัติความคล้ายคลึงกันของยีน 16S rRNA บางส่วน (partial sequence) พบว่ากล้าเชื้อดังกล่าวมีคุณสมบัติของการเป็นกล้าเชื้อ *Leuconostoc pseudomesenteroides* จากฐานข้อมูล GenBank ที่ accession number LC223100 อ้างอิงจากฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) ยืนยันได้ว่าในกระบวนการวิจัยกล้าเชื้อผงสำเร็จรูป *Leuconostoc mesenteroides* ssp. นี้สามารถนำไปใช้ในการเป็นกล้าเชื้อผงสำเร็จรูปที่ใช้งานง่าย สะดวกและมีความปลอดภัยสำหรับการหมักดองผักและผลไม้

Abstract

Food bio-preservative agents can be produced by Lactic acid bacteria (LABs). These staters can control desirable factors of fermented fruit and vegetable quality. Previous research revealed that two LABs were isolated from sour fruits and played an important role of starter culture. In present, to identify the microbial species by API 50 CHL, their similarity of NCR-7 and NCR-12 were approximately 99.90, which were relevant to *Leuconostoc mesenteroides* ssp. mesenteroides/dextranium and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Delbrueckii*, respectively. Those isolates were then preserved by freeze dried with sodium chloride and maltodextrin. The suitable conditions, including 15, 20 (% w/v), and 30 (% w/v), were achieved based on the percentage of yield 92 and 94, and 90, respectively, as well as water activity was about < 0.4. To evaluate the potential of freeze-dried culture under acidic brine conditions (5-8 %w/v NaCl, pH 2 and 4 for 35°C), the viability was approximately 8-10 log cfu/g. After that, freeze-dried culture was kept in aluminum foils for evaluating the shelf-life at 15 °C and 25 °C for 3 months. In addition, 16S rRNA sequencing was partially identified and its similarity (100%) was *Leuconostoc pseudomesenteroides* based on GenBank (accession number LC223100). As results, *Leuconostoc mesenteroides* could be used as a promising freeze-dried starter for producing fermented fruit and vegetable products.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	4
ผู้ใช้ประโยชน์จากการวิจัย	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
แหล่งที่มาของข้อมูล	10
วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล	10
- การจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHL medium	10
- การผลิตกล้าเชื้อผงสำเร็จรูป *Leuconostoc mesenteroides* ssp. และ *Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii*	11
- การศึกษาการเจริญและกิจกรรมของกล้าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวภายใต้สภาวะความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และความเป็นกรดสูง	12
- วิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ 16s rRNA ด้วยวิธี sequencing	13
วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล	14
บทที่ 3 ผลการวิจัย	
การทดสอบจำแนกชนิดของกล้าเชื้อแบคทีเรียแล็กติกด้วยการคัดเลือกและจัดจำแนกในระดับชนิด (Species) ด้วยชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูปแบบ API 50 CHL	15

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

การผลิตกล้าเชื้อผงสำเร็จรูปแบคทีเรียแล็กติกและทดสอบคุณภาพของกล้าเชื้อแบคทีเรีย แล็กติก *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *Lactobacilludelbrueckii* ssp *delbrueckii* และ *Lactobacillus lactis* ssp. *Lactis*1 16

กิจกรรมการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญในการหมัก และความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซิน ของกล้าเชื้อผงสำเร็จรูป 21

อายุการเก็บรักษาของกล้าเชื้อสำเร็จรูปแบคทีเรียแล็กติก *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* 32

ผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rDNA 33

บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ 34

สรุปผลการวิจัย 34

ข้อเสนอแนะ 35

บรรณานุกรม 36

ประวัติผู้วิจัย 38

ภาคผนวก 46

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองจากผักและผลด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก................................	6
2.2	แบคทีเรียกรดแล็กติกที่บทบาทสำคัญในการหมักดอง...	7
3.1	สัดส่วนของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR...	14
3.2	สภาวะ PCR ด้วยไพร์เมอร์ 27F/1492R เพื่อเพิ่มปริมาณยีนช่วง 16s............................	14
4.1	ประสิทธิภาพความสามารถของการเป็นสารปกป้อง (cryoprotectant) กล้าเชื้อแบคทีเรียแล็กติก *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii*..	17
4.2	ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ pectinaseของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ที่สภาวะความเข้มข้นสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	22
4.3	ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ cellulase ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ที่สภาวะความเข้มข้นสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)..	22
4.4	ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ pectinase ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ที่สภาวะความเป็นกรด.......................................	23
4.5	ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์cellulaseของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ที่สภาวะความเป็นกรด...	24
4.6	ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *E.coli* ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ที่สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)...	25
4.7	ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *Salmonella* sp. ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ที่สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	25
4.8	ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *E. coli* ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ที่สภาวะความเป็นกรด.......................................	26

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.9	ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *Salmonella* sp. ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ที่สภาวะความเป็นกรด..........	26
4.10	ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ pectinaseของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ที่สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)..........	27
4.11	ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ cellulase ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ที่สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)...........	28
4.12	ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ pectinase ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ที่สภาวะความเป็นกรด..	28
4.13	ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ cellulase ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ที่สภาวะความเป็นกรด..	29
4.14	ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *E.coli* ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ที่สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)...........	30
4.15	ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *Salmonella* sp. ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ที่สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl).............	30
4.16	ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *E.coli* ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ที่สภาวะความเป็นกรด..	31
4.17	ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *Salmonella* sp. ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ที่สภาวะความเป็นกรด..	31
4.18	ปริมาณกล้าเชื้อสำเร็จรูปแบคทีเรียแล็กติก *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ที่มีชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 6 เดือน............	32
4.19	การทดสอบความคล้ายคลึงของช่วงยีน 16S rRNA บางส่วน (partial sequence) ของกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. mesenteroides/dextranicum ที่อุณหภูมิ -25^{O}C โดยเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information)..	33

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
4.1	ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแล็กติก *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranium* ด้วยชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูปแบบ API 50 CHL medium	15
4.2	ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแล็กติก *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ด้วยชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูปแบบ API 50 CHL medium	116
4.3	อัตราการเจริญเติบโต (Growth rate) ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ภายใต้สภาวะความเข้มข้นต่างๆ ของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	19
4.4	อัตราการเจริญเติบโต (Growth rate) ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ภายใต้สภาวะความเป็นกรด	19
4.5	อัตราการเจริญเติบโต (Growth rate) ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ภายใต้สภาวะความเข้มข้นสารละลายโซเดียม (NaCl)	20
4.6	อัตราการเจริญเติบโต (Growth rate) ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ภายใต้สภาวะความเป็นกรด	20

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองจากผักและผลไม้ เป็นผลิตภัณฑ์ประเภทหนึ่งที่เกิดจากกรรมวิธีแปรรูปโดยไม่จำเป็นต้องอาศัยเทคโนโลยีขั้นสูง เพื่อถนอมรักษา ยืดอายุการเก็บรักษา และผลิตขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ ที่มีอยู่มากมายหลายชนิดตามแต่ละท้องถิ่น ภูมิภาค รวมถึงประเทศต่างๆ ที่มีวัตถุดิบประเภทผักและผลไม้ที่แตกต่างกัน ทำให้มีกรรมวิธีในการดองแตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่เกิดจากการหมักของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Microflora) ของผักและผลไม้ชนิดนั้นๆ โดยแบคทีเรียกรดแล็กติกจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสชาติและกลิ่นรสเฉพาะตัวแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังสามารถผลิตสารได้หลายชนิดซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร เช่น กรดอินทรีย์ (Organic acids) คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) เอทานอล (Ethanol) ไดอะซีทิล (Diacetyl) สารยับยั้งโมเลกุลต่ำ และแบคเทอริโอซิน (Bacteriocins) เป็นต้น จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียแลคติกมีความสำคัญต่อกระบวนการแปรรูปด้วยกรรมวิธีการดอง แบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีความสำคัญต่อผลิตภัณฑ์ผักผลไม้ดองได้แก่ *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, *L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *Leuconostoc fallax* และ *L. mesenteroides* (Manas Ranjan Swain et al., 2014) เป็นต้น อย่างไรก็ตามในระหว่างกระบวนการหมักดองยังคงมีจุลินทรีย์ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา รวมทั้งสารพิษเกิดขึ้น ในอดีตได้มีการศึกษากระบวนการดองแตงกวาในน้ำเกลือเข้มข้น 2.3% (W/V) ที่มีแบคทีเรียกรดแล็กติกและไม่มี พบว่าผลิตภัณฑ์แตงกวาดองที่ไม่มีแล็กติกตรวจพบ botulinum toxin และ *Clostriduim* และพบว่าปริมาณความเข้มข้นของเกลือที่เติมในกระบวนการดอง มีความเข้มข้นไม่เพียงพอต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหาร (Fleming et al., 1989) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเมื่อกระบวนการดองแตงกวาผ่านไประยะหนึ่ง กิจกรรมของแบคทีเรียกรดแล็กติก และกรดแล็กติกที่ถูกสร้างจะถูกย่อยสลายให้มีขนาดเล็กโดยยีสต์ที่สามารถเจริญได้จะอาศัยอยู่บริเวณผิวหน้าด้านบน เนื่องจากต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ได้แก่ *Pichia manshurica* และ *Issatchenkia occidentalis* ซึ่งจัดว่าเป็น spoilage yeast (Wendy Franco et al., 2011) จะเห็นได้ว่าการผลิตผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดองจึงต้องอาศัยกิจกรรมและสารเมทาบอไลท์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีประสิทธิภาพร่วมกับความเข้มของสารกันเสีย (preservatives) ที่เพียงพอต่อการยับยั้งหรือลดปริมาณการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์ รา และสารพิษจากจุลินทรีย์ และนอกจากนี้กระบวนการหมักดองโดยธรรมชาติอาจจะมีความเข้มข้นเริ่มต้นของแบคทีเรียไม่เพียงพอ ส่งผลให้กิจกรรมและสารเมทาบอไลท์ต่างของแบคทีเรียกรดแล็กติกไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการทำลายหรือลดอันตรายทางชีวภาพ (Biological hazard) ให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัย

ดังนั้นผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญของการควบคุมกระบวนการผลิตที่จะต้องอาศัยสาร preservatives ที่มีความเข้มข้นเพียงพอร่วมกับแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำไปใช้ในกระบวนการดองผักผลไม้ จากงานวิจัยที่ผ่านมาที่ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากผักและผลไม้รสเปรี้ยว ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *Lactobacillus delbrueckii* ssp *delbrueckii* และ *Lactobacillus lactis* ssp. *Lactis1* และได้ทำการศึกษาทดสอบกิจกรรมและคุณสมบัติในการเป็นกล้าเชื้อที่ในการผลิตสารเมทาบอไลท์ที่สำคัญต่อกระบวนการหมักดอง สารแบคเทอริโอซิน และสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (Spoilage bacteria) ผู้วิจัยจึงให้ความสำคัญต่อกระบวนการผลิตที่จะต้องสามารถควบคุมแบคทีเรีย ยีสต์ รา สปอร์และหรือเอ็นโดสปอร์ และสารพิษจากจุลินทรีย์ ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิต ตลอดจนผลิตภัณฑ์สุดท้าย เนื่องจากวัตถุดิบที่นำแปรรูปเป็นผักผลไม้ ที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนดังกล่าว และ preservative เดิมถูกนำไปใช้ในกระบวนการหมักดองโดยธรรมชาติอยู่แล้ว ซึ่งที่นิยมนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดอง ได้แก่ sodium chloride นอกจากนั้นยังได้ทำการศึกษาและวิเคราะห์ความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิต ที่เปลี่ยนแปลงสภาวะให้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร ยีสต์ และรา รวมทั้งสภาวะที่กระตุ้นในจุลินทรีย์เหล่านั้นผลิตสารพิษออกมา ผลจากศึกษาและวิเคราะห์ความเสี่ยง พบว่า(1) *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli, Salmonella* spp. เป็นแบคทีเรียที่มีโอกาสปนเปื้อนตั้งแต่เริ่มกระบวนการหมักและเนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (2) *Clostridium perfringens, Listeria monocytogenes*, และ *Clostriduim terium* เป็นแบคทีเรียที่ทนต่อสภาวะความเป็นกรด และหากความเข้มข้นของ sodium chloride ไม่เพียงพอ เมื่อระยะเวลาการหมักดองหรือกิจกรรมของแบคทีเรียกรดแล็กติกและสารที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแล็กติกลดลง จะทำให้สามารถเจริญเติบโตได้ และผลิตสารพิษในที่สุด ดังนั้นจะต้องควบคุมและติดตามทั้งในรูปแบบของตัวเซลล์และสารพิษ (endotoxin) ที่ผลิตจากเชื้อเหล่านี้ (3) สปอร์โดยแบคทีเรีย *Clostridium botulinum Clostridium perfringens* และ *Bacillus cereus* ทนความร้อนได้สูง เมื่อมีการสร้างสปอร์ระหว่างการหมักขึ้นมา จะต้องควบคุมตั้งแต่เริ่มกระบวนการไปจนถึงผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยทั่วไปกรรมวิธีในการฆ่าเชื้อในระดับ pasterurization ที่มีการให้ความร้อนต่ำประมาณ 77-74 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-25 นาที ไม่เพียงพอต่อการทำลายสปอร์หรือเอ็นโดสปอร์ของเชื้อเหล่านี้

ดังนั้นในการลดระดับความเสี่ยงเหล่านี้จะต้องอาศัยกิจกรรมของแบคทีเรียกรดแล็กติกร่วมกับ sodium chloride (preservative) ที่เพียงพอต่อกระบวนการแปรรูปและรักษาสมดุลการทำงานของแบคทีเรียแล็กติก จึงนำเอาแบคทีเรียแล็กติกทั้ง 2 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตสารสำคัญที่กล่าวในข้างต้นและสามารถเจริญและอยู่รอดในสภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ความเป็นกรดสูง และนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผักและผลไม้ดองได้จริง เพื่อให้เกิดการนำผลิตภัณฑ์ผักผลไม้ดองไปผลิตและแปรรูปในเชิงพาณิชย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สะดวก และมีความปลอดภัย และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการหมักดองผักผลไม้ได้หลายชนิด งานวิจัยนี้จึงนำแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ได้ทำการคัดเลือกและจัดจำแนกใน

ระดับชนิด (Species) ด้วยชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูปแบบ API 50 CHL มาทำการทดสอบยืนยันการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยยีน 16S rRNA โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์และฐานข้อมูลทางชีวภาพ พร้อมทั้งศึกษาปัจจัยความเข้มข้นของเกลือ กรด-ด่าง สภาวะไร้อากาศ และอุณหภูมิ โดยการจำลองสภาวะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกตามสภาวะการผลิตผักผลไม้ดอง ความสามารถในการผลิตสารเมทาบอไลท์รวมถึงแบคเทอริโอซิน ที่มีประสิทธิภาพในการในการทำลายหรือยับยั้งในระดับ fungicidal bactericidal และ bacteriostatic นอกจากนี้มีการศึกษาประสิทธิภาพกิจกรรมของแบคทีเรียแล็กติกดังกล่าวร่วมกับ sodium chloride (preservative) ที่ความเข้มที่เพียงพอต่อการยับยั้งหรือลดความเสี่ยงที่กล่าวไว้ในข้างต้นได้ตลอดจนสิ้นสุดกระบวนการผลิต โดยความเข้มข้น sodium chloride ที่ศึกษาจะต้องสามารถปักป้องรักษาให้แบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถแสดงกิจกรรมและคุณสมบัติในการดองผักผลไม้ได้ และเป็นความเข้มข้นที่สามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสม (Ingredients) ที่ให้รสชาติ คุณสมบัติทางกายภาพที่ดีต่อผลิตภัณฑ์ โดยสามารถนำไปใช้งานได้สะดวกในรูปแบบผงสำเร็จรูป นำไปเติมในการหมักดองกับผักผลไม้ได้โดยไม่จำเป็นจะต้องเติมส่วนผสมอื่นๆ โดยผงสำเร็จรูปจะต้องยังคงประสิทธิของการเป็นทั้งกล้าเชื้อ ที่ได้คุณภาพ ความปลอดภัยจากจุลิทรีย์ สปอร์ สารพิษจากจุลินทรีนย์ โดยเฉพาะในกลุ่มที่มีความเสี่ยงที่สามารถเจริญและอยู่ในสภาวะที่เป็นกรด โซเดียมคลอไรด์ และในสภาวะที่มีอากาศเล็กน้อยไปจนถึงสภาวะที่ไม่มีอากาศ

2.วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1) ยืนยันสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแล็คติกที่ผ่านการทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพ คุณภาพ ในการเป็นกล้าเชื้อที่ดีในการผลิตผักและผลไม้ดอง

