# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

**การพัฒนากระบวนการผลิตปลาส้มด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกร่วมกับยีสต์ และการแปรรูปผลิตภัณฑ์**

**Development of Thai fermented fish (*Pla-som*) production using co-culture starter of lactic acid bacteria and yeast and *pla-som* processing**


ผศ.ดร.สุภชัย นิลทัน์

นายประมวล ทรายทอง

ผศ.บุษกร อุดรภิรมย์



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

มหาวิทยาลัยทักษิณ

# คำรับรองคุณภาพ

**รายงานวิจัยเรื่อง** **การพัฒนากระบวนการผลิตปลาส้มด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกร่วมกับยีสต์และการแปรรูปผลิตภัณฑ์**

**ผู้วิจัย** ศุภชัย นิติพันธ์

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยทักษิณ ขอรับรองว่ารายงานวิจัยฉบับนี้ได้ผ่านการประเมินจากผู้ทรงคุณวุฒิแล้ว มีความเห็นว่าผลงานวิจัยฉบับนี้มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์

- ☐ ดีมาก
- ☑ ดี
- ☐ ปานกลาง
- ☐ พอใช้
- ☐ ควรปรับปรุง

(อาจารย์ ดร.วันลภ ดิษสุวรรณ์)
ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา
วันที่ 2 มิถุนายน 2563

# บทคัดย่อ

**ชื่อเรื่อง**: การพัฒนากระบวนการผลิตปลาส้มด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกร่วมกับยีสต์และการแปรรูปผลิตภัณฑ์

**ผู้วิจัย**: ผศ.ดร.ศุภชัย นิติพันธ์ นายประมวล ทรายทอง และ ผศ.บุษกร อุตรภิชาติ

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยทักษิณ

ระยะเวลาทำการวิจัย 12 เดือน

.....

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์เป็นสายพันธุ์เด่นในระหว่างการหมักปลาส้มของชุมชนทะเลน้อย จังหวัดพัทลุง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อผสมในการลดระยะเวลาการหมักปลาส้มที่มีคุณภาพและความปลอดภัยสูงกว่าการหมักตามธรรมชาติ พัฒนาผลิตภัณฑ์จากปลาส้ม ทดสอบทางประสาทสัมผัส และคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ พบว่าจีนัส *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์เด่นในการหมัก คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 44 ไอโซเลต จัดกลุ่มด้วยเทคนิค RpoB-RFLP ด้วยเอนไซม์ *Pbs*I แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ (1) *L. plantarum* และ *L. lactis* (2) *L. amylovorans* (3) *L. casei* คิดเป็น 68.18% 18.18% และ 13.64% ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ไอโซเลต WP48/12 คัดแยกได้จากชั่วโมง 48 ของการหมัก โดยกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1.0% (w/v) สามารถสร้างกรดแลคติก เท่ากับ 1.38% ในเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งใกล้เคียงกับการหมักด้วยวิธีธรรมชาติในเวลา 120 ชั่วโมง (1.42%) เมื่อใช้กล้าเชื้อ *L. plantarum* WP48/12 ความเข้มข้น 1.0% (w/v) ร่วมกับยีสต์ *S. cerevisiae* ความเข้มข้น 0.5% (w/v) ส่งผลให้คุณภาพของปลาส้มดีขึ้นได้รับคะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสสูงกว่าปลาส้มที่หมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรีย *L. plantarum* WP48/12 เพียงชนิดเดียว

**คำสำคัญ**: ปลาหมัก กล้าเชื้อ แบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์ พัทลุง

## Abstract

This research are aimed to isolate dominant lactic acid bacteria and yeast from pla-som, produced by Thala-Noi community, Phatthalung province, during fermentation, to use as the mixed starter culture for reducing fermentation time, good quality and safe food, to develop pla-som productions, sensory test and nutrition analysis. The result indicated the genus *Lactobacillus* as dominant bacteria of pla-som product. Forty-four lactic acid bacteria was isolated and then three different genetic variations were grouped using RpoB-PFLP with *Pbs*I following (1) *L. plantarum* and *L. lactis,* (2) *L. amylovorans,* and (3) *L. casei* of 68.18%,18.18%, and 13.64%, respectively. The *L. plantarum* isolate WP48/12, was isolated from 48 hour after fermentation, at 1.0% w/v concentration that produced lactic acid of 1.38 at 48 hour after fermentation as well as spontaneous fermentation at 120 hour (1.42% w/v). The pla-som was produced using mixed culture of 1.0% *L. plantarum* WP48/12 and 0.5% *S. cerevisiae* had higher sensory scores than using 1.0% *L. plantarum* WP48/12 only.