2) ได้ผงสำเร็จรูปเพื่อการแปรรรูปผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดองน้ำเกลือทั้งในรูปแบบกล้าเชื้อผงและกล้าเชื้อเดี่ยว ที่มีประสิทธิภาพคุณภาพ และ เช่นเดียวกับการใช้เชื้อสด

3.ขอบเขตของโครงการวิจัย

คัดเลือกและจัดจำแนกในระดับชนิด (Species) แบคทีเรียแล็กติกด้วยชุดจำแนกแบคทีเรียแล็กติกสำเร็จรูปแบบ API 50 CHL จากนั้นนำแบคทีเรียกรดแล็กติกนี้ไปทดสอบคุณสมบัติ กิจกรรม และรูปแบบการเจริญ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและสภาวะความเข้มข้นของ sodium chloride 5-8% (w/v) และความเป็นกรด pH2-5 ติดตามผล ณ เวลา 0, 6, 12, 18, 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์ ความสามารถในการผลิต crude bacteriocin ความสามารถในการยับยั้งหรือทำลาย *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. ค่าความเป็นกรด – ด่าง ความเข้มข้นของเกลือ รวมถึงการทดสอบกิจกรรม enzyme activity แล้วนำแบคทีเรียที่ผ่านยืนยันและทดสอบกิจกรรมการเป็นกล้าเชื้อที่ดีที่สุดไปพัฒนาผลิตผงสำเร็จกล้าเชื้อสำหรับแปรรูปผักและผลไม้ดองด้วย Freeze-drying สารละลาย sodium chloride 5-8 %(w/v) และนำผงสำเร็จรูป

กล้าเชื้อสำหรับแปรรูปผักผลไม้ดอง นำไปทดสอบ ความชื้น (moisture) ค่า a_w อัตราการอยูรอด ทดสอบคุณสมบัติการผลิตเอ็นไซม์ cellulase และ pectinase ด้วยวิธี Agar well diffusion อัตราการเจริญของเชื้อ คุณสมบัติการผลิต crude bacteriocin ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ด้วยวิธี Agar well diffusion โดยศึกษาคุณสมบัติดังกล่าวในอาหารเหลว MRS ในสภาวะปกติ และสภาวะที่ปรับค่า pH 2 และ 4 ร่วมกับความเข้มข้นของ sodium chloride 5-8% (w/v) และทดสอบคุณสมบัติข้างต้นในน้ำเกลือ (Brine) ที่จำลองสภาวะการดอง คือ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไม่มีอากาศ และมีการปรับความเข้มข้นของน้ำเกลือ 5-8% ร่วมกับการปรับ pH 2, 3, 4 และ 5 นำไปทดสอบกิจกรรม การผลิตสารต่างๆ (ดังที่กล่าวแล้วในข้างต้น) คัดเลือกกล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพที่สุดไปทำการยืนยันและวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA (16S rRNA gene sequencing) และการทดสอบหาอายุการเก็บรักษาของผงดองสำเร็จรูป (Shelf life) เพื่อระบุความเป็นไปได้ของการใช้งานจริง

4.ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ผลิตกล้าเชื้อแบคทีเรียแล็กติกผงสำเร็จรูปที่มีคุณสมบัติในการเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการดองผักผลไม้ ให้อยู่ในรูปที่ใช้งานได้ง่าย สะดวก มีคุณภาพเป็นไปตามมาตรฐานกำหนดและมีความปลอดภัย

5.ผู้ใช้ประโยชน์จากการวิจัย

(1) นักวิชาการที่ทำวิจัยเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองประเภทผักและผลไม้

(2) กลุ่มประชากรเป้าหมายที่ผลิตอาหารหมักดองทั้ง SME และ SML ที่สามารถใช้ต้นแบบกล้าเชื้อผงสำเร็จรูปในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อควบคุมกระบวนการผลิตผักผลไม้ดองในน้ำเกลือให้มีมาตรฐาน

(3) กลุ่มผู้บริโภคอาหารหมักดอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดอง (Pickling) เป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักกรดแลคติก (Lactic acid fermentation) ตัวอย่างเช่น กะหล่ำปลีดอง ผักกาดเขียวดอง แตงกวาดอง หน่อไม้ดอง ลูกแพร์ดอง มะกอกดอง และลูกฟิก เป็นต้น โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้อง คือ แบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria) ทำให้ปัจจุบันมีผู้ศึกษาค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแล็กติก ที่เกี่ยวข้องหรือสามารถนำมาประยุกต์ในกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์ผักผลไม้ดอง จึงมีการศึกษาคัดแยกแบคทีเรียแล็กติกจากผักผลไม้และนำไปพัฒนาเป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์ (Starter culture) ที่สามารถเพาะขึ้นเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักดอง โดยลักษณะที่ต้องการของกล้าเชื้อคือ ต้องแข็งแรงและอยู่ในระยะที่กำลังเจริญอย่างรวดเร็ว ซึ่งในปัจจุบันกระบวนการหมักโดยใช้สตาร์ทเตอร์นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ ที่มีการควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการหมัก ทำให้ได้ผลิตผลที่ต้องการในปริมาณสูงและมีคุณภาพสม่ำเสมอ จึงมีการนำกล้าเชื้อมาใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง ดังจะเห็นได้จากตารางที่ 2.1 ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกล้วนเป็นจุลินทรีย์ที่นำไปใช้ในกระบวนการหมักดองในผักผลไม้ พบว่า *Leuconostoc mesenteroides Lactobacillus delbrueckii* และ *Lactobacillus lactis* เป็นแบคทีเรียที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการหมักดองผักผลไม้หลายๆ ชนิด ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับผลการศึกษาวิจัยของผู้วิจัย ประโยชน์ของการนำแบคทีเรียกรดแล็กติกเหล่านี้ไปใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมักดอง ดังนี้ (1) เพื่อเป็นการพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง รวมถึงอาหารพื้นบ้านของไทย (2) เป็นการทำให้เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์ กรดแลคติกที่ได้เป็นชนิดที่ร่างการมนุษย์นำไปใช้ ช่วยในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อโรคที่เป็นอันตราย เช่น ท้องเดิน ท้องเสีย เป็นต้น (3) เป็นการควบคุมการผลิตสินค้า การขนส่งได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถใช้วัตถุดิบได้อย่างมีคุณค่า (4) เพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคอาหารประเภทการหมักดอง (5) การควบคุมกระบวนการหมักด้วยเทคโนโลยีต้นเชื้อบริสุทธิ์เป็นการทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีคุณภาพที่สม่ำเสมอ สามารถลดโอกาสล้มเหลวของกระบวนการหมัก ซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิตได้ นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (Generally recognized as safe bacteria; GRAS status)

ตารางที่ 2.1 ผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองจากผักและผลด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก

Fermented food product	Country	Fruit and vegetables	Other ingredients	Microorganisms
Burong mustala	Philippines	Mustard leaf	Rock salt	*L. brevis* *Pediococcus cerevisiae*
Ca muoi	Vietnam	Eggplant		*L. fermentum* *L. pentosus* *L. brevis*
Dakguadong	Thailand	Mustard leaf	Salt	*L. plantarum*
Dhamuoi	Vietnam	Cabbage, various vegetables		*Leuconostoc mesenteroides* *L. plantarum*
Dua muoi	Vietnam	Mustard or beet	Onion, sugar, and salt	*L. fermentum* *L. pentosus* *L. plantarum* *P. pentosaceus*
Gundruk	Nepal, India	Cabbage, radish, mustard, cauliflower	No	*Pediococcus and Lactobacillus spp.*
Inziangsang	India	Mustard leaf	No	*L. plantarum* *L. brevis,* *Pediococcus acidilactici*
Jiang-gua	Taiwan	Cucumber	Salt	*Weissella cibaria* *W. hellenica* *L. Plantarum* *Leuconostoc lactis* *Enterococcus casseliflavus*
Khalpi	Nepal	Cucumber	No	*L. plantarum* *P. pentosaceus*
Kimchi	Korea	Cabbage, radish, various vegetables	Garlic, red pepper, green onion, ginger, and salt	*Leuconostoc mesenteroides* *L. brevis* *L. plantarum* *L. sakei*
Nozawana-Zuke	Japan	Turnip		*L. curvatus*
Olive	Spain, Italy	Olive	Salt	*L. plantarum* *L. brevis* *L. pentosus* *P. cerevisiae* *L. mesenteroides*
Pak-Gard-Dong	Thailand	Mustard leaf	Salt and sugar solution	*L. brevis* *P. cerevisiae* *L. plantarum*

ที่มา: Manas Ranjan Swain และคณะ (2014)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) ผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองจากผักและผลด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก

Fermented food product	Country	Fruit and vegetables	Other ingredients	Microorganisms
Pak-sian-dong	Thailand	Leaves of Pak-sian (Gynadropsis pentaphylla)	Brine	*L. brevis* *P. cerevisiae* *L. plantarum*
Paocai	China	Cabbage, celery, cucumber, and radish	Ginger, salt, sugar, hot red pepper	*L. pentosus,* *L. plantarum* *Leuconostoc mesenteroides* *L. brevis* *L. lactis* *L. fermentum*
Pobuzihi	Taiwan	Cummingcordia	Salt	*Lactobacillus pobuzihii,* *L. plantarum* *W cibaria* *W. paramesenteroides* *P. pentosaceus*
Sauerkraut	International	Cabbage	Salt	*L. mesenteroides* *L. plantarum* *L. brevis* *L. rhamnosus* *L. plantarum*
Sayur asin	Indonesia	Mustard, cabbage	Salt, Liquid from boiled rice	*L. mesenteroides* *L. confuses* *L. plantarum* *P. pentosaceus*
Sinki	India, Nepal, and Bhutan	Radish	No	*L. plantarum* *L. brevis* *L. fermentum* *L. fallax* *P. pentosaceus*
Soidon	India	Bamboo Shoot	Water	*L. brevis* *L. fallax* *L. lactis*
Suan-tsai	Taiwan	Chinese cabbage, cabbage, Mustard leaves	Salt	*P. pentosaceus* *Tetragenococcus halophilus*
Sunki	Japan	Leaves of otaki-turnip	Wild apple	*L. plantarum* *L. brevis* *P. pentosaceus* *Bacillus coagulans*
Tempoyak	Malaysia	Duriyan (Durio zibethinus)	Salt	*L. brevis* *L. mesenteroides* *Lactobacillus mali* *L. fermentum*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

จากที่กล่าวมาข้างต้นทำให้ทราบถึงประโยชน์ของการนำกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกไปใช้ในการแปรรูปผักและผลไม้ดอง อย่างไรก็ตามในกระบวนการแปรรูปดังกล่าวยังต้องมีการเติมส่วนผสมอื่นๆ เช่น เกลือ น้ำตาล น้ำส้ม เป็นต้น ทำให้เกิดความยุ่งยาก ดังนั้นหากมีการพัฒนาให้มีกล้าเชื้อสำเร็จรูปที่มีส่วนผสมที่ใช้ในการหมักดอง โดยไม่จำเป็นจะต้องเติมเกลือหรือสารอื่นๆ สามารถเติมส่วนผสมสำเร็จรูปนี้ลงไปในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อและผักผลไม้ได้เลย เป็นอันเสร็จสิ้นกระบวนการ หลักการพัฒนานี้อาศัยหลักการจากกระบวนการแปรรูปกล้าเชื้อผง ในปัจจุบันการผลิตหัวเชื้อผงส่วนใหญ่จะใช้วิธี freeze-drying เนื่องจากเป็นกระบวนการทำแห้งภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันต่ำ ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์แบคทีเรียน้อยที่สุด จึงช่วยให้ผลิตภัณฑ์คงคุณค่าทางโภชนาการ เนื้อสัมผัส สี กลิ่น และรสชาติ ได้ใกล้เคียงกับของสด (Diana Berner and Helmut Viernstein, 2006) นอกจากกระบวนทำแห้งด้วยวิธี freeze-drying จะส่งผลกระทบต่อเซลล์น้อยแล้วสารหรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่จะนำไปใช้เป็นสารปกป้องเซลล์ยังส่งผลโดยต่ออัตราการรอด (Viability of microbial cells) หลังกระบวนการทำแห้ง (Carvalho et al., 2004) และอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่นำมาผ่านกรรมวิธีการทำแห้งด้วยวิธีนี้ยังขึ้นกับความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์หรือสปอร์เช่นกัน (Morgan et al., 2006) ผู้วิจัยได้นำหลักการเหล่านี้มาปรับและประยุกต์เพื่อนำเอาวิธี freeze-drying มาใช้ในการผลิตผงสำเร็จรูป โดยมีการปรับเปลี่ยนสารที่ทำหน้าที่เป็นสารปกป้องเซลล์ (Cryoprotectants) ให้มีความเหมาะสมในด้านการเป็นสารปกป้องเซลล์จากกระบวนการแปรรูปและสามารถเป็นสารผสมสำเร็จรูปในการดอง ซึ่งพบว่ามีงานวิจัยที่ศึกษาชนิดของสารปกป้องเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่ม Lactobacili ที่ผ่านกรรมวิธี Freeze-drying ได้แก่ glycerol sorbitol และ manitol เป็นต้น (Ross et al., 2005) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการอยู่รอด และเสถียรภาพการเป็นสารปกป้องเซลล์ของ *Lactobacilus acidophilus* ATCC4962 โดยสารปกป้องเซลล์ที่ทำการศึกษา คือ sodium chloride, sucose, dextran, sorbitol, monosodium glutamate, glycerol, skim milk, skim milk with malt extract และ modified De-man Rogosa ผลการศึกษาพบว่า skim milk มีประสิทธิภาพดีที่สุด และ Sodium chloride ยังคงมีประสิทธิภาพในการเป็นสารปกป้องเซลล์ที่ยังคงอยู่รอดหลังกระบวนการมากกว่า 9.2 Log cfu/g (Hassan Pyar and Kok-khiang peh, 2014)

จากการค้นคว้างานวิจัยข้างต้นเห็นว่าหนึ่งในสารปกป้องเซลล์ที่ถูกนำมาใช้ คือ sodium chloride ซึ่งสารดังกล่าวจัดเป็นส่วนผสมสำคัญในกระบวนการแปรรูปผักและผลไม้หมักดอง ด้วยวิธีการดองด้วยน้ำเกลือ (Brined fruit and vegetable pickles) เป็นวิธีการที่นิยมใช้กับผักหรือผลไม้ที่มีความชื้นน้อย เช่น แตงกวาดองในน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 5-8 (Maki, 2004) สำหรับมะกอกเขียว มะเขือยาว กะหล่ำปลี ขิง กระเทียม และมะม่วงใช้ความเข้มข้นของน้ำเกลือร้อยละ 6 (Kacem and Karam, 2006; Tanganurat et al., 2009) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำ แบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ไอโซเลท (*Leuconostoc mesenteroides Lactobacillus delbrueckii* และ *Lactobacillus lactis*) มาทำการยืนยันสายพันธุ์

ในระดับสปีชีส์ (16s rRNA) พร้อมทั้งทำการทดสอบประสิทธิภาพในการอยู่รอด (% viability) การเจริญเติบโต (growth rate) ความสามารถในการผลิตสารเมทาบอไลท์ การผลิตแบคเทอริโอซินในสภาวะความกรดและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ระดับความรุนแรงการทำลายเซลล์ สปอร์ และสารพิษจากจุลินทรีย์ ในกลุ่มที่สามารถเจริญและอยู่รอดในสภาวะการผลิตผักผลไม้ดอง รวมถึงการนำแบคทีเรียแลคติกไปพัฒนาเป็นผงสำเร็จรูปที่ใช้เป็นส่วนผสมในการดอง คือ โซเดียมคลอไรด์ เพื่อเป็นลดกระบวนการผลิต ทำให้สามารถใช้งานได้ง่าย และพัฒนาให้มีความปลอดภัย มีคุณภาพเทียบกับการเติมกล้าเชื้อ ในน้ำเกลือที่ใช้ในการดองผัก ผลไม้

ผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดองที่เกิดจากการหมักชนิดให้กรดแลคติก แบ่งออกเป็น 3 ประเภทคือ การดองด้วยเกลือแห้ง (Dry salted pickles) การดองด้วยน้ำเกลือ (Brined fruit and vegetable pickles) และการดองแบบไม่เติมเกลือ (Non salted lactic acid bacteria product) (Subhadrabandhu, 2001) ส่วนใหญ่นิยมบริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีการดองด้วยน้ำเกลือ เช่น แตงกวาดองในน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 5-8 (Maki, 2004) สำหรับมะกอกเขียว มะเขือยาว กะหล่ำปลี ขิง กระเทียม และมะม่วงใช้ความเข้มข้นของน้ำเกลือร้อยละ 6 (Kacem and Karam, 2006; Tanganurat et al., 2009) จากข้างต้นจะเห็นว่าความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 5-8 เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการหมักดองผักและผลไม้ และจากวิจัยหรือมาตรฐานผลิตภัณฑ์ผักผลไม้หมักดองส่วนใหญ่อนุญาตให้ใช้เกลือประเภท sodium chloride ในกระบวนการแปรรูป เช่น ผลิตภัณฑ์แตงกวาดอง (CODEX STANDARD FOR PICKLED CUCUMBERS (CUCUMBER PICKLES) CODEX STAN 115-1981) กำหนดให้ให้สามารถเติมเกลือประเภท sodium chloride และค่าความเป็นกรด-ด่าง ไม่เกิน pH 4.6 ผลิตภัณฑ์มะกอกดอง (CODEX STANDARD FOR TABLE OLIVES (CODEX STAN 66-1981)) อนุญาตให้เติมเกลือประเภท sodium chloride และ pH ไม่เกิน 4.3 และผลิตภัณฑ์ผักกาดดอง (มผช.284/2547) กำหนดและอธิบายคุณลักษณะของน้ำดองจะต้องเป็นของเหลวที่ประกอบด้วยเกลือหรือสารเพิ่มความกรอบ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ไม่เกิน 4.5 จะเห็นว่าเกลือประเภท sodium chloride มีความสำคัญอย่างยิ่งในกระบวนการแปรรูปผักผลไม้ดอง นอกจาก sodium chloride แล้วจุลินทรีย์แบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นในการหมักดองผักและผลไม้ (ตารางที่ 2 แสดงแบคทีเรียกรดแล็กติกที่บทบาทสำคัญในการหมักดอง) แบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria, LAB) จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเซลล์กลมหรือเป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์ (Nonsporing) ไม่เคลื่อนที่ (Non-motile) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส แต่ในสภาวะการเจริญที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำ เชื้ออาจสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์คะตะเลส (Pseudocatalase) ได้ การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกในระดับสกุล สามารถพิจารณาจากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา รูปแบบของการหมักน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ การทดสอบความสามารถในการทนเกลือและต่อสภาวะกรดหรือด่าง นอกจากนี้ยังรวมถึงการศึกษาอนุกรมวิธานโดยอาศัยองค์ประกอบทางเคมี (Chemotaxonomic markers) เช่น การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันและผนังเซลล์ รวมถึงการวิเคราะห์

ลำดับเบสของยีน 16S rRNA (16S rRNA gene sequencing) และการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีที่มีการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (Polymerase chain reaction-based fingerprinting techniques) และ Soluble protein patterns (Axelsson, 2004) ในปัจจุบันแบคทีเรียกรดแล็กติกได้ถูกจำแนกและจัดหมวดหมู่ได้ทั้งหมด 21 สกุล (Genus) อย่างไรก็ตามสกุลของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีอาหารมีอยู่ 12 สกุลดังนี้ *Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* และ *Weissella* ความสำคัญของแบคทีเรียกรดแล็กติกในกระบวนการหมักดองเกิดจากระบวนการที่สำคัญ คือ กระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ ของแบคทีเรียกรดแล็กติกจะทำให้เกิดพลังงานเพื่อนำไปใช้ในการเจริญ โดยความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตจะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติก และเนื่องจากน้ำตาลเฮกโซส (Hexose) เช่น กลูโคสเป็นน้ำตาลที่นำไปใช้ได้ง่าย ดังนั้นเชื้อทุกชนิดจึงสามารถนำกลูโคสไปใช้ในการเจริญได้ ทำให้สามารถแบ่งแบคทีเรียกรดแล็กติกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ตามความสามารถในการหมักกลูโคส ดังนี้ (1) Homofermentative lactic acid bacteria เป็นกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแล็กติกทุกชนิด ยกเว้น *Leuconostoc, Obliogately heterofermentative, Lactobacilli, Oenococci* และ *Weissellas* (Axelsson, 2004) เกิดขึ้นผ่านวิถีไกลโคไลซิลโดยเปลี่ยนกลูโคสแล้วได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นกรดแลกติกเพียงอย่างเดียว (Homolactic fermentation) ดังนั้นแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงมีความสำคัญในทางอุตสาหกรรม นอกจากนี้การหมักของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เป็นกรดแลคติก ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง มีค่าลดลงช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร (2) Heterofermentative lactic acid bacteria กระบวนการนี้เกิดในแบคทีเรียแลคติก สกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacilli* ซึ่งเป็นสกุลเดียวกับ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* และ *Lactobacillus lactis* ssp. Lactis1 ที่ ผู้วิจัยคัดแยกและได้ทำการศึกษาคุณสมบัติแล้ว กระบวนการดังกล่าวเป็นกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแล็กติกดำเนินตามวิถีฟอสโฟคีโตส หรือ 6-phosphogluconate pathway (Axelsson, 2004) ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากกระบวนการหมักคือกรดแล็กติกประมาณร้อยละ 50 ส่วนที่เหลือเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ เอธานอลหรือกรดอะซิติก ในสัดส่วน 1:1:1 การหมักของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะทำให้เกิดสารประกอบต่างๆ ซึ่งมีผลต่อรสชาติและกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์สุดท้าย สามารถที่จะผลิตแมนนิทอลได้และบางสายพันธุ์ก็สามารถผลิต Dextran ได้ เช่น *Leuconostoc mesenteroroides* เชื้อชนิดนี้จะมีความทนต่อความเข้มข้นของเกลือและน้ำตาลได้สูง และมักเจริญในช่วงเริ่มต้นของการหมัก ผลิตคาร์บอนไดออกไซด์และกรด คาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นยังเข้ามาแทนที่ออกซิเจนทำให้สภาวะเป็นแบบไม่มีออกซิเจน (Anaerobe) ซึ่งเหมาะกับการเจริญ *Lactobacillus* และออกซิเจนที่ถูกกำจัดออกไปนั้นยังส่งผลดีต่อลักษณะทางกายภาพของผักและผลไม้ด้วย มีผลต่อการช่วยรักษาสีของผักผลไม้ดดอง

ตารางที่ 2.2 แบคทีเรียกรดแล็กติกที่บทบาทสำคัญในการหมักดอง

Sauerkraut	Kimchi	Pickles	Olives
Leuconostoc mesenteroides	*Leuconostoc mesenteroides*	*Leuconostoc mesenteroides*	*Leuconostoc mesenteroides*
Leuconostoc fallax	*Leuconostoc kimchii*	*Lactobacillus plantarum*	*Lactobacillus plantarum*
Lactobacillus plantarum	*Leuconostoc gelidum*	*Lactobacillus brevis*	*Lactobacillus brevis*
Lactobacillus brevis	*Leuconostoc inhae*	*Pediococcus pentosaceus*	
Pediococcus pentosaceus	*Leuconostoc citreum*		
	Lactobacillus plantarum		
	Lactobacillus brevis		
	Lactococcus lactis		
	Weissella kimchii		

ที่มา : Hutkins (2006)

จากข้างต้นจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียแล็กติกมีประโยชน์ต่อกระบวนการแปรรูปผักผลไม้ดอง โดยเฉพาะกระบวนการผลิตผักผลไม้ดองที่มีจำนวนแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เพียงพอ เช่น การเติมกล้าเชื้อ จะส่งให้ผลิตภัณฑ์ได้คุณภาพ มีความสม่ำเสมอ มากกว่ากระบวนการหมักดองโดยธรรมชาติ ได้การศึกษาวิจัย ผลิตภัณฑ์มันฝรั่งหวานและน้ำส้มดอง ที่มีการเติม starter culture และ mixed-starter culture ของ *Lactobacillus plantarum* และ *Leuconostoc mesenteriodes* เปรียบเทียบกับการดองโดยธรรมชาติ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน พบว่าผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมกล้าเชื้อและกล้าเชื้อผสมสามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร และ non-lactic acid bacteria ได้ดีกว่า รวมถึงมีค่า pH และปริมาณกรดแลคติกที่มากกว่า อยู่ในระดับมาตรฐาน และเมื่อทดสอบยอมรับต่อผู้บริโภคให้การยอมรับมากกว่าเช่นกัน (Neti Yuliana et al., 2013) นอกจากนี้สารประเภทกรดและอื่นๆ ที่แบคทีเรียประเภทนี้ผลิตขึ้นแล้ว แบคทีเรียกรดแล็กติกยังสามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้รับการยอมรับและมีความปลอดภัย พบว่ามีการสังเคราะห์ทั้งกรดแล็กติก กรดอะซิติกและกรดฟอร์มิก โดยสังเคราะห์ผ่านวิถีฟอสเฟสโฟคีโตเลส การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ของกรดอินทรีย์เกิดขึ้นจากการลดลงของความเป็นกรด-ด่างของสภาพแวดล้อมและกรดที่ไม่แตกตัว การที่ความเป็นกรด-ด่าง ลดลงเป็นผลมาจากการสะสมของกรดซึ่งมีผลต่อจุลินทรีย์ที่ไม่ทนกรด เช่น *Escherichia coli, Bacillus* sp., *Vibrio parahaemolyticus* และ *Pseudomonas* sp. ปกติแล้วเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์มีหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่าน กรดอินทรีย์ในรูปที่ไม่แตกตัวจะสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยวิถีแพร่ผ่าน เมื่อกรดอินทรีย์เข้าสู่ภายในเซลล์จะเกิดการแตกตัวและปลดปล่อยโปรตอนเข้าสู่ภายในไซโตพลาสซึม ทำให้เกิดการสะสมของกรดภายในเซลล์ ส่งผลให้แรงขับเคลื่อนโปรตอนถูกทำลาย ขัดขวางกระบวนการเมแทบอลิซึมที่สำคัญภายในเซลล์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียความสามารถในการควบคุมการเข้าออกของสารซึ่งมีผลต่อการยับยั้งกลไกการขนส่งอาหารและกระบวนการสร้างพลังงาน (Ammor et al, 2006) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) แบคทีเรียกรดแล็กติกสร้างได้โดยกระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอน

ซึ่งความสามารถในการยับยั้งการเจริญของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันบนเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายที่มีหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (Sulfhydryl) มีผลทำให้เอนไซม์หลายชนิดถูกทำลาย และเกิดปฏิกิริยาเพอออกซิเดชันของชั้นไขมันที่อยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (membrane lipid) ส่งผลให้เพิ่มการซึ่งผ่านได้ (Permeability) ของชั้นแมมเบรนที่ไม่สามารถควบคุมการเข้าออกของสารได้ (Ammor et at., 2006) นอกจากนี้ยังมีสารประเภท ไดอะซิติล คาร์บอนไดออกไซด์ สารโมเลกุลต่ำ และ แบคเทอริโอซิน (Bacteriocins) สารชนิดนี้พบในแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 3 ไอโซเลทที่ผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกและศึกษาแล้ว แบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้หลายชนิด แต่ละชนิดมีลักษณะที่แตกต่างกัน โดยกลไกการออกฤทธิ์พบได้ถึง 3 แบบ คือ การยับยั้งการเจริญของเซลล์ (Bacteriostatic effect) การฆ่าทำลายเซลล์ (Bactericidal effect) และการฆ่าทำลายเซล์พร้อมทั้งทำให้เซลล์แตกด้วย (Bacteriolytic effect) จากที่กล่าวในข้างต้นความสำคัญของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ผลต่อการยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของอาหารหมักดอง

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองเกิดในสภาวะที่มีอากาศเล็กน้อยไปจนถึงไม่มีอากาศ (facultative anaerobe และ anaerobic bacteria) จึงก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อน การอยู่รอดของจุลินทรีย์กลุ่ม Anaerobe และจากข้อกำหนดตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.) และมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.) ได้กำหนดชนิดและปริมาณการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *Staphylococcus aureus* *Bacillus cereus* *Escherichia coli, Clostridium perfringens, Listeria monocytogenes* และ Salmonella spp. จุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านี้บางชนิดสามารถสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ เช่น *Clostridium perfringens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic bacteria) เติบโตได้ดีในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ช่วงอุณหภูมิการเติบโตอยู่ระหว่าง 20–50 ˚C ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 5-8.5 *Clostridium perfringens* หากมีการปนเปื้อนเข้ามาในการผลิต เมื่อเชื้อนี้เจริญและเกิดการงอกของสปอร์ จะก่อให้เกิดสารพิษ Type A B C D และ E (Jihong Li et al., 2013) ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ นอกจากนี้จุลินทรีย์ก่อโรค *Staphylococcus aureus* *Bacillus cereus* *Escherichia coli* *Listeria monocytogenes* และ *Salmonella* spp. ล้วนเป็นจุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษแล้วก่อให้เกิดต่อผู้บริโภคทั้งสิ้น มีทั้งสารพิษประเภทเอกโซทอกซิน (exotoxin) ซึ่งเป็นสารพิษที่เชื้อจุลินทรีย์สร้างขึ้นและปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ระหว่างการเจริญเติบโต และเอนโดทอกซิน (endotoxin) เป็นสารพิษที่ถูกสร้างขึ้นและอยู่ภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ปล่อยออกมาเมื่อเซลล์ถูกทำลาย นอกจากตัวเซลล์และสารพิษแล้ว นอกจากนี้มีรายงานพบ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์มะกอกดองในน้ำเกลือ (Caggia et al., 2004; Flora Valeria Romeo, 2012) ยังต้องคำนึงถึงแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์และมีความเสี่ยงในการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดอง ได้แก่ *Clostridium*

botulinum Clostridium perfringens และ *Bacillus cereus* เป็นต้น สปอร์ของแบคทีเรียทนร้อนได้สูง ทนต่อความแห้งแล้ง การแช่เยือกแข็ง (freezing) ได้ ทำให้เกิดปัญหาในการฆ่าเชื้ออาหารประเภทอาหารกระป๋อง จึงก่อให้เกิดปัญหาในผลิตภัณฑ์เนื่องจากการให้ความร้อนในผลิตภัณฑ์ผักผลไม้ดองนี้อยู่ในระดับ pasterurization ประมาณ 77-74 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-25 นาที

ดังนั้นจำเป็นจะต้องมีการควบคุมกระบวนการผลิต รวมถึงความเข้มข้นเริ่มต้นของแบคทีเรียกรดแล็กติก ความเข้มข้นของเกลือ (Sodium chloride) ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร สปอร์และหรือเอนโดสปอร์ สารพิษจากจุลินทรีย์

การผลิตกล้าเชื้อจึงมีความสำคัญประการหนึ่งที่จะช่วยควบคุบและลดอันตราย ความเสี่ยงดังกล่าว อย่างไรก็ตามการผลิตกล้าเชื้อที่สามารถใช้เป็นผงสำเร็จรูปในการแปรรูปนอกจะช่วยควบคุมกระบวนการผลิตให้เกิดคุณภาพและความปลอดภัยแล้ว ยังสามารถเพิ่มความสะดวกและง่ายต่อการนำไปใช้งาน รวมถึงสามารถขยายขนาดการผลิตได้เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค กล่าวคือการประยุกต์ใช้ sodium chloride ที่ปรับความเข้มข้นให้อยู่ในระดับที่นำไปใช้หมักดองผักผลไม้ทั่วไป คือ sodium chloride 5-8 % (w/v) และ pH 3.2-5 (Suzanne D. et al., 2012) นำไปพัฒนาในรูปแบบผงที่มีส่วนผสมของกล้าเชื้อแบคทีเรียแล็กติก ให้สามารถนำไปใช้งานได้เลย โดยอาศัยเทคโนโลยีการผลิตด้วยวิธีการ freeze-drying เนื่องจากเป็นกระบวนการทำแห้งภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันต่ำ ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์แบคทีเรียน้อยที่สุด จึงช่วยให้ผลิตภัณฑ์คงคุณค่าทางโภชนาการ เนื้อสัมผัส สี กลิ่น และรสชาติ ได้ใกล้เคียงกับของสด (Diana Berner and Helmut Viernstein, 2006) ซึ่งมีความเป็นไปได้เนื่องจากมีรายงานว่ามีการนำเอา sodium chloride ไปใช้เป็นสาร cryoprotectant คือ มีการศึกษาการอยู่รอดและเสถียรภาพ *Lactococcus lactis* Sr. 3.54 โดยใช้ sodium chloride เข้มข้น 0.9% (Diana Berner and Helmut Viernstein, 2006) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการอยู่รอด และเสถียรภาพการเป็นสารปกป้องเซลล์ของ *Lactobacilus acidophilus* ATCC4962 โดยสารปกป้องเซลล์ที่ทำการศึกษา คือ sodium chloride, sucrose, dextran, sorbitol, monosodium glutamate, glycerol, skim milk, skim milk with malt extract และ modified De-man Rogosa ผลการศึกษาพบว่า skim milk มีประสิทิภาพดีที่สุด และ Sodium chloride ยังคงมีประสิทธิภาพในการเป็นสารปกป้องเซลล์ที่ยังคงอยู่รอดหลังกระบวนการมากกว่า 9.2 Log cfu/g (Hassan Pyar and Kok-khiang peh, 2014)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1.แหล่งที่มาของข้อมูล