**Keywords:** Fermented fish, Starter culture, Lactic acid bacteria, Yeast, Phatthalung

## ประกาศคุณูปการ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินแผ่นดิน มหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปีงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ 2561 สัญญาเลขที่ R01-2561-346 (FE4312) ขอขอบคุณสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง และสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ให้ความอนุเคราะห์การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสและการพัฒนาผลิตภัณฑ์

คณะผู้วิจัย

สิงหาคม 2562

# สารบัญ


| เรื่อง | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อ | (1) |
| ประกาศคุณูปการ | (3) |
| สารบัญ | (4) |
| สารบัญตาราง | (6) |
| สารบัญภาพ | (7) |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| วัตถุประสงค์ | 1 |
| ขอบเขตของการวิจัย | 2 |
| บทที่ 2 การตรวจเอกสาร | 4 |
| ผลิตภัณฑ์ปลาส้ม | 4 |
| กระบวนการผลิตปลาส้มจังหวัดพัทลุง | 4 |
| จุลินทรีย์ที่สำคัญในการหมักปลาส้ม | 7 |
| งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 8 |
| บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย | 11 |
| การเก็บตัวอย่าง | 11 |
| การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี | 11 |
| การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียและยีสต์ | 12 |
| การติดตามการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียและยีสต์ | 12 |
| การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์ และจัดกลุ่มด้วยวิธี RFLP | 14 |
| ทดสอบประสิทธิภาพการสร้างกรดของแบคทีเรียคัดแยก | 15 |
| การเจริญของแบคทีเรียคัดแยก | 15 |
| การเตรียมกล้าเชื้อผสมสำหรับการผลิตปลาส้มโดยวิธีทำแห้ง | 15 |

# สารบัญ


| เรื่อง | หน้า |
|---|---|
| การเตรียมกล้าเชื้อผสมสำหรับการผลิตปลาส้มโดยวิธีทำแห้ง | 15 |
| อัตราส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก | 15 |
| อัตราส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกร่วมกับยีสต์ผสม | 16 |
| การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาส้มและการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการ | 16 |
| การทดสอบทางประสาทสัมผัส | 17 |
| ค่าสถิติที่ใช้วิเคราะห์ | 17 |
| บทที่ 4 ผลการวิจัย | 18 |
| คุณสมบัติทางเคมีของตัวอย่างปลาส้ม | 18 |
| ปริมาณแบคทีเรียและยีสต์ในตัวอย่างปลาส้ม | 18 |
| การติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรของแบคทีเรียและยีสต์จากตัวอย่างปลาส้ม ด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) | 20 |
| การคัดแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp. จากตัวอย่างปลาส้ม | 22 |
| การคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างปลาส้ม | 23 |
| การจัดกลุ่มแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. ที่คัดแยกได้ด้วยวิธี RFLP | 24 |
| การสร้างกรดแลคติกของ *Lactobacillus* spp. ที่คัดแยกได้ | 26 |
| การเจริญของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่คัดแยกได้ | 28 |
| อัตราส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อ *Lb.33casei* WP48/2 *L. amylovorans* WP48/11 และ *L. plantarum* WP48/12 | 29 |
| การทดสอบทางประสาทสัมผัสของปลาส้มที่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรีย | 32 |
| อัตราส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อแลคทีเรียกรดแลคติกผสมและกล้าเชื้อยีสต์ผสม | 34 |
| การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาส้มพร้อมรับประทานและคุณค่าทางโภชนาการ | 36 |
| บทที่ 5 อภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ | 63 |
| เอกสารอ้างอิง | 66 |
| ภาคผนวก | 69 |