งานวิจัยนี้ได้นำแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ได้ทำการคัดเลือกและจัดจำแนกในระดับชนิด (Species) ด้วยชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูปแบบ API 50 CHL พร้อมทั้งศึกษาปัจจัยความเข้มข้นของเกลือ sodium chloride 5-8% (w/v) กรด-ด่าง ที่ pH 2 และ 4 สภาวะไร้อากาศ และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยการจำลองสภาวะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกตามสภาวะการผลิตผักผลไม้ดองข้างต้น ความสามารถในการผลิตสารเมทาบอไลท์รวมถึงแบคเทอริโอซิน ที่มีประสิทธิภาพในการในการทำลายหรือยับยั้งในระดับ bactericidal และ bacteriostatic นอกจากนี้มีการศึกษาประสิทธิภาพกิจกรรมของแบคทีเรียแล็กติกดังกล่าวร่วมกับ sodium chloride (preservative) ที่ความเข้มที่ข้นที่เพียงพอต่อการยับยั้งหรือลดความเสี่ยงที่กล่าวไว้ในข้างต้นได้ ตลอดจนสิ้นสุดกระบวนการผลิต โดยความเข้มข้น sodium chloride ที่ศึกษาจะต้องสามารถปกป้องรักษาให้แบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถแสดงกิจกรรมและคุณสมบัติในการดองผักผลไม้ได้ และเป็นความเข้มข้นที่สามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสม (Ingredients) ที่ให้รสชาติ คุณสมบัติทางกายภาพที่ดีต่อผลิตภัณฑ์ โดยสามารถนำไปใช้งานได้สะดวกในรูปแบบผงสำเร็จรูป นำไปเติมในการหมักดองกับผักผลไม้ได้โดยไม่จำเป็นจะต้องเติมส่วนผสมอื่นๆ โดยผงสำเร็จรูปจะต้องยังคงประสิทธิของการเป็นทั้งกล้าเชื้อ ที่ได้คุณภาพ ความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ โดยเฉพาะในกลุ่มที่มีความเสี่ยงที่สามารถเจริญและอยู่ในสภาวะที่เป็นกรด โซเดียมคลอไรด์ และในสภาวะที่มีอากาศเล็กน้อยไปจนถึงสภาวะที่ไม่มีอากาศ

2. วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

2.1 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHL medium

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกแต่ละไอโซเลตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อ swab โคโลนีเดี่ยวบริสุทธิ์ให้ได้เซลล์ปริมาณมากใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 มิลลิลิตร (หลอดที่ 1) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงถ่ายสารละลายเซลล์จากหลอดนี้ด้วยปริมาตรที่แน่นอน (n) ใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร (หลอดที่ 2) นี้มีความขุ่นเทียบกับ McFarland เบอร์ 2 ผสมกันจนเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นถ่ายเชื้อปริมาณ 2n ใส่ลงใน API 50 CHL medium แล้วผสมให้เข้ากัน ใส่ API 50 CHL medium ที่มีเชื้อผสมอยู่ลงใน API 50 CH strips แต่ละหลุม ปิดทับผิวหน้าของแต่ละหลุมด้วยน้ำมันมิเนอรอล (mineral oil) นำ API kits บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และติดตามการเกิดปฏิกิริยาหลังจาก 24 และ 48 ชั่วโมง นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม API WEB (BIOMERIEUX) โดยถ้าอาหาร

เปลี่ยนเป็นสีเหลือง คือ ให้ผลเป็นบวก ถ้าอาหารไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลือง คือ ให้ผลเป็นลบ ยกเว้นหลุมที่ 25 ที่จะให้ผลเป็นบวกเมื่อเปลี่ยนเป็นสีดำ

2.2 การผลิตกล้าเชื้อผงสำเร็จรูป *Leuconostoc mesenteroides* ssp. และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp *delbrueckii*

2.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย *Leuconostoc mesenteroides ssp.* และ *Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii*

นำเชื้อจากตู้เก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงใน MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm จากนั้นนำเซลล์ไป streak บนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดแยกโคโลนีเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงใน MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแยกตะกอนของเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×*g* เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v) จำนวน 2 ครั้ง ทำให้เซลล์แขวนลอยอยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v)

2.2.2 การเตรียมสาร cryoprotectant และการผลิตกล้าเชื้อผงสำเร็จรูป *Leuconostoc mesenteroides* ssp. และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp *delbrueckii*

เตรียมสารละลาย NaCl 10 15 20 %(w/v) และ สารละลาย Maltodextrin 10 20 30 %(w/v) แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ทิ้งให้อุณหภูมิเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นแขวนลอยเซลล์ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp *delbrueckii* โดยให้มีจำนวนเซลล์สุดท้ายเท่ากับ 10^8-10^9 CFU/g นำตัวอย่างไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างเข้าเครื่อง freeze dryer โดยมีสภาวะเริ่มต้น -20 องศาเซลเซียส ความดัน 1.0E+3 mbar เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และปรับอุณหภูมิสุดท้ายของเครื่องเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส เพื่อทำให้ตัวอย่างแห้ง โดยมีเกณฑ์คุณภาพพิจารณาร่วม ได้แก่ (1) ปริมาณสปอร์ภายหลังการทำแห้งมากกว่า 10^7 CFU/g (2) ปริมาณความชื้นน้อยกว่า 7% (wet basis) และ (3) ค่าปริมาณน้ำอิสระน้อยกว่า 0.6 จากนั้นเก็บรักษากล้าเชื้อผงโดยบรรจุแบบปลอดเชื้อในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์แบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 20 25 องศาเซลเซียส ทำการสุ่มตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์เป็นระยะเวลา วันที่ 0 30 90 และ 180 ตามลำดับ

2.2 การศึกษาการเจริญและกิจกรรมของกล้าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวภายใต้สภาวะความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และความเป็นกรดสูง

2.2.1 การเตรียมเชื้อกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก

นำเชื้อจากตู้เก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS broth บ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เซลล์แขวนลอยอยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v) โดยปรับความหนาแน่นของเซลล์ด้วย McFarland standard No. 1 ให้อยู่ในช่วง 10^{6}-10^{7} CFU/ml เพื่อนำไปใช้ศึกษาต่อไป

2.2.2 การศึกษาการเจริญ การผลิตเอนไซม์ และการผลิตแบคเทอริโอซินของ NCR-7 และ NCR-12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

นำเชื้อที่เตรียมจากข้อ 6.1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ใน MRS broth ที่มีการเติมเกลือ NaCl ปริมาณ 5 6 7 8 9 และ 10 % (w/v) รวมถึง MRS broth ที่มีการปรับค่า pH เริ่มต้นที่ 2 4 และ 6 ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง บ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก (CFU/ml) ด้วยวิธี spread plate บน MRS agar วัดค่า pH การผลิตเอนไซม์ และการผลิตแบคทริโอซินที่ระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 0 6 12 18 24 36 และ 48 ชั่วโมง

2.2.3 การเตรียมสารแบคเทอริโอซินแบบหยาบจากไอโซเลท

เลี้ยงแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่คัดกรองได้ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน anaerobic jar จากนั้นแยกส่วนใสด้วยวิธีการ centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000x*g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.2.4 การทดสอบการผลิตแบคเทอริโอซินด้วยวิธี Agar well diffusion

ใส่เชื้อแบคทีเรียก่อโรคทดสอบ ได้แก่ *E. coli* และ *Salmonella* sp. ในความเข้มข้น 1 (% v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Muller Hinton ที่หลอมละลาย เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 100x15 มิลลิเมตร ผสมให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค pour plate แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว หลังจากนั้นเจาะหลุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยที่เจาะหลุมวุ้น (cork borer) โดยช่องมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หยดส่วนใส MRS ที่ได้จากการเลี้ยงไอโซเลตปริมาตร 40 μl ลงหลุม บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24

ชั่วโมง อ่านผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทั้ง 4 ชนิด โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสการยับยั้งการเจริญ (Diameter of inhibition zone) ด้วยเวอร์เนียคาร์ลิบเปอร์

2.2.5 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญในการหมัก

แยกส่วนใส MRS broth ที่ได้จากการเลี้ยงในแต่ละไอโซเลต ด้วยวิธีการ centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000x*g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วปิเปตดูดส่วนใสปริมาตร 40 µl หยดลงหลุมอาหารแข็งที่เจาะด้วยที่เจาะหลุมวุ้น (cork borer) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เพื่อวิเคราะห์การสร้างเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ pectinase และ cellulase จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายไอโอดีนเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดกรองการผลิตเอนไซม์ pectinase และ cellulase เกลี่ยให้ทั่ว ทิ้งไว้นาน 5 นาที หลังจากนั้นวัดขนาดส่วนใส (clear zone) ด้วยเวอร์เนียคาร์ลิบเปอร์

2.3 วิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ 16s rRNA ด้วยวิธี sequencing

กล้าเชื้อสด *Leuconostoc mesenteroides ssp.* มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการสกัด DNA ด้วยวิธี CTAB (Zhou et al., 1996) จากนั้นเพิ่มปริมาณยีน (Amplification) ช่วง 16s ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR Gene Amp PCR System 9700 - PE Applied Biosystems) ด้วย universal eubacterial primer 27F (5’-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3’) และ 1492R (5’-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3’) (Lane, 1991) โดยมีสัดส่วนของสารเคมีและสภาวะการทดลองตามตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ เมื่อได้ PCR product แล้ว นำมาตรวจสอบขนาด (~1500 bp) ด้วยวิธี electrophoresis 1% agarose gel จากนั้นวิเคราะห์ด้วย DNA sequencing (Model : ABI 3730XL) เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI ด้วย BLAST (http://www.ncbi. nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) พิจารณาผลการทดสอบกับความคล้ายคลึงของจุลินทรีย์แต่ละสปีชีส์ในฐานข้อมูลด้วย % similarity

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.1 สัดส่วนของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

Component	Volume per 20 μl	Final concentration
PCR Qualified Water	20.7 μl	
10X PCR Buffer	3 μl	1X with 1.5 mM MgCl2
2 mM PCR Nucleotide Mix	3 μl	0.2 mM of each dNTP
Primer F 10 μM	1 μl	10 pmol
Primer R 10 μM	1 μl	10 pmol
Taq (5 un/μl)	0.3 μl	1.5 units
DNA (50 ng/ul)	1 μl	50 ng
Total volume	30 μl	

ตารางที่ 3.2 สภาวะ PCR ด้วยไพร์เมอร์ 27F/1492R เพื่อเพิ่มปริมาณยีนช่วง 16s

Step	Tm (°C)	Time	cycle
1. Initial Denaturation	95	3 min	1
2. Denaturation	95	30 sec	
3. Annealing	55	30 sec	35
4. Extension	72	2 min	
5. Final extension	72	5 min	1
6. Hold	4	α	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

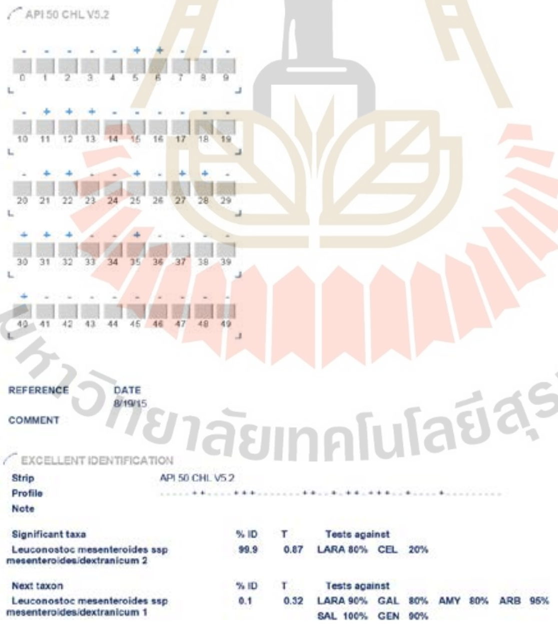
วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลเชิงปริมาณวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวน โดยใช้ ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan's Multiple-Range Test (DMRT)

บทที่ 4
ผลการวิจัย

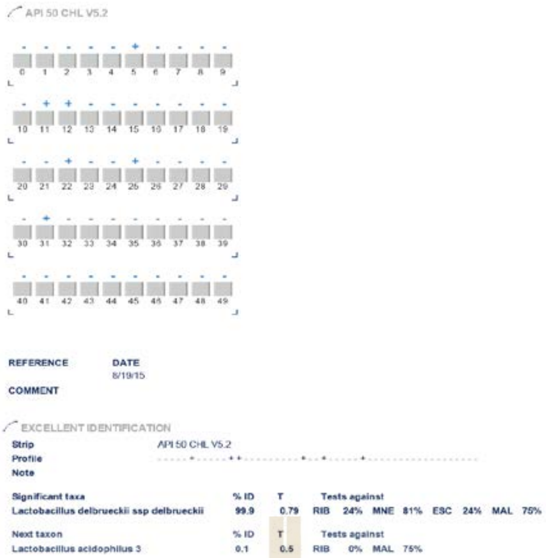
ตอนที่ 1 การทดสอบจำแนกชนิดของกล้าเชื้อแบคทีเรียแล็กติกด้วยการคัดเลือกและจัดจำแนกในระดับชนิด (Species) ด้วยชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูปแบบ API 50 CHL

จากงานวิจัยที่ผ่านมาที่ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากผลไม้รสเปรี้ยวแล้วมาทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของความเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria) จำนวน 2 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นที่สามารถจำแนกได้ว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Lactic acid bacteria และมีคุณสมบัติในการเป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ คือมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค *E.coli* และ *Salmonella* sp. ทั้งยังมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Pectinase และ Cellulase ได้และเมื่อนำทั้ง 2 ไอโซเลท ไปทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHL medium ผลการทดสอบ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranium* ร้อยละ 99.90 และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ละ 99.90 ดังแสดงในรูปที่ 4.1 และ 4.2



รูปที่ 4.1 : ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแล็กติก *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranium* ด้วยชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูปแบบ API 50 CHL medium

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 4.2 : ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแล็กติก *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ด้วยชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูปแบบ API 50 CHL medium

ตอนที่ 2 การผลิตกล้าเชื้อผงสำเร็จรูปแบคทีเรียแล็กติกและทดสอบคุณภาพของกล้าเชื้อแบคทีเรียแล็กติก *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *Lactobacilludelbrueckii* ssp delbrueckii และ *Lactobacillus lactis* ssp. Lactis1

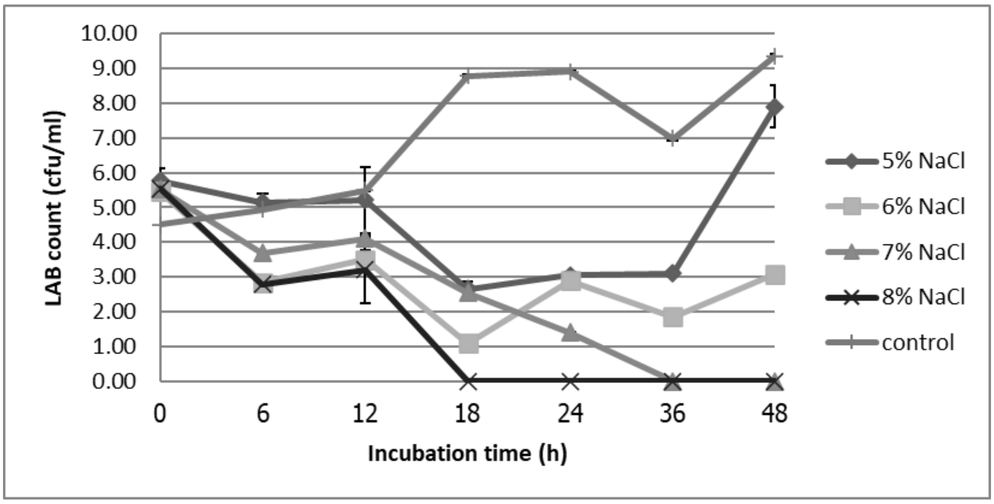
เมื่อได้ทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียแล็กติดด้วยชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูป API 50 CHL medium ได้กล้าเชื้อแบคทีเรียแล็คติก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranium* และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* แล้วจึงนำมาผลิตกล้าเชื้อผงด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีการระเหิดแห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer ได้สภาวะที่เหมาะสมคือ ที่ความดัน 0.045 มิลลิบาร์ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ร่วมกับการใช้ sodium chloride (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 10 15 20 (%w/v) และ Maltodextrin ความเข้มข้นร้อยละ 10 20 30 (%w/v) พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของการใช้สาร cryoprotectant โดยพิจารณาจากผลผลิตสุทธิที่ได้จากกระบวนการผลิต (% yield) ของผงแห้งที่ได้มากที่สุด sodium chloride คือ 15 และ 20 (%w/v) ส่วน Maltodextrin คือ 30 (%w/v) มีอัตราของผลผลิต(%yield) มากกว่า 90% ที่มีความชื้นไม่เกินร้อยละ 3 และปริมาณน้ำอิสระ (a_w) ไม่เกิน 0.3 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์กล้าเชื้อผงที่ผ่านการทำแห้ง จากนั้นนำไปทดสอบประสิทธิภาพความสามารถต่อการเป็นสารปกป้อง (cryoprotectant) และคุณสมบัติของกล้าเชื้อ พบว่าหลังจากผ่านกระบวนการผลิตด้วยเครื่อง freeze dryer ที่สภาวะดังกล่าว มีกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp *delbrueckii* หลงเหลือประมาณ 8-10 log cfu/g จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 12 log cfu/g

ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพความสามารถของการเป็นสารปกป้อง (cryoprotectant) กล้าเชื้อแบคทีเรียแล็กติก *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii*

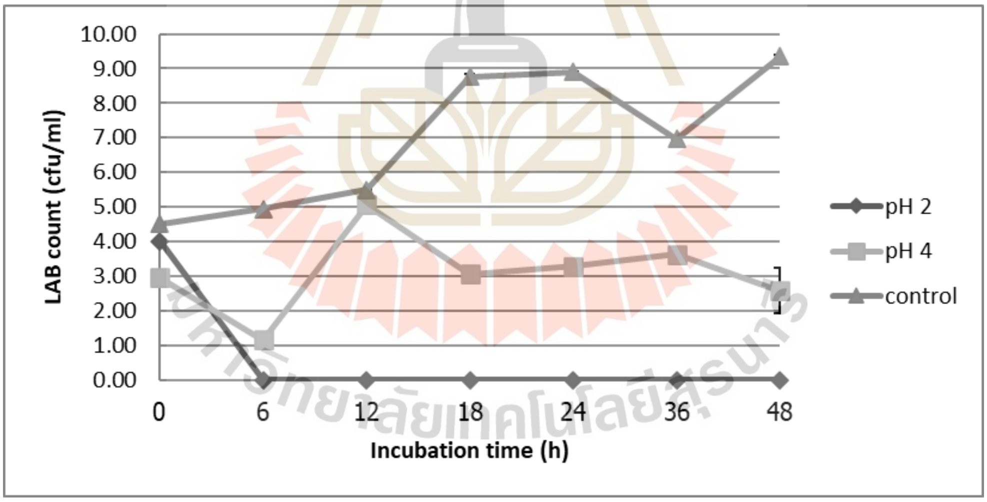
กล้าเชื้อแบคทีเรียแล็คติก	**ชนิดของสารปกป้อง (cryoprotectant)**	**เกณฑ์พิจารณา**			
		%yield	%moisture (<7% wet basis)	%water activity (<0.6)	%survival (>log 7cfu/g)
Leuconostoc mesenteroides ssp. *mesenteroides/dextranicum*	NaCl 10 (%w/v)	83±0.10 ^{b}	2.20±0.20 ^{ns}	0.29±0.03 ^{ns}	50±0.06 ^{d}
	NaCl 15 (%w/v)	94±0.08 ^{a}	2.14±0.45 ^{ns}	0.25±0.06 ^{ns}	90±0.03 ^{a}
	NaCl 20 (%w/v)	96±0.04 ^{a}	2.22±0.02 ^{ns}	0.27±0.02 ^{ns}	92±0.03 ^{a}
	Maltodextrin 10 (%w/v)	71±0.04 ^{c}	2.19±0.11 ^{ns}	0.29±0.03 ^{ns}	62±0.09 ^{c}
	Maltodextrin 20 (%w/v)	82±0.05 ^{b}	2.10±0.09 ^{ns}	0.29±0.02 ^{ns}	66±0.01 ^{c}
	Maltodextrin 30 (%w/v)	95±0.11 ^{a}	2.14±0.15 ^{ns}	0.27±0.01 ^{ns}	95±0.07 ^{a}
Lactobacillus delbrueckii ssp. *delbrueckii*	NaCl 10 (%w/v)	80±0.09 ^{b}	2.16±0.12 ^{ns}	0.29±0.01 ^{ns}	65±0.03 ^{c}
	NaCl 15 (%w/v)	95±0.09 ^{a}	2.16±0.31 ^{ns}	0.27±0.03 ^{ns}	91±0.13 ^{a}
	NaCl 20 (%w/v)	95±0.05 ^{a}	2.10±0.0 ^{ns}	0.25±0.04 ^{ns}	91±0.10 ^{a}
	Maltodextrin 10 (%w/v)	77±0.08 ^{b}	2.14±0.45 ^{ns}	0.27±0.02 ^{ns}	71±0.05 ^{b}
	Maltodextrin 20 (%w/v)	78±0.10 ^{b}	2.12±0.02 ^{ns}	0.29±0.03 ^{ns}	77±0.09 ^{b}
	Maltodextrin 30 (%w/v)	96±0.15 ^{a}	2.19±1.21 ^{ns}	0.27±0.02 ^{ns}	92±0.02 ^{a}

เมื่อได้ทำการผลิตกล้าเชื้อผงสำเร็จรูปของแบคทีเรียแล็กติก *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Delbrueckii* แล้วนำมาศึกษารูปแบบการเจริญและกิจกรรมของกล้าเชื้อแบคทีเรียในรูปแบบผงสำเร็จรูปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวภายใต้สภาวะที่ควบคุมความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 5 6 7 และ 8 %(w/v) และสภาวะความเป็นกรดที่ pH เท่ากับ 2 และ 4 ภายใต้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อัตราการเจริญเติบโต (Growth rate) ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ที่สภาวะปกติ (ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS) และที่สภาวะความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5-8 (%w/v) พบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 5 (%w/v) มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด (ดังรูปที่ 4.3) และหลังจากชั่วโมงที่ 36 พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 (%w/v) มีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นมากกว่า 4 log cycle และอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* (รูปที่ 4.5) พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 6 7 และ 8 (%w/v) มีแนวโน้มการเจริญเติบโตลดลงหลังชั่วโมงที่ 12 อย่างไรก็ตามการเจริญของเชื้อที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 (%w/v) ยังคงมีอัตราการเจริญสูงสุด และเมื่อศึกษาการเจริญและกิจกรรมของกล้าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวภายใต้สภาวะความเป็นกรด-ด่าง พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ในสภาวะความเป็นกรดที่ pH เท่ากับ 2 (รูปที่ 4.4) มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงหลังชั่วโมงที่ 6 แต่ที่ pH เท่ากับ 4 เชื้อดังกล่าวมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นหลังชั่วโมงที่ 6 โดยชั่วโมงที่ 12 มีอัตราการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ภายใต้สภาวะความเป็นกรด (รูปที่ 4.6) ที่ pH เท่ากับ 4 มีอัตราการเจริญดีกว่าที่ pH เท่ากับ 2 และพบว่าที่ pH เท่ากับ 4 มีอัตราการเจริญสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 6 ส่วนที่ pH เท่ากับ 2 มีอัตราการเจริญลดลงอย่างต่อเนื่อง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

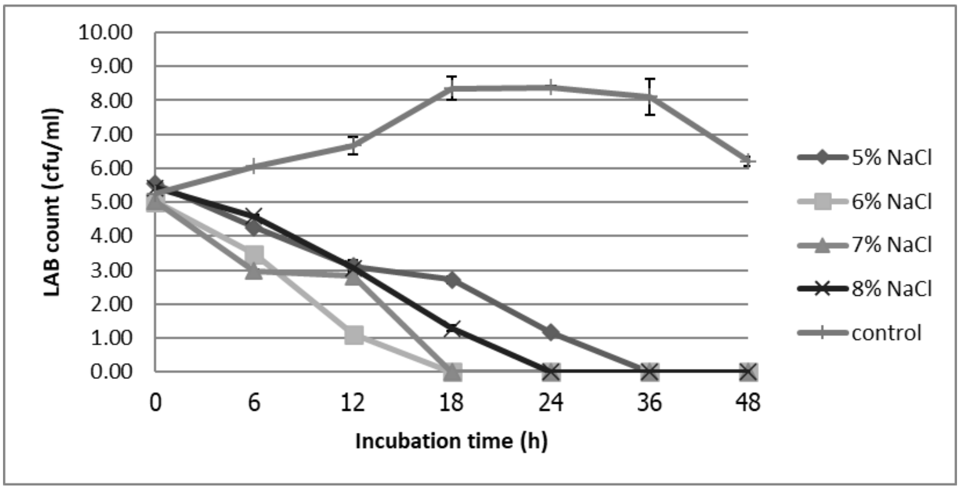


รูปที่ 4.3 : อัตราการเจริญเติบโต (Growth rate) ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ภายใต้สภาวะความเข้มข้นต่างๆ ของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

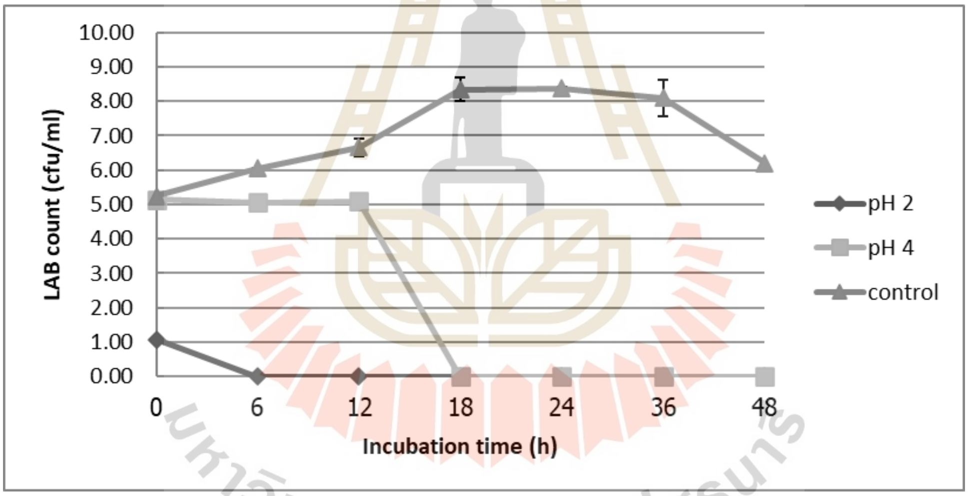


มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปที่ 4.4 : อัตราการเจริญเติบโต (Growth rate) ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ภายใต้สภาวะความเป็นกรด



รูปที่ 4.5 : อัตราการเจริญเติบโต (Growth rate) ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ภายใต้สภาวะความเข้มข้นสารละลายโซเดียม (NaCl)



รูปที่ 4.6 : อัตราการเจริญเติบโต (Growth rate) ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ภายใต้สภาวะความเป็นกรด

ตอนที่ 3 กิจกรรมการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญในการหมัก และความสามารถในการผลิต แบคเทอริโอซินของกล้าเชื้อผงสำเร็จรูป

เอนไซม์สำคัญที่เกิดขึ้นในกระบวนในการหมักนี้ ได้แก่ pectinase และ cellulase ของกล้าเชื้อแบคทีเรียแล็คติก *Leuconostoc mesenteroides* ssp.*mesenteroides/dextranicum* ในสภาวะความเข้มข้นของเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ จากตารางที่ 4.2 ซึ่งทดสอบกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ pectinase ของเชื้อดังกล่าวที่ความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 5-8 (%w/v) ที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 (%w/v) พบว่าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* มีการผลิตเอนไซม์ pectinase สูงสุดในชั่วโมงที่ 48 โดยสังเกตจากขนาด clear zone ที่มากที่สุด คือเท่ากับ 8.2±0.26 มิลลิเมตร ส่วนที่ความเข้มข้นของเกลือ 6 (%w/v) เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ protease สูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เช่นกัน โดยมีขนาดของ clear zone เท่ากับ 7.5±0.06 มิลลิเมตร และที่ความเข้มข้นของเกลือ 7 (%w/v) เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ pectinase สูงสุดในชั่วโมงที่ 24 โดยมีขนาดของ clear zone เท่ากับ 6.5±0.20 มิลลิเมตร โดยที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 (%w/v) จะพบการผลิตเอนไซม์ protease ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 18 24 36 และชั่วโมงที่ 48 ทั้งยังมีค่าเฉลี่ยของ clear zone สูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 48 เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของเกลือที่ความเข้มข้นอื่นๆ อีกด้วย ส่วนการทดสอบกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ cellulase ของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* จากตารางที่ 4.3 ที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 (%w/v) เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ cellulose สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 คือมี clear zone เท่ากับ 7.6±0.21 มิลลิเมตร ส่วนที่ความเข้มข้นของเกลือ 6 (%w/v) เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ cellulose สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 เช่นกัน คือมี clear zone เท่ากับ 7.6±0.12 มิลลิเมตร และที่ความเข้มข้นของเกลือ 7 (%w/v) เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ cellulase ที่ชั่วโมงที่ 12 18 และชั่วโมงที่ 24 แต่อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นของเกลือสูงตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 8 ไม่พบการผลิตเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด (ทั้งเอนไซม์ pectinase และ cellulase) จากเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* แสดงถึงความสามารถของเชื้อในการแสดงกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ pectinase และ cellulase ในสภาวะที่มีเกลือ เชื้อจะสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้น 5 6 และ 7 %w/v แต่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดได้ในสภาวะที่มีเกลือสูงตั้งแต่ที่ความเข้มข้นของเกลือ 8 (%w/v)

ตารางที่ 4.2 : ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ pectinaseของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ที่สภาวะความเข้มข้นสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

ระยะเวลาหมัก (h)	**ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (mm)**				
	ไม่เติม NaCl	NaCl 5(%w/v)	NaCl 6(%w/v)	NaCl 7(%w/v)	NaCl 8(%w/v)
0	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND
18	7.4±0.27	6.7±0.20	ND	6.1±0.18	ND
24	9.0±0.21	6.9±0.25	6.8±0.20	6.5±0.20	ND
36	7.5±0.15	7.2±0.15	7.2±0.15	ND	ND
48	9.5±0.25	8.2±0.26	7.5±0.06	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

ตารางที่ 4.3 : ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์cellulaseของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ที่สภาวะความเข้มข้นสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

ระยะเวลาหมัก (h)	**ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (mm)**				
	ไม่เติม NaCl	NaCl 5(%w/v)	NaCl 6(%w/v)	NaCl 7(%w/v)	NaCl 8(%w/v)
0	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	6.3±0.19	ND
18	7.2±0.18	6.7±0.17	ND	6.4±0.11	ND
24	7.0±0.12	7.0±0.12	7.3±0.15	6.0±0.08	ND
36	7.0±0.21	7.4±0.10	6.8±0.08	ND	ND
48	7.5±0.14	7.6±0.21	7.6±0.15	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สำหรับการทดสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ pectinase และ cellulase ของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ในสภาวะที่เป็นกรด จากตารางที่ 4.4 และ 4.5 นั้น พบว่าไม่มีการผลิตทั้งเอนไซม์ pectinase และ cellulase ในสภาวะที่มี pH เท่ากับ 2 เนื่องจากเป็นสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง ไม่เหมาะกับการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* แต่ที่สภาวะที่มี pH เท่ากับ 4 พบการผลิตเอนไซม์ pectinase และ cellulase ในชั่วโมงที่ 18 24 36 และชั่วโมงที่ 48 โดยมีการผลิตเอนไซม์ protease สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมี clear zone เท่ากับ 7.1±0.08 มิลลิเมตร และมีการผลิตเอนไซม์ cellulase สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งมี clear zone เท่ากับ 7.4 ±0.10 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4.4 : ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ pectinase ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ที่สภาวะความเป็นกรด

ระยะเวลาหมัก (h)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (mm)		
	control	pH 2	pH 4
0	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND
18	8.5±0.26	ND	6.7±0.17
24	9.0±0.18	ND	6.6±0.06
36	7.6±0.15	ND	7.1±0.08
48	9.5±0.22	ND	6.3±0.06

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.5 : ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์cellulaseของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ที่สภาวะความเป็นกรด