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณกรดของตัวอย่างปลาส้ม | 18 |
| 2 | ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียกรดแลคติกของตัวอย่างปลาส้ม | 19 |
| 3 | ปริมาณยีสต์ของตัวอย่างปลาส้มในชั่งโมงที่ 0 24 48 72 96 และ 120 ของการหมัก | 19 |
| 4 | ชนิดของแบคทีเรียที่พบในในตัวอย่างปลาส้มด้วยเทคนิค 16S rDNA-PCR และ DGGE | 21 |
| 5 | ลักษณะโคโลนีและรูปร่างเซลล์ของยีสต์คัดแยกได้จากปลาส้ม | 23 |
| 6 | การดูดกลืนแสง ($OD_{540}$) ของเซลล์ยีสต์ในอาหารเหลว YM ที่เติมกรดแลคติก | 24 |
| 7 | รูปแบบของ rpoB-RFLP จากแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. ตัดด้วยเอ็นไซม์ *BpsI* | 25 |
| 8 | ปริมาณกรดแลคติกและปริมาณกรดแอซิติกของแต่ละไอโซเลตด้วยวิธี HPLC | 27 |

# สารบัญภาพ


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | แผนผังการผลิตปลาส้มของชุมชนทะเลน้อย อ.ควนขนุน จ.พัทลุง | 6 |
| 2 | ประชากรแบคทีเรียในตัวอย่างปลาส้มจากชั่วโมงการหมักที่ 0 ถึง 120 | 21 |
| 3 | การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกอาหาร MRS ที่เติม 0.004% bromocresol purple | 22 |
| 4 | การติดสีย้อมแกรมบวก และการทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลส | 22 |
| 5 | รูปแบบของการตัดยีน *rpoB*-RFLP ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bps*I | 25 |
| 6 | ค่าร้อยละของแบคทีเรีย *Lactobacillus spp.* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่าง | 26 |
| 7 | การเจริญของ *Lactobacillus* spp. ที่คัดแยกได้จากปลาส้ม วัดการเจริญ ด้วยการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ($OD_{600}$) | 29 |
| 8 | ปริมาณกรดแลคติกและความเป็นกรด-ด่างการหมักปลาส้มที่กล้าเชื้ออัตราส่วน 0.5% (w/v) | 30 |
| 9 | ปริมาณกรดแลคติกและความเป็นกรด-ด่างการหมักปลาส้มที่กล้าเชื้ออัตราส่วน 1.0% (w/v) | 31 |
| 10 | ปริมาณกรดแลคติกและความเป็นกรด-ด่างการหมักปลาส้มที่กล้าเชื้ออัตราส่วน 1.5% (w/v) | 32 |
| 11 | การทดสอบทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์ปลาส้มที่หมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรีย | 33 |
| 12 | การทดสอบทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์ปลาส้มเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* WP48/12 ที่อัตราส่วน 0.5 1.0 และ 1.5% (w/v) | 33 |
| 13 | ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกรดแลคติกในตัวอย่างปลาส้มที่หมักร่วมระหว่าง *L. plantarum* WP48/12 และ *S. cerevisiae* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ | 35 |
| 14 | คุณค่าทางโภชนาการของปลาส้มที่หมักด้วยกล้าเชื้อ 1% (w/v) *L. plantarum* WP48/12 และ 0.5% (w/v) *S. cerevisiae* | 38 |
| 15 | คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ปลาส้มทอดทรงเครื่องที่หมักด้วยกล้าเชื้อ1% (w/v) *L. plantarum* WP48/12 และ 0.5% (w/v) *S. cerevisiae* | 39 |