ระยะเวลาหมัก (h)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (mm)		
	control	pH 2	pH 4
0	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND
18	7.2±0.15	ND	6.9±0.23
24	7.1±0.12	ND	6.9±0.12
36	7.0±0.21	ND	7.0±0.00
48	7.3±0.12	ND	7.4±0.10

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

คุณสมบัติการผลิตสารแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคนั้น ได้ทำการทดสอบการสร้างสารแบคเทอริโอซินของเชื้อที่จำแนกได้ทั้ง 2 ชนิด นั่นคือ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* กับแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. (ตารางที่ 4.6) มีความสามารถในการยังยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารทั้งจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดได้ จากตารางที่ 4.6 ซึ่งทดสอบการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *E.coli* ของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* พบว่าในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ 5 (%w/v) เชื้อดังกล่าวสามารถผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้งการเจริญของ *E.coli* ได้ในชั่วโมงที่ 24 36 และชั่วโมงที่ 48 ส่วนที่ความเข้มข้นของเกลือ 6 (%w/v) มีการผลิตแบคเทอริโอซินมายับยั้ง *E. coli* ที่ชั่วโมงที่ 24 และ 36 และที่ความเข้มข้นของเกลือ 7 (%w/v) เชื้อมีการสร้างแบคเทอริโอซินในชั่วโมงที่ 18 และสำหรับการสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของ *Salmonella* sp. จากตารางที่ 4.7 พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 และ 6 (%w/v) มีการสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้ง *Salmonella* sp. ในชั่วโมงที่ 36 และ 48 ส่วนที่ความเข้มข้นของเกลือ 7 %w/v มีการสร้างแบคเทอริโอซินในชั่วโมงที่ 18 เช่นเดียวกันกับการสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้ง *E. coli* แต่อย่างไรก็ตามในสภาวะความเข้มข้นของเกลือ 8 (%w/v) เชื้อไม่มีการผลิตแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง *E. coli* และ *Salmonella* sp. และสำหรับการทดสอบการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *E.coli* และ *Salmonella* sp. ของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ในสภาวะความเป็นกรด จากตารางที่ 4.7 และ 4.8 พบว่าที่สภาวะความเป็นกรดสูง ที่ pH เท่ากับ 2 เชื้อไม่มีการสร้างแบคเทอริโอซินเพื่อมายับยั้งการเจริญ

ของจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 2 ชนิด แต่ที่ pH เท่ากับ 4 พบว่ามีการสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของ *E.coli* ในชั่วโมงที่ 18 24 และชั่วโมงที่ 36 ทั้งยังมีการยับยั้ง *Salmonella* sp. ในชั่วโมงที่ 24 และ 36

ตารางที่ 4.6 : ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *E.coli* ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ที่สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

ระยะเวลาหมัก (h)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (mm)				
	ไม่เติม NaCl	NaCl 5(%w/v)	NaCl 6(%w/v)	NaCl 7(%w/v)	NaCl 8(%w/v)
0	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND
18	ND	ND	ND	6.4±0.00	ND
24	6.6±0.15	8.3±0.08	7.8±0.21	ND	ND
36	7.7±0.31	7.8±0.09	7.5±0.07	ND	ND
48	ND	9.5±0.14	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

ตารางที่ 4.7 : ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *Salmonella* sp. ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ที่สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

ระยะเวลาหมัก (h)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (mm)				
	ไม่เติม NaCl	NaCl 5(%w/v)	NaCl 6(%w/v)	NaCl 7(%w/v)	NaCl 8(%w/v)
0	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND
18	7.4±0.19	ND	ND	6.7±0.19	ND
24	8.2±0.00	ND	ND	ND	ND
36	6.5±0.41	7.0±0.23	7.6±0.14	ND	ND
48	ND	7.6±0.23	7.0±0.19	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.8 : ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *E. coli* ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ที่สภาวะความเป็นกรด

ระยะเวลาหมัก (h)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (mm)		
	control	pH 2	pH 4
0	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND
18	ND	ND	7.5±0.20
24	6.6±0.13	ND	10.0±0.16
36	7.6±0.12	ND	10.2±0.20
48	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

ตารางที่ 4.9 : ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *Salmonella* sp. ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ที่สภาวะความเป็นกรด

ระยะเวลาหมัก (h)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (mm)		
	control	pH 2	pH 4
0	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND
18	7.4±0.19	ND	ND
24	8.0±0.01	ND	10.1±0.12
36	6.6±0.21	ND	10.1±0.17
48	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติต่างๆของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/ dextranicum* ในสภาวะของเกลือและกรดแล้ว ก็จะมีการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่จำแนกได้อีกชนิดหนึ่งควบคู่กันไป โดยในการทดสอบกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ pectinase และ cellulase ของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ในน้ำเกลือความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 5-8 (%w/v) จากตารางที่ 4.10 พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 และ 6 %w/v มีการผลิตเอนไซม์ pectinase ในชั่วโมงที่ 24 36 และชั่วโมงที่ 48 และที่ความเข้มข้นของเกลือ 7 %w/v มีการผลิตเอนไซม์ pectinase ในชั่วโมงที่ 24 โดยมี clear zone เท่ากับ 6.5±010 มิลลิเมตร แต่ไม่พบการผลิตเอนไซม์ pectinase ของเชื้อในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ 8 (%w/v) และจากตารางที่ 4.11 พบว่าความเข้มข้นของเกลือ 5 (%w/v) มีการผลิตเอนไซม์ cellulase ในชั่วโมงที่ 24 และ 36 แต่ไม่พบการผลิตเอนไซม์ cellulase ของเชื้อในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 6 7 8 (%w/v) นอกจากนี้การทดสอบกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ pectinase และ cellulase ในสภาวะความเป็นกรด จากตารางที่ 4.12 และ 4.13 พบว่าที่สภาวะความเป็นกรดสูง (pH 2) เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ไม่มีการผลิตเอนไซม์ protease และ cellulase ส่วนที่ pH เท่ากับ 4 เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ protease และ cellulase ในชั่วโมงที่ 18 และ 24

ตารางที่ 4.10 : ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ pectinaseของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ที่สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

ระยะเวลาหมัก (h)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (mm)				
	ไม่เติม NaCl	NaCl 5(%w/v)	NaCl 6(%w/v)	NaCl 7(%w/v)	NaCl 8(%w/v)
0	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND
18	8.5±0.20	ND	ND	ND	ND
24	8.0±0.11	6.7±0.06	6.5±0.20	6.5±0.10	ND
36	7.5±0.12	6.5±0.17	6.5±0.20	ND	ND
48	9.5±0.08	7.2±0.08	6.6±0.06	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.11 : ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ cellulase ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ที่สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

ระยะเวลาหมัก (h	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (mm)				
	ไม่เติม NaCl	NaCl 5(%w/v)	NaCl 6(%w/v)	NaCl 7(%w/v)	NaCl 8(%w/v)
0	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND
18	6.6±0.06	ND	ND	ND	ND
24	6.8±0.10	6.9±0.16	ND	ND	ND
36	6.7±0.06	6.5±0.15	ND	ND	ND
48	7.0±0.02	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

ตารางที่ 4.12 : ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ pectinase ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ที่สภาวะความเป็นกรด

ระยะเวลาหมัก (h)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (mm)		
	control	pH 2	pH 4
0	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND
18	8.9±0.15	ND	6.8±0.10
24	7.5±0.15	ND	6.6±0.23
36	7.2±0.29	ND	ND
48	9.4±0.15	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

ตารางที่ 4.13 : ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ cellulase ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ที่สภาวะความเป็นกรด

ระยะเวลาหมัก (h)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (mm)		
	control	pH 2	pH 4
0	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND
18	6.6±0.31	ND	6.6±0.25
24	6.6±0.12	ND	6.5±0.17
36	ND	ND	ND
48	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

ในด้านคุณสมบัติการผลิตสารแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค 2 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ 5 (%w/v) เชื้อดังกล่าวสามารถผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้งการเจริญของ *E.coli* ได้ในชั่วโมงที่ 24 และ 36 ส่วนที่ความเข้มข้นของเกลือ 6 (%w/v)มีการผลิตแบคเทอริโอซินมายับยั้ง *E. coli* ที่ชั่วโมงที่ 12 และที่ความเข้มข้นของเกลือ 7 %w/v เชื้อมีการสร้างแบคเทอริโอซินในชั่วโมงที่ 18 และสำหรับการสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของ *Salmonella* sp. จากตารางที่ 4.15 พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 (%w/v) มีการสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้ง *Salmonella* sp. ในชั่วโมงที่ 18 ส่วนที่ความเข้มข้นของเกลือ 6 (%w/v) มีการสร้างแบคเทอริโอซินในชั่วโมงที่ 36 และ 48 และที่ความเข้มข้นของเกลือ 7 (%w/v) มีการสร้างแบคเทอริโอซินในชั่วโมงที่ 18 แต่อย่างไรก็ตามในสภาวะความเข้มข้นของเกลือ 8 (%w/v) เชื้อไม่มีการผลิตแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง *E. coli* และ *Salmonella* sp. สำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ในสภาวะความเป็นกรดสูง (pH 2) จากตารางที่ 4.16 และ 4.17 พบว่าเชื้อไม่มีการผลิตแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของทั้ง *E. coli* และ *Salmonella* sp. ส่วนในสภาวะที่มี pH เท่ากับ 4 พบว่าเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* มีการสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของทั้ง *E. coli* และ *Salmonella* sp. ในชั่วโมงที่ 12 และ 18

ตารางที่ 4.14 : ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *E.coli* ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ที่สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

ระยะเวลาหมัก (h)	**ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (mm)**				
	ไม่เติม NaCl	NaCl 5(%w/v)	NaCl 6(%w/v)	NaCl 7(%w/v)	NaCl 8(%w/v)
0	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	6.5±0.20	ND	ND
18	ND	ND	ND	6.4±0.00	ND
24	6.5±0.11	6.4±0.10	ND	ND	ND
36	7.7±0.20	7.5±0.20	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

ตารางที่ 4.15 : ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *Salmonella* sp. ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ที่สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

ระยะเวลาหมัก (h)	**ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (mm)**						
	ไม่เติม NaCl	NaCl 5(%w/v)	NaCl 6(%w/v)	NaCl 7(%w/v)	NaCl 8(%w/v)	ไม่เติม NaCl	NaCl 5(%w/v)
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	7.6±0.11	6.5±0.08	ND	6.8±0.10	ND	ND	ND
24	8.0±0.11	ND	ND	ND	ND	ND	ND
36	6.8±0.21	ND	7.6±0.25	ND	ND	ND	ND
48	ND	ND	7.0±0.15	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.16 : ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *E.coli* ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ที่สภาวะความเป็นกรด

ระยะเวลาหมัก (h)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (mm)		
	control	pH 2	pH 4
0	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
12	ND	ND	8.7±0.12
18	ND	ND	8.0±0.15
24	6.6±0.15	ND	ND
36	7.6± 0.22	ND	ND
48	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

ตารางที่ 4.17 : ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *Salmonella* sp. ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ที่สภาวะความเป็นกรด

ระยะเวลาหมัก (h)	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (mm)		
	control	pH 2	pH 4
0	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
12	ND	ND	9.5±0.23
18	7.5±0.15	ND	7.6±0.12
24	8.2±0.20	ND	ND
36	6.8±0.18	ND	ND
48	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.18 ปริมาณกล้าเชื้อสำเร็จรูปแบคทีเรียแล็กติก *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ที่มีชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 6 เดือน

Storage time (Month)	จำนวนกล้าเชื้อที่อยู่รอด (CFU/g)					
	Leuconostoc mesenteroides ssp. *mesenteroides/dextranicum*			*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii*		
	15 ^{o}C	25 ^{o}C	35 ^{o}C	15 ^{o}C	25 ^{o}C	35 ^{o}C
0	9.31±0.23	9.31±0.23	9.31±0.23	8.72±0.23	8.72±0.23	8.72±0.23
1	8.30±1.23	8.30±1.23	ND	7.30±1.23	ND	ND
3	8.00±1.26	8.00±1.26	ND	4.00±1.26	ND	ND
6	7.45±1.21	7.45±1.21	ND	2.45±1.21	ND	ND

ND หมายถึง not detected คือ ตรวจไม่พบจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตในระหว่างการเก็บรักษา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตอนที่ 5 ผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rDNA

จากการทดสอบคุณสมบัติของกล้าเชื้อแบคทีเรียแล็กติกที่ใช้ในการหมักดองผักผสมพบว่ากล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides/dextranicum* เป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียแล็กติกที่มีคุณสมบัติในการหมักดองผัก-ผลไม้ และทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ดีเป็นไปตามคุณภาพตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ผัก-ผลไม้ดองได้ จึงได้มีการนำกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides/dextranicum* มา ทดสอบคุณสมบัติความคล้ายคลึงกันของยีน 16S rRNA บางส่วน (partial sequence) พบว่ากล้าเชื้อดังกล่าวมีคุณสมบัติของการเป็นกล้าเชื้อ *Leuconostoc pseudomesenteroides* จากฐานข้อมูล GenBank ที่ accession number LC223100 โดยมี % ความคล้ายคลึงกันของยีน 100% similarity อ้างอิงจากฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information)

ตารางที่ 4.19 การทดสอบความคล้ายคลึงของช่วงยีน 16S rRNA บางส่วน (partial sequence) ของกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. mesenteroides/dextranicum ที่อุณหภูมิ -25^{O}C โดยเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information)

Identification results	Similarity (%)	NCBI Accession no.
Leuconostoc pseudomesenteroides gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: 607	1488/1488 (100%)	LC223100

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

นำกล้า *Leuconostoc mesenteroides* ssp. และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp *delbrueckii* ที่ได้จากการคัดเลือกและจัดจำแนกในระดับชนิด (Species) ด้วยชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูปแบบ API 50 CHL มาผลิตกล้าเชื้อผงด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยวิธีการระเหิดแห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer ได้สภาวะที่เหมาะสมคือ ที่ความดัน 0.045 มิลลิบาร์ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ร่วมกับการใช้ sodium chloride (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 10 15 20 (w/v) และ Maltodextrin ความเข้มข้นร้อยละ 10 20 30 (w/v) พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของการใช้ sodium chloride คือร้อยละ 15 และ 20 ส่วน Maltodextrin คือร้อยละ 30 โดยพิจารณาจากผลผลิตสุทธิที่ได้จากกระบวนการผลิต (% yield) ของผงแห้งที่ได้มากที่สุดถึงร้อยละ 90 ที่มีความชื้นไม่เกินร้อยละ 5 และปริมาณน้ำอิสระ (a_w) ไม่เกิน 0.4 ตามเกณฑ์คุณสมบัติผลิตภัณฑ์ผงแห้ง จากนั้นนำไปทดสอบประสิทธิภาพความสามารถต่อการเป็นสารปกป้อง (cryoprotectant) และคุณสมบัติของกล้าเชื้อ โดยทดสอบคุณสมบัติของกล้าเชื้อผงในสภาวะจำลองการดองเกลือ (brine) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แบบ facultative anaerobe ปรับความเข้มข้นของน้ำเกลือเป็น 5, 6, 7 และ 8 %(w/v) ร่วมกับการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ในระดับ pH 2, 3, 4 และ 5 โดยวางแผนการทำการทดลองแบบ factorial experiments in CRD พบว่าหลังจากผ่านกระบวนการผลิตด้วยเครื่อง freeze dryer ที่สภาวะดังกล่าว มีกล้าเชื้อ คัดเลือกและจัดจำแนกในระดับชนิด (Species) ด้วยชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูปแบบ API 50 CHL หลงเหลือประมาณ log 8-10 cfu/g จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 12 log cfu/g และกล้าเชื้อผงที่ได้มีความสามารถในการผลิต crude bacteriocin ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 2 ชนิดได้แก่ *Salmonella spp*. และ *E.coli* อย่างไรก็ตามยังพบว่ากล้าเชื้อผง *Leuconostoc mesenteroides* ssp. ที่มี Nacl ร้อยละ 15 Maltodextrin ร้อยละ 30 เป็นสารปกป้อง มีกิจกรรมของเอ็นไซม์ (enzyme activity) 2 ชนิด ได้แก่ cellulase และ pectinase ซึ่งเป็นคุณลักษณะที่ดีของกล้าเชื้อที่จะนำไปใช้ในการหมักดองอาหารต่อไป และศึกษาอายุการเก็บรักษาของผงสำเร็จรูปกล้าเชื้อสำหรับแปรรูปผักผลไม้ดองโดยใช้บรรจุภัณฑ์คือถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ ที่อุณหภูมิ 15 25 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า *Leuconostoc mesenteroides ssp.* มีประสิทธิภาพและคุณสมบัติของความเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติดที่ดีมีแนวโน้มที่จะนำกล้าเชื้อดังกล่าวไปทดสอบการดองจริงต่อไปได้ จึงได้มีการนำกล้าเชื้อดังกล่าวทดสอบคุณสมบัติความคล้ายคลึงกันของยีน 16S rRNA บางส่วน (partial sequence) พบว่ากล้าเชื้อดังกล่าวมีคุณสมบัติของการเป็นกล้าเชื้อ *Leuconostoc pseudomesenteroides* จากฐานข้อมูล GenBank ที่ accession number LC223100 อ้างอิงจากฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) จึงยืนยันได้ว่าในกระบวนการวิจัยนี้กล้าเชื้อผงสำเร็จรูป *Leuconostoc mesenteroides* ssp.

นี้สามารถนำไปใช้ในการเป็นกล้าเชื้อผงสำเร็จรูปที่ใช้งานได้ง่าย สะดวกและมีความปลอดภัยสำหรับการหมักดองผักและผลไม้

ข้อเสนอแนะ

การยืนยันสายพันธุ์ของกล้าเชื้อแบคทีเรียแล็คติก *Leuconostoc mesenteroides* ssp. ด้วยการทดสอบคุณสมบัติความคล้ายคลึงกันของยีน 16S rRNA แล้วจึงทำการฝากเก็บรักษากล้าเชื้อที่แหล่งเก็บเชื้อจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เพื่อการเก็บรักษาในสภาวะที่เหมาะสมและสำหรับการเผยแพร่เชื้อจุลินทรีย์เพื่อการศึกษาวิจัยและประโยชน์ในเชิงพานิชย์ต่อผู้ที่มีความสนใจต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนผักกาดดอง (มผช 284/2547).

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. and Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic Acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control 17: 454-461.

Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In S. Salminen, A. von Wright and A. Ouwehand (eds.). Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects (3rd ed., pp. 1-66). New York: Marcel Dekker.

Caggia C., Randazzo C.L., Salvo M. DI., Romeo F. and Giudici P. (2004). Occurrence of Listeria monocytogenes in green table olives. Journal of Food Protection, 67: 2189–2194.

Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., and Gibbs, P. (2004). Relevant factors for the preparation of freezedried lactic acid bacteria. International Dairy Journal, 14: 835–847.

Codex Alimentarius Commission. Codex standard for table olives (CODEX stan 66-1981).

Codex Alimentarius Commission. Codex standard for pickled cucumber (cucumber pickles) CODEX STAN 115-1981.

Diana Berner and Helmut Viernstein. (2006). Effect of protective agents on the viability of *Lactococcus lactis* subjected to freeze-thawing and freeze-drying. Scientia Pharmaceutica (Sci. Pharm.) 74: 137-149.

Fleming H.P., Daeschel M.A., Mcfeeters R.F. and Pieson M.D. (1989). Btyric acid spoilage of fermented Cucumber. Journal of food science. Volume 54: 636-639

Flora Valeria Romeo. (2012). Microbiological Aspects of Table Olives. Chapter 15 . [online] Available: http://dx.doi.org/10.5772/51479

Hassan Pyar and Kok-Khiang Peh. (2014). Cost effectiveness of Cryoprotective Agent and Modified De-man Rogosa Sharpe medium on growth of Lactobacillus acidophilus. Pakistan Journal of Biological Sciences 17(4): 462-471.

Hutkins, R.W. (2006). Microbiology and Technology of Fermented Foods 1st ed. Blackwell Publishing, USA.

Jihong Li at al. (2013). Toxin Plasmids of *Clostridium perfringens*. Microbiology and Molecular Biology. Volume 77 Number 2: 208-233.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Kacem, M. and Karem, N-E. (2006). Microbiological study of naturally fermented Algerian Green olives: isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts along with the effects of brine solutions obtained at the end of olive fermentation on Lactobacillus plantarum growth. Grasas y Aceites 57 (3): 292-300.

Mäki, M. (2004). Lactic acid bacteria in vegetable fermentations. In S. Salminen, A. von Wright and A. Ouwehand (eds.). Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects (3rd ed., pp. 419-430). New York: Marcel Dekker.

Manas Ranjan Swain, Marimuthu Anandharaj, Ramesh Chandra Ray and Rizwana Parveen Rani. (2014). Fermented Fruits and Vegetables of Asia: A Potential Source of Probiotics. Biotechnology Research International. Volume 2014: 1-19

Morgan, N. Herman, P.A. White b and G. Vesey. (2006). Preservation of micro-organisms by drying; A review. Journal of Microbiological Methods 66:183–193.

Neti Yuliana, Siti Nurdjanah and Mika Margareta. (2013). The effect of a mixed-starter culture of lactic acid bacteria on the characteristics of pickled Orange- Fleshed sweet Potato (*Ipomoea bactatas* L.). Journal of Microbiology. Vol7.

Ross R.P., Desmond C., Fitzgerald G.F., and Stanton C. (2005). Overcoming the technological hundles in the development of probiotic foods. Journal of Applied Microbiological. 98: 1410-1417

Subhadrabandhu S. (2001). Under-utilized tropical fruits of Thailand. Bangkok: Regional Office for Asia and the Pacific Publication.

Suzanne D. Johanningsmeier, Wendy Franco, Ilenys Perez-Diaz, and Roger F. McFeeters. (2012). Influence of Sodium Chloride, pH, and Lactic Acid Bacteria on Anaerobic Lactic Acid Utilization during Fermented Cucumber Spoilage. Journal of Food Science. Vol. 77: 397-404.

Tanganurat, W., Quinquis, B., Leelawatcharamas, V. and Bolotin, A. (2009). Genotypic and phenotypic characterization of Lactobacillus plantarum strains isolated from Thai fermented fruits and vegetables. Journal of Basic Microbiology 49: 377-385.

Wendy Franco, Ilenys M. Pérez-Díaz, Suzanne Johanningsmeier and Roger F. (2011). Characteristics of Spoilage-Associated Secondary Cucumber Fermentation. Applied and Environmental Microbiology. P: 1273–1284

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก

เกิดเมื่อวันที่ 12 เดือนมีนาคม พ.ศ.2502 ณ จังหวัดนครราชสีมา ปัจจุบันดำรงตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ สังกัดสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. (ชีววิทยา)จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ. 2523 จบการศึกษาระดับปริญญาโท (Biotechnology and Biochemistry) จาก Mie University ประเทศญี่ปุ่น เมื่อปี พ.ศ. 2536 และจบการศึกษาระดับปริญญาเอก (Applied Sciences and Biotechnology) จาก Mie University ประเทศญี่ปุ่น เมื่อปี พ.ศ. 2539

อีเมลล์ : piyawan@sut.ac.th , pgasaluck@gmail.com

โทร 044-224270

ความเชี่ยวชาญ :

- Food Microbiology, Food Fermentation and Microbiological Food Safety
- Control of food borne pathogen (food biopreservative; nisin/ bacteriocin/ natural antimicrobials) in food chain
- Preservative packaging and the hygienic aspects
- Microbe-microbe interaction, microbiological challenge testing

ผลงานตีพิมพ์นานาชาติ :

Sittisart, P., and Gasaluck, P. (2022) Biosurfactant production by *Lactobacillus plantarum* MGL-8 from mango waste. *Journal of Applied Microbiology*, 132(4), 2883-2893.

Mahisanan, T., Gasaluck, P. & Eumkeb, G. (2017). A novel soybean flour as a cryoprotectant in freeze-dried *Bacillus subtilis* SB-MYP-1. LWT - Food Science and Technology, 77, 152-159.

Sittisart, P., Mahisanan, T., & Gasaluck, P. (2016). Decontamination and Quality Safety Control of Chili (*Capsicum annuum* L.) after Post-harvest Using Washing Process with Biosurfactant, Agricultural Science Journal, 47:3 (Suppl.), 43-46.

Mahidsanan, T. and Gasaluck, P. (2014). Improvement of Poly-γ-glutamic acid (PGA) Producing *Bacillus subtilis* SB-MYP-1 by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) Mutagenesis.The 2nd International Conference on Agriculture and Agro-Industry 2014 (ICAAI2014) On November 20-21, 2014 Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.

Gasaluck, P., Srithamma, L., Kongmanklang, C. (2012). Microbial and heavy metal contamination monitoring of ready-to eat food in Nakhon Ratchasima province. International Journal of Food, Nutrition and Public Health Vol.5 No. 1/2/3.

Chanprasert, N. and Gasaluck, P. (2011). Bacteriocin production and its crude characterization of lactic acid bacteria isolates from pickled *Garcinia schomburgkiana* Pierre. Asian Journal of Food and Agro-Industry. 4(01), 54-64.

Mahidsanan, T. and Gasaluck, P. (2011). Effect of freeze drying and maltodextrin on Polyglutamic acid production ability of *Bacillus subtilis* starter powder. In Proceeding International Food onference “Life I rove ent through Food Technology” Surabaya, October 28th-29th pp. 80-85.

Chanprasert, N. and Gasaluck, P. (2010). Bacteriocin production and its crude characterization of Lactic acid bacteria isolates from pickled *Garcinia schomburgkiana* Pierre. In Proceeding of 12th Food Innovation Asia Conference on Indigenous Food Research and Development to Global Market). BITEC, Bangkok, Thailand. June 17-18, pp. 640-649.

Chanprasert, N. and Gasaluck, P. (2010). Morphological changes of *Bacillus cereus* TISTR 687 cells induced by crude bacteriocin producing *Lactococcus lactis* ssp. lactis 1. In Proceeding of 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology (TSB): International Conference on Biotechnology for Healthy Living. Prince of Songkla University, Trang Campos, Thailand. October 20-22.

Ningsanond, S., Gasaluck, P., et al. (2008). Microbial Contamination of Pork at Abattoirs, during Transportation, and at Retail Sites. A Final report to the Center for System Research in Food Safety and Nutrition (FSN Center) Knowledge Network Institute of Thailand (KNIT).

Petchkongkaew, A., Taillandier,P., Gasaluck, P., and Lebrihi, A. (2008). Isolation of *Bacillus* spp. from Thai Fermented Soybean (Thua-nao): Screening for Aflatoxin B1 and Ochratoxin A detoxification. Journal of Applied Microbiology Vol.104 (No.5) 1495- 1502 (8).

Thongbai, B., Gasaluck, P., and Waites, W. M. (2006). Morphological changes of temperature and pH-stressed *Salmonella* following exposure to cetylpyridinium chloride and nisin. LWT- Food Science and Technology. (39) 1180-1188.

Thongbai, B., Waites, W. M. and Gasaluck, P. (2005). The susceptibility of Bioluminescent *Salmonella typhimurium* Contaminating Chicken Carcases to Cetylpyridinium Cholide and Nisin. Kasetsart Journal: Natural Science October-December 2005. Vol. 39 No. 4 (622-632).

Gasaluck, P. (1999). The Development of the Curricula of Food Technology of Suranaree University of Technology (SUT). In Proceedings of the International Workshop on University Education, Research and in Asia-Pacific Region, Mie University Press, April 6 and 7.

Gasaluck, P., Yokoyama, K., Kimura, T. and Sugahara, I. (1996). The occurrence of *Bacillus cereus* in Local Thai Traditional Foods. J. Antibact. Antifung. Agents Vol 24. No. 5 (349-356).

Gasaluck, P., Yokoyama, K., Kimura, T. and Sugahara, I. (1996). Some Chemical and Microbiological Properties of Thai Fish Sauce and Paste. J. Antibact. Antifung. Agents Vol 24. No. 6, (385-390).

Chinzei, Y., Gasaluck, P., et al. (1995). "A Study of Three Ende ic Diseases in ural Areas of ortheast Thailand." International Scientific esearch rogra (Grant o. 04041057) Mie University, School of Medicine.

Gasaluck, P. (1994). "Thai Fer ented Fish Sauce." In roceedings of the International Seafood Research Meeting of Mie University, Mie Academic Press, September 30.

Hibasami, H., Midorikawa, Y., Gasaluck, P., Tsukada, T., Shirakawa, S., Yoshimura, H., Imai, M., Nakashima, K. (1992). Growth Inhibition of Canida By 15- Deoxyspergualin, an Immunosuppressive Agent Used In Experiment Organ Transplantation. Letters in Applied Microbiology. Vol 14 (81-83).

Hibasami, H., Midorigawa, Y., Gasaluck, P., Yoshimura, H., Masuji, A., Takaji, S., Nakasahima, K., Imai M. (1991). Bactericidal Effect of 15-Deoxyspergualin, on *Staphylococcus aureus*. J. Chemotherapy Vol. 37 (202-205).

Gasaluck, P., Midorigawa, Y., Imai, M. and Yoshimura, H. (1990). Enteropathogenic *E.coli* (ETEC) Isolation in Northeast Thailand and Their Resistance to Antibiotics. Mie Medical Journal Vol 40 (3):379-384.

Thongrajai, P., Chanarat, P., Kulapongs, P., Chanarat, N., Gasaluck, P. and Kaewpila, S. (1988). Epidermiological Assessment of Anti-HIV I Anti-bodies in Thailand, Sounteast Asian J.Trop.Med.Pub.Hith Vol 19. No. 4 Dec.

Thongrajai, P., Chanarat, P., Kulapongs, P., Chanarat, N. and Gasaluck, P. (1988). Seroepidemiology of Anti-HIV I Antibodies. In Thailand, Srinagarind Hospital Medicine Vol 3. No. 4, Oct-Dec.

Thongrajai, P., Gasaluck, P. et al. (1986). Detection of Anti-Rota Virus Secretory IgA by ELISA. The Second Annual Meeting on Faculty of Medicine Khon Kaen University.

Thongrajai, P., Gasaluck, P. et al., (1986). Diarrhoea in Children in Rural Thailand. A Full research report to the USAID Department of Microbiogy Faculty of Medicine Khon Kaen University.

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ : โครงการเรื่อง“การพัฒนาคุณภาพและประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการล้างผัก ผลไม้และพื้นผิววัสดุ”. 2559. รับสนับสนุนจากทุนวช.57 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ: โครงการเรื่อง “โปรไบโอติกและเชอร์รี่เปรี้ยวหมักเสริมสุขภาพ”. 2558. รับสนับสนุนจากทุนวช.57 (สานักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ: โครงการเรื่อง “ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมจากถั่วเหลืองหมักผงผสมบุกสำหรับผู้สูงอายุ” 2558. รับสนับสนุนจากทุนวช.55 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าชุดโครงการ: โครงการเรื่อง “บาซิลัส สับทิลิส ฤทธิ์ทางชีวภาพ คุณค่าทางโภชนาการและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของถั่วหมักเพื่อเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ” 2558 รับสนับสนุนจากทุนวช.54 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ: โครงการเรื่อง “เทคโนโลยีการผลิตหัวเชื้อ (*Bacillus subtilis*) เพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก”. 2558. รับสนับสนุนจากทุนวช.54 (สานักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ: โครงการเรื่อง “สมบัติวิทยากระแสและการประยุกต์ใช้เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากถั่วเหลืองหมักด้วยกล้าเชื้อบาซิลัส สับทิลิสในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ”.2558. รับสนับสนุนจากทุนวช.54 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ: โครงการเรื่อง “การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารขบเคี้ยวเสริมสุขภาพจากถั่วหมัก”. 2558. รับสนับสนุนจากทุนวช.54 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ: โครงการเรื่อง “การจัดทำระบบ GMP สาหรับน้าปรุงรสผัดหมี่”.2555. รับสนับสนุนจากทุน iTAP มทส

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย : โครงการเรื่อง “การลดกลิ่นไม่พึงประสงค์และเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก โดยการใช้ *Bacillus subtilis* เป็นกล้าเชื้อในการหมัก”.2553. รับสนับสนุนจากทุนวช.53 (สานักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย : โครงการเรื่อง “การเฝ้าระวังการปนเปื้อนจุลินทรีย์และโลหะ หนักในอาหารสำเร็จรูป เพื่อจำหน่ายในเขตจังหวัดนครราชสีมา”. 2553. รับสนับสนุนจากทุนวช.53 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย : โครงการเรื่อง “สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักผลเชอร์รี่เปรี้ยว (*Prunus cerasus* L.)”. 2553. รับสนับสนุนจากทุนวช.53 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย โครงการเรื่อง “การศึกษาผลการเติม แคลเซียมเบนโทไนต์ในอาหารสัตว์ต่อการดูดซับสารพิษจากเชื้อรา”. 2553. รับสนับสนุนจากทุน iTAP มทส

นางปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย โครงการเรื่อง “การพัฒนากุนเชียงไขมันต่ำ”. 2553. รับทุนสนับสนุนจากทุนศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมเขต 6 จังหวัดนครราชสีมา

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย โครงการเรื่อง “การยืดอายุการเก็บรักษาขนมถั่วกวนอบเทียน” 2553. รับสนับสนุนจากทุน iTAP มทส.