# บทที่ 1
# บทนำ

การผลิตปลาส้มจากชุมชนทะเลน้อย อำเภอควนขนุน จังหวัดพัทลุง มีส่วนผสมและกระบวนการที่แตกต่างจากแหล่งอื่น อย่างเช่น ส่วนผสมไม่มีการเติมเกลือและกระเทียม แต่ใช้วิธีการแช่ปลาสดที่ล้างทำความสะอาดแล้วในสารละลายเกลือเข้มข้น (35-40%) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาผสมกับข้าวต้มหมักผสมน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์แทนข้าวสุกหรือข้าวเหนียว แล้วบรรจุลงถังหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน รวมจึงต้องใช้เวลาทั้งหมด 7 วัน จึงสามารถจัดจำหน่ายได้ โดยลักษณะภายนอกของปลาส้มจากชุมชนทะเลน้อย มีลักษณะเนื้อแน่นแข็งไม่เละเหมือนกับปลาส้มจากที่อื่น ซึ่งใช้ปลาน้ำจืดตัวเล็ก เช่น ปลาตะเพียน ปลากระดี่ หรือปลาชนิดอื่น ๆ แล้วเติมส่วนผสมเกลือความเข้มข้นต่ำ กระเทียม ข้าวสุกและข้าวคั่ว (ชวา มาลี, 2551) จากนั้นหมักเป็นเวลา 10 วัน (240 ชั่วโมง) จากการศึกษาเบื้องต้นของผู้ทำวิจัยได้เปรียบเทียบความหลากหลายของแบคทีเรียจากตัวอย่างปลาส้มจากแหล่งผลิตจากแหล่งต่าง ๆ ของประเทศไทย ด้วยวิธี 16S rDNA-PCR และ DGGE พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกพันธุ์ *Lactobacillus plantarum L. lactis* เป็นพันธุ์เด่น (dominant species) จากนั้นจึงสุ่มเลือกตัวอย่างปลาส้มของชุมชนทะเลน้อย และเมื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงแบคทีเรียในกระบวนการผลิตจากตัวอย่างปลาส้มของชุมชนทะเลน้อยพบว่าในช่วงโมงที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง มีการปนเปื้อนเชื้อก่อโรคบางชนิด คือ *Clostridium* sp. และนอกจาก *Lactobacillus* sp แล้วยังมีรายงานเชื้อแลคติดแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับ เช่น *Streptococcus, Lactococcus Weissella* และ *Pediococcus* sp. (Kopermsub and Yunchalard. 2010; Saithong *et al*., 2010) ชนิดของเชื้อแตกต่างกันไปในแต่ละครั้งของการผลิต ขึ้นอยู่กับชนิดและส่วนประกอบของวัตถุดิบและ กระบวนการผลิต (Paludan-Muller *et al*., 2002) ส่งผลต่อให้มีรสชาติและสีสันของปลาส้มแตกต่างกันไปด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบยีสต์ เช่น *Saccharomyces Candida* และ *Pichia* เป็นต้น (Paludan-Muller *et al*., 2002; Saithong *et al*., 2010)

ทั้งนี้พบว่าในปัจจุบันความรู้เกี่ยวกับประชากรจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักปลาส้ม ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ส่วนใหญ่ได้มาจากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture medium) เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar M17 หรืออาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น ๆ ที่จำเพาะแล้วแต่ความต้องการและจุดประสงค์ของผู้ศึกษา ซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดอย่างหนึ่งที่ทำให้ข้อมูลที่ได้ไม่ครอบคลุมถึงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ ที่ไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ การศึกษาประชากรของจุลินทรีย์โดยไม่ต้องเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture-independent) ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ลดข้อจำกัดข้างต้นโดยการอาศัยเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลเพื่อตรวจหาจีโนไทป์ของแบคทีเรียและยีสต์ โดยอาศัยวิธีการเพิ่มปริมาณของยีน *16S rRNA* ด้วยเทคนิค

PCR ทำให้ไม่จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงเชื้อก่อน มีรายงานการศึกษาพบว่าการศึกษาประชากรของจุลินทรีย์ในอาหารหมักโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธีที่ไม่เพาะเลี้ยงเชื้อ พบชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน (Ampe *et al.*, 1999; Erolini *et al.*, 2001) นอกจากนี้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล 16S rDNA-PCR และ DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) นำมาประยุกต์ใช้ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียและยีสต์จากอาหารหมักหลากหลายประเภท เช่น อาหารหมักจากเนื้อ (Italian sausage) (Cocolin *et al.*, 2001) อาหารหมักจากนม (mozzarella cheese) (Erolini *et al.*, 2001) และอาหารหมักจากแป้ง (maize dough) (Ben-Omar and Ampe, 2000) เป็นต้น

การผลิตปลาส้มของชุมชนทะเลน้อยยังคงอาศัยการหมักจากจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ซึ่งบ่อยครั้งประสบปัญหาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ไม่คงที่ โดยขึ้นอยู่กับสภาพอากาศ หากเป็นฤดูฝนที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าค่าเฉลี่ยเป็นเวลานาน ผลิตภัณฑ์อาจเกิดการเน่าเสีย หรือต้องใช้เวลาหมักนานมากกว่าเดิม ทำให้เสียโอกาสในการจัดจำหน่าย ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ที่พบในกระบวนการผลิตปลาส้ม โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติทางเคมีและการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียและยีสต์ตั้งแต่ชั่วโมงแรกของการหมักจนเป็นผลิตภัณฑ์ที่พร้อมจำหน่าย คัดแยกแบคทีเรียและยีสต์สายพันธุ์เด่น (dominant species) ที่ในกระบวนการหมักปลาส้มใช้เป็นกล้าเชื้อหมักร่วมระหว่างแบคทีเรียและยีสต์ อัตราส่วนของกล้าเชื้อที่เหมาะสม และพัฒนาผลิตภัณฑ์จากปลาส้มให้เป็นผลิตภัณฑ์พร้อมรับประทานที่มีความปลอดภัย มีคุณค่าทางโภชนาการ และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

**วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย**

1. ติดตามการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ได้แก่ ความเป็นกรด-เบส ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และการเปลี่ยนแปลงประชากรของแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ที่พบในกระบวนการผลิตปลาส้ม โดย โดยใช้ข้อมูลยีน 16S rRNA และ ยีน 26S rRNA ร่วมกับ Denaturing Gel Gradient Electrophoresis (DGGE) จากปลาส้มที่ผลิตจากแหล่งชุมชนทะเลน้อย จังหวัดพัทลุง
2. คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์สายพันธุ์เด่น (dominant species) และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ที่คัดแยกได้โดยวิธีชีวเคมีและชีวโมเลกุล
3. เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกผสมและกล้าเชื้อยีสต์ผสม สำหรับการพัฒนากระบวนการผลิตปลาส้ม

4. ศึกษาอัตราส่วนระหว่างกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกผสมและยีสต์ผสมต่อการผลิตปลาส้มและตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมี ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และการเปลี่ยนแปลงกล้าเชื้อ จากชั่วโมง 0 24 48 72 96 และ 120 เปรียบเทียบการผลิตด้วยวิธีการหมักตามธรรมชาติ
5. เพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์จากปลาส้มโดยการพัฒนาปลาส้มเป็นผลิตภัณฑ์รูปแบบต่าง ๆ ทดสอบ คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์และความพึงพอใจของผู้บริโภค

**ขอบเขตของโครงการวิจัย**

เก็บตัวอย่างปลาส้มจากแหล่งชุมชนทะเลน้อย จังหวัดพัทลุง เพื่อตรวจหาและคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์พันธุ์เด่นในกระบวนการผลิต พัฒนาเป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตปลาส้มให้มีคุณภาพและปลอดภัยมากขึ้น ตัวอย่างจากแหล่งผลิตทั้ง 2 (รหัสตัวอย่าง WP และ SW) เก็บตัวอย่างในระหว่างการหมักชั่วโมงที่ 0 24 48 72 96 และ 120 ตรวจคุณสมบัติทางเคมี ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-เบส ปริมาณกรด และตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างปลาส้ม คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์สายพันธุ์เด่น ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมกล้าผสมระหว่างเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ เพิ่มมูลค่าให้กับปลาส้มโดยการแปรรูปผลิตภัณฑ์ปลาส้ม ศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์และทดสอบความพึงพอใจของผู้บริโภค

# บทที่ 2
# เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## ผลิตภัณฑ์ปลาส้ม

การหมักเป็นวิธีการแปรรูปอาหาร ซึ่งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีรสชาติและลักษณะทางกายภาพที่แปลกไปจากเดิม และยังเป็นการถนอมอาหารเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา อาหารหมักพื้นเมืองของประเทศไทยมีหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่มีอยู่ในบริเวณนั้น "ปลาส้ม" เป็นอาหารประเภทหมักที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย เป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำจากปลา ปลาที่นิยมนำมาผลิตส่วนใหญ่เป็นปลาน้ำจืดคือ ปลาตะเพียน ปลาขาว ปลาจีน ปลาสร้อย ปลานวลจันทร์ ส่วนปลาทะเลจะไม่ค่อยได้รับความนิยมเนื่องจากมีปัญหาเกี่ยวกับกลิ่นคาว และไม่ประสบความสำเร็จในการหมัก นำปลามาผ่านกระบวนการหมักด้วยเกลือ ข้าวสวยหรือข้าวเหนียวนึ่ง และกระเทียม จนมีรสเปรี้ยว อาจทำมาจากปลาทั้งตัวหรือตัดเฉพาะเนื้อปลาก็ได้ ปลาส้มเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการผลิตทั่วไปทุกภูมิภาคของประเทศ โดยในแต่ละพื้นที่จะมีการเรียกชื่อผลิตภัณฑ์ การใช้วัตถุดิบ รวมถึงมีขั้นตอนการผลิตที่แตกต่างกันออกไป แต่สิ่งที่เหมือนกันคือการใช้ปลาและเกลือเป็นวัตถุดิบหลักในการกระบวนการผลิต ไม่ใช่เฉพาะในประเภทไทยเท่านั้นที่นิยมบริโภคอาหารประเภทปลาหมัก แต่ยังมีอีกหลายๆประเทศที่มีการผลิตอาหารประเภทปลาหมัก เช่น ปลาหมักของประเทศฟิลิปินส์ที่มีชื่อเรียกว่า "Burong-isda" เกาหลีมีผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่เรียกว่า "Jol-kal" และญี่ปุ่นมีผลิตปลาหมักที่เรียกว่า "Funa – shushi" (Paludan-Miller *et al*., 2002)

ในปัจจุบันกระบวนการหมักปลาส้มพื้นเมืองของไทย ยังคงอนุรักษ์กรรมวิธีการผลิตตามรูปแบบดั้งเดิมที่สืบทอดกันมา ทำให้ไม่สามารถควบคุมคุณภาพให้คงที่ได้ รสชาติของปลาส้มขึ้นอยู่กับวัตถุดิบและกระบวนการหมักของแต่ละพื้นที่ การเกิดรสเปรี้ยวของปลาส้มเป็นกลไกการทำงานของจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักตามธรรมชาติ ดังนั้นเมื่อมีการใช้วัตถุดิบและกระบวนการหมักที่แตกต่างกันทำให้จุลินทรีย์ที่พบในระหว่างการหมักปลาส้มแตกต่างกันไปด้วย

## กระบวนการผลิตปลาส้มจังหวัดพัทลุง

ปลาส้มชุมชนทะเลน้อย อ.ควนขนุน จ.พัทลุง มีเอกลักษณ์เฉพาะที่ต่างไป โดยใช้ปลา เช่น ปลายี่สก ปลาจีน หรือปลาตะเพียน มาผ่าท้องเอาไส้ออก หมักเกลือไว้ 2 วัน พัทลุงเป็นจังหวัดที่มีชื่อเสียงเรื่องการนำปลาน้ำจืดมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ปลาส้ม เนื่องจากจังหวัดพัทลุงจะมีกระบวนการหมักที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะถิ่นจึงทำให้ผลิตภัณฑ์ปลาส้มมีรสชาติที่แตกต่างจากปลาส้มที่ผลิตในจังหวัดอื่น ๆ ซึ่งในแต่ละปีมีปริมาณการผลิตปลาส้มบริเวณทะเลน้อย มากกว่า 360 ตันต่อปี คิดเป็นมูลค่า 8,400,000 บาทต่อปี (ประมาณการจากการสัมภาษณ์) พื้นที่จังหวัด

พัทลุงมีแหล่งน้ำธรรมชาติขนาดใหญ่คือทะเลน้อย ซึ่งเป็นทะเลสาบน้ำจืดขนาดใหญ่ที่มีปลาจำนวนมากและมีราคาค่อนข้างถูก โดยชาวบ้านที่อาศัยอยู่บริเวณทะเลน้อย จะนำปลาน้ำจืดที่หาได้จากบริเวณนั้น เช่น ปลาตะเพียน ปลายี่สก มาแปรรูปผลิตภัณฑ์เป็นปลาส้ม เพื่อเพิ่มรายได้ วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมักปลาส้ม

ชนิดของปลา ปลาที่นิยมนำมาผลิตปลาส้ม ส่วนใหญ่เป็นปลาน้ำจืดที่หาได้จากบริเวณทะเลน้อย คือ ปลายี่สก รองลงมาคือ ปลาจีน และปลาตะเพียน ส่วนปลาทะเลจะไม่ค่อยได้รับความนิยมเนื่องจากมีปัญหาเกี่ยวกับกลิ่นคาวและไม่ประสบความสำเร็จในการหมัก ในแต่ละพื้นที่จะมีการใช้ปลาที่แตกต่างกันออกไป ชนิดของปลามีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ซึ่งปลาแต่ละชนิดก็จะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป ทำให้เหมาะกับการทำผลิตภัณฑ์แต่ละประเภท

เกลือเป็นตัวช่วยในเรื่องของเนื้อสัมผัส รสชาติ กลิ่น และยังมีคุณสมบัติในการรักษาเนื้อปลา เป็นตัวควบคุมและรักษาสภาวะในการหมักจึงมีผลต่อชนิดและการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ต้องการจำพวกแบคทีเรียกรดแลคติก ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในเกลือมีบทบาททำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในอาหารหมัก ซึ่งเกลือมีผลทำให้เกิดแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนไปทำให้ค่า water activity ลดลงมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ไม่สามารถทนอยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงได้ (อังคณา และคณะ 2553)

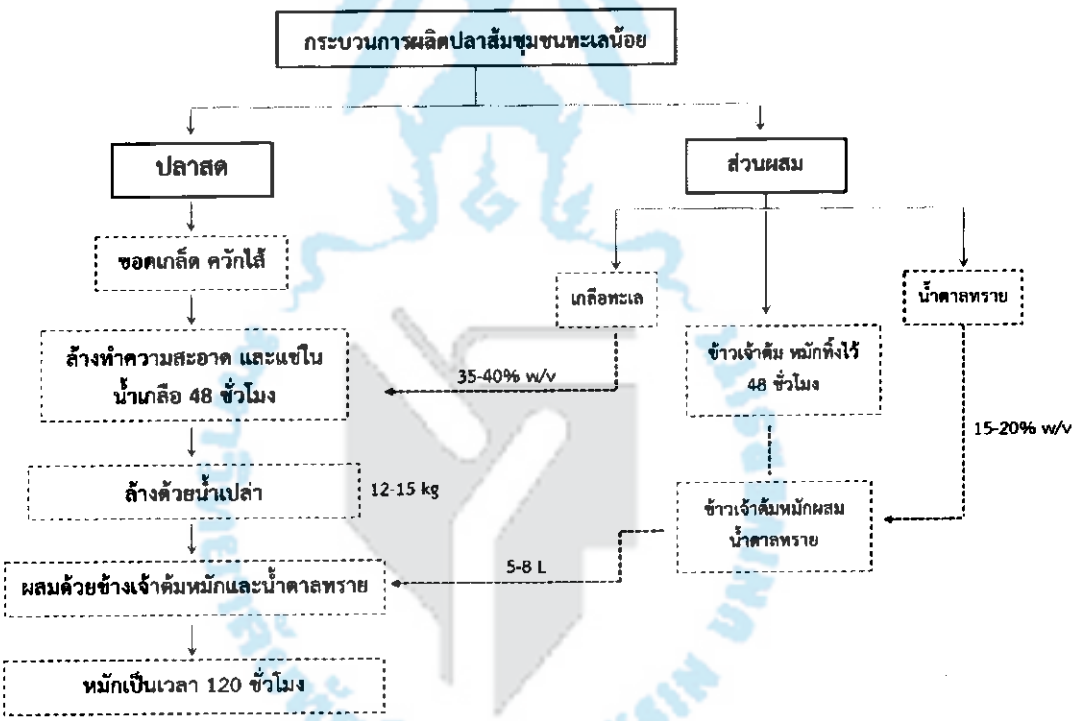
ข้าวต้มสุก ปลาส้มของชุมชนทะเลน้อยนิยมนำข้าวมาต้มให้สุกก่อน แล้วหมักทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง ซึ่งจะมีการเจริญของยีสต์เปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญที่ตัวเร่งให้แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้รวดเร็วในช่วงแรกของกระบวนการหมักจึงทำให้เกิดกลิ่นและรสเปรี้ยวของผลิตภัณฑ์ ในพื้นที่จังหวัดอื่น ๆ จะนิยมใช้ข้าวสวยหรือข้าวเหนียวนึ่งเป็นส่วนผสมในกระบวนการหมักปลาส้ม นอกจากนี้ยังพบว่าข้าวคั่วยังมีบทบาทในการทำงานของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยทำให้มีการสร้างกรดอินทรีย์หรือสารอื่น ๆ ที่กลบกลิ่นเหม็นอันเนื่องมาจากการย่อยสลายของโปรตีน น้ำตาลทรายแดงเป็นอีกหนึ่งส่วนผสมที่ทำหน้าที่ในการเร่งให้แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งยังทำให้รสชาติและสีของผลิตภัณฑ์น่ารับประทานมากยิ่งขึ้น

ส่วนผสมของการผลิตปลาส้มของจังหวัดพัทลุง ประกอบด้วย

**สูตรการผลิตปลาส้มของจังหวัดพัทลุง**

| | | |
|---|---|---|
| ปลาสด