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย: โครงการเรื่อง “การศึกษาอายุการเก็บของขนมถั่วอบเทียน”.2552. รับสนับสนุนจากทุน iTAP มทส.

ปิยะวรรณ กาสลัก ผู้ร่วมโครงการวิจัย: โครงการเรื่อง “ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในโรงฆ่าสุกร การขนส่งจากโรงฆ่าไปยัง จุดจาหน่าย และแหล่งจาหน่ายเนื้อสุกร ในเขตจังหวัดนครราชสีมาและอุบลราชธานี” 2552 รับสนับสนุนจากทุนวิจัยสถาบันคลังสมองแห่งชาติ

ปิยะวรรณ กาสลัก ผู้ร่วมโครงการวิจัยการวิจัย: โครงการเรื่อง “สถานการณ์ความปลอดภัยด้านผักและผลไม้กรณีตลาดนัด-รถเร่ (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง)”. 2548. รับสนับสนุนจากทุนวิจัยสถาบันคลังสมองแห่งชาติ

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย: โครงการเรื่อง “การใช้ไนซินในการยับยั้งการงอกของสปอร์ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกมาจากชิ้นปลาที่บรรจุในสภาวะการปรับเปลี่ยนบรรยากาศ”. 2544. รับสนับสนุนจากทุนวิจัยอาจารย์ใหม่ มทส.

สิทธิบัตรสิ่งประดิษฐ์

- อนุสิทธิบัตร กรรมวิธีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากมะม่วงสำหรับฆ่าเชื้อในกระบวนการล้างผัก-ผลไม้สด เลขที่คำขอ 2003002200
- สิทธิบัตร กรรมวิธีการผลิตสารทำความสะอาดจากการหมักผลไม้ไทยรสเปรี้ยว เลขที่คำขอ 1401004175
- สิทธิบัตร เครื่องกรองของเหลวมีกากแบบต่อเนื่อง เลขที่คำขอ 1501005214
- สิทธิบัตร ถังหมักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวัตถุดิบทางการเกษตรเหลือใช้ เลขที่คำขอ 1501005215
- สิทธิบัตร ผลิตภัณฑ์อาหารขบเคี้ยวเสริมสุขภาพจากถั่วเหลืองที่หมักด้วยกล้าเชื้อ *Bacilus subtilis* SB-MYP-1 เลขที่คำขอ 1601004346

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

งานบริการวิชาการ :

- Consultants on microbial contamination of fruit in light syrup product, Dole Thailand Co., Ltd. (2015)
- Chair an of the working group for “production of biosurfactant to re lace synthetic chemicals reagent.” Nakhonratchasima (2016)
- Consultants on environmental health for enterprise that are harmful to the health, Regional Health Promotion Center 5, Nakhon Ratchasima (2003)
- Chairman of the working group of establishments of Laboratory Quality System for approval the hallmark of the Thai Industrial Standards Institute, ISO/17025 of the Center for Science and Technology, Suranaree University of Technology (2003)
- Chairman of the working group of establishments of Occupational health and safety System, Thai Industrial Standards Institute, Suranaree University of Technology TIS/18000 (2003)
- Consultant to industry and Co-worker training for employee in Nakhon Ratchasima on subject “The safety standard GM HA” (2001)

วิทยากร :

- Biosurfactants for use as Cleansing Agents. Green Hotel & Resort, Khon Kaen (2014)
- Go green go organic of Biosurfactants. Technopolis, Suranaree University of Technology (2011)
- Biosurfactants for use as cleansing agents. Technopolis, Suranaree University of Technology (2011)
- Food safety management for manufacturers. Nakhon Ratchasima councils School (2009)
- The role of microorganisms in processed mushrooms. Suranaree Agricultural Fair (2008)
- Microbial Monitoring of Thailand's Food Standards. Cooperate with Food Intelligence Center Thailand and National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (2006)
- GMP/HACCP, food hazard, food control and contamination, personal hygiene. Thailand Tapioca Starch Company (2004)

Innovative Research:

- File a patent application in topic “The process of cleaning agent from Thai sour fruit fermentation”
- Prototypes devices for control quality and fermentation process of cleaning agent from agricultural wastes (Fermenter), 2015

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย

นาง สุวิมล เจตะวัฒนะ ปัจจุบันดำรงตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์นิวเคลียร์ชำนาญการพิเศษ สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ โดยมีประวัติการศึกษาดังนี้

ปีที่สำเร็จการศึกษา	คุณวุฒิและวิชาเอก	สถาบัน
2530	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2544	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2551	Ph.D. (Free Radical and Radiation Biology)	University of Iowa, USA

สถานที่ติดต่อ สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) 9/9 หมู่ 7 ต. ทรายมูล อ. องครักษ์ จ.นครนายก 26120

โทรศัพท์/โทรสาร 037-392-943 / 037-392-942

E-mail address: sjetawattana@hotmail.com

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Cancer biology and hypoxia, free radicals in mammalian cells,

Radiation sterilization of medical products

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

งานวิจัยที่ทำสร็จแล้ว

(1.) หัวหน้าโครงการวิจัย ทุน สกว.

- The potential of Rang Chuet (Thunbergia laurifolia Linn) for the modulation of HIF-1 alpha stabilization in breast cancer, รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์, 39 หน้า

(2.) ผู้ร่วมวิจัย

- การเปลี่ยนแปลงในการตอบสนองของเซลล์มะเร็งเต้านมต่อรังสีแกมมาเมื่อได้รับสารสกัดจากใบมะรุม (ทุน สกว.), รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์, 30 หน้า
- โครงการผลิตโครงร่างสมานแผลจากโปรตีนไหมไฟโบรอินและไคโตซานผสมอนุภาคเงินนาโนโดยวิธีปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตย์ (ทุน MTEC), Antimicrobial electro spun silk fibroin mats with silver nanoparticles for wound dressing application in Fibers and Polymers 2012
- การพัฒนาชีวโมเลกุลสำหรับการวินิจฉัยมะเร็งตับด้วยเภสัชรังสี เฟส I, ทุนวิจัยจากงบประมาณสถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ การวิจัยลุล่วงแล้วร้อยละ 60
- การเตรียมเภสัชรังสีบอมบิซินเปปไทด์ติดฉลากด้วยแกลเลียม-68 สำหรับการถ่ายภาพมะเร็งต่อมลูกหมากด้วยเพทสแกน, ทุนวิจัยจากงบประมาณสถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ การวิจัยลุล่วงแล้วร้อยละ 50

ผลงานตีพิมพ์นานาชาติ

Kaewpila* S, Venkataraman S, Buettner GR, Oberley LW. (2008) Manganese superoxide dismutase modulates hypoxia-inducible factor-1 alpha induction via superoxide. Cancer Res. 2008 Apr 15;68(8):2781-8.

Jetawattana S. and C. Chaichantipayuth. (2003) Effects of radiation on antioxidants of medicinal plants. The 9th Nuclear Science and Technology Conference (19-21 June 2003), Bangkok.

Jetawattana S. and Y. Tiengthavaj. (2001) A study of the responses from the cosmetic manafacturers to the use of radiation in reducing microbial contamination in raw materials and cosmetic products. The 8th on Nuclear Science and Technology Conference (20-21 June 2001), OAEP.

Jetawattana S. et al. (1998) Reducing microbial contamination in herbal cosmetics and raw materials from natural source by gamma radiation. in proceeding The 7th on Nuclear Science and Technology Conference (1-2 Dec 1998), OAEP.

Jetawattana S., Na-Ranong N., Kajornchaiyakul V. (1998) Radiation Sterilization of natural rubber examination gloves. in proceeding. The 7th on Nuclear Science and Technology Conference (1-2 Dec 1998), OAEP. pp 186-198.

Dam A. M., Gazso L. G., Kaewpila S, .and Maschek I. (1996) Radiation treatment of pharmaceuticals. Radiat. Phys. Chem. 47(3):515-517.

Dam A. M., Gazso L. G., Kaewpila S. and Maschek I. (1995) Radiation Sterilization dose calculation for heparin and aprotinin based on ISO method 1. International Journal of Pharmaceutics 121: 245-248.* Kaewpila is Suwimol's maiden name

รางวัลผลงานวิจัยที่ได้รับ

- Milheim Foundation Grant #2005-16. (Suwimol Jetawattana, Principal Investigator), 1 July 2005 - 31 June 2006
- The Executive Council of Graduate and Professional Students Scholarly Presentation Award, U of Iowa, Fall 2007
- รางวัลวิทยานิพนธ์ (ระดับปริญญาเอก) ระดับดี ประจำปี 2554 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

ภาคผนวก

Report of Microbial Identification by partial 16S rDNA sequence analysis

Report of Microbial Identification by partial 16S rDNA sequence analysis
Sample Name : NCR-7

```
RID: HDPEE0PU014

Query= NCR7 contig

Length=1488

>NCR7 contig
TGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCACAGCGAAAG
GTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCA
AGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAAACTCAGTGTCGCATGA
CACAAAGTTAAAAGGCGCTTTGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGT
TGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCC
ACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCAC
AATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAA
GCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGGAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATA
CCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTT
ATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGT
GGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGC
GGCTTACTGGACTGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTTTCCGCCTCTT
AGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTGTTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACT
CAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG
CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTTTAGAGATAGAAGTGTTCTCTT
CGGAGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTCAGATGGGCACTCTA
GCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCCT
TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACCCGCGAGG
GTGAGCTAATCTCTTAAAGTACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATG
AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTT
GTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCTT
TTAGGAAGGAGCCGTCTAAGGCAGGACAGATGACTGGGGTGAAGTCGT

BLASTN 2.6.1+
Reference: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro
A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and
David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new
generation of protein database search programs", Nucleic
Acids Res. 25:3389-3402.
```

```
ALIGNMENTS
>LC223100.1 Leuconostoc pseudomesenteroides gene for 16S ribosomal RNA, partial
sequence, strain: 607
Length=1502

 Score = 2684 bits (2976),  Expect = 0.0
 Identities = 1488/1488 (100%), Gaps = 0/1488 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     TGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCACAGCGAAAG  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  15    TGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCACAGCGAAAG  74

Query  61    GTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  75    GTGCTTGCACCTTTCAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCA  134

Query  121   AGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAAACTCAGTGTCGCATGA  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  135   AGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAAACTCAGTGTCGCATGA  194

Query  181   CACAAAGTTAAAAGGCGCTTTGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGT  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  195   CACAAAGTTAAAAGGCGCTTTGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGT  254

Query  241   TGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCC  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  255   TGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCC  314

Query  301   ACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCAC  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  315   ACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCAC  374

Query  361   AATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAA  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  375   AATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAA  434

Query  421   GCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGGAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATA  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  435   GCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGGAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATA  494

Query  481   CCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTT  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  495   CCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTT  554

Query  541   ATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATTAAGTCTGATGTGAAAGCC  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  555   ATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATTAAGTCTGATGTGAAAGCC  614

Query  601   CGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGT  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  615   CGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAGTAGAGGTAAGT  674

Query  661   GGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGC  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  675   GGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGC  734

Query  721   GGCTTACTGGACTGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGA  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  735   GGCTTACTGGACTGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGA  794

Query  781   TACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTTTCCGCCTCTT  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  795   TACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTTTCCGCCTCTT  854

Query  841   AGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTGTTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACT  900
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  855   AGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTGTTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACT  914
```

```
Query  901   CAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG  960
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  915   CAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG  974

Query  961   CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTTTAGAGATAGAAGTGTTCTCTT  1020
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  975   CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTTTAGAGATAGAAGTGTTCTCTT  1034

Query  1021  CGGAGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT  1080
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1035  CGGAGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT  1094

Query  1081  TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTCAGATGGGCACTCTA  1140
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1095  TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTCAGATGGGCACTCTA  1154

Query  1141  GCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCCT  1200
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1155  GCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCCT  1214

Query  1201  TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACCCGCGAGG  1260
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1215  TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACCCGCGAGG  1274

Query  1261  GTGAGCTAATCTCTTAAAGTACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATG  1320
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1275  GTGAGCTAATCTCTTAAAGTACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATG  1334

Query  1321  AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTT  1380
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1335  AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTT  1394

Query  1381  GTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCTT  1440
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1395  GTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCTT  1454

Query  1441  TTAGGAAGGAGCCGTCTAAGGCAGGACAGATGACTGGGGTGAAGTCGT  1488
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1455  TTAGGAAGGAGCCGTCTAAGGCAGGACAGATGACTGGGGTGAAGTCGT  1502
```

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

```
LOCUS       LC223100                1502 bp    DNA     linear   BCT 16-MAR-2017
DEFINITION  Leuconostoc pseudomesenteroides gene for 16S ribosomal RNA, partial
            sequence, strain: 607.
ACCESSION   LC223100
VERSION     LC223100.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Leuconostoc pseudomesenteroides
  ORGANISM  Leuconostoc pseudomesenteroides
            Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Leuconostocaceae;
            Leuconostoc.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Chen,Y.S., Kuo,C.Y., Chen,Y.W., Ho,S. and Wu,H.C.
  TITLE     Characterization of multiple bacteriocins-producing Leuconostoc
            pseudomesenteroides 607 isolated from persimmon
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1502)
  AUTHORS   Chen,Y.S.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (13-MAR-2017) Contact:Yi-Sheng Chen Ming Chuan
            University, Department of Biotechnology; 5 De Ming Rd., Gui Shan
            District, Taoyuan City 333, Taiwan
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1502
                     /organism="Leuconostoc pseudomesenteroides"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="607"
                     /isolation_source="persimmon fruit"
                     /db_xref="taxon:33968"
                     /country="Taiwan:Nantou County, Puli Township"
                     /collection_date="2016-03"
                     /collected_by="Lu Wan-shan, Tang Qi-xuan, Ma Ching-han"
                     /identified_by="Yi-Sheng Chen"
                     /note="Multiple bacteriocins-producing ability"
     rRNA            <1..>1502
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 taagagtttg gacctggctc aggatgaacg ctggcggcgt gcctaataca tgcaagtcga
       61 acgcacagcg aaaggtgctt gcacctttca agtgagtggc gaacgggtga gtaacacgtg
      121 gacaacctgc ctcaaggctg gggataacat ttggaaacag atgctaatac cgaataaaac
      181 tcagtgtcgc atgacacaaa gttaaaaggc gctttggcgt cacctagaga tggatccgcg
      241 gtgcattagt tagttggtgg ggtaaaggcc taccaagaca atgatgcata gccgagttga
      301 gagactgatc ggccacattg ggactgagac acggcccaaa ctcctacggg aggctgcagt
      361 agggaatctt ccacaatggg cgaaagcctg atggagcaac gccgcgtgtg tgatgaaggc
      421 tttcgggtcg taaagcactg ttgtatggga agaacagcta gaatagggaa tgattttagt
      481 ttgacggtac cataccagaa agggacggct aaatacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt
      541 atgtcccgag cgttatccgg atttattggg cgtaaagcga gcgcagacgg ttgattaagt
      601 ctgatgtgaa agcccggagc tcaactccgg aatggcattg gaaactggtt aacttgagtg
      661 cagtagaggt aagtggaact ccatgtgtag cggtggaatg cgtagatata tggaagaaca
      721 ccagtggcga aggcggctta ctggactgta actgacgttg aggctcgaaa gtgtgggtag
      781 caaacaggat tagataccct ggtagtccac accgtaaacg atgaacacta ggtgttagga
      841 ggtttccgcc tcttagtgcc gaagctaacg cattaagtgt tccgcctggg gagtacgacc
      901 gcaaggttga aactcaaagg aattgacggg gacccgcaca agcggtggag catgtggttt
      961 aattcgaagc aacgcgaaga accttaccag gtcttgacat cctttgaagc ttttagagat
     1021 agaagtgttc tcttcggaga caaagtgaca ggtggtgcat ggtcgtcgtc agctcgtgtc
     1081 gtgagatgtt gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt attgttagtt gccagcattc
     1141 agatgggcac tctagcgaga ctgccggtga caaaccggag gaaggcgggg acgacgtcag
     1201 atcatcatgc cccttatgac ctgggctaca cacgtgctac aatggcgtat acaacgagtt
     1261 gccaacccgc gagggtgagc taatctctta aagtacgtct cagttcggat tgtagtctgc
     1321 aactcgacta catgaagtcg gaatcgctag taatcgcgga tcagcacgcc gcggtgaata
     1381 cgttcccggg tcttgtacac accgcccgtc acaccatggg agtttgtaat gcccaaagcc
     1441 ggtggcctaa ccttttagga aggagccgtc taaggcagga cagatgactg ggtgaagtc
     1501 gt
//
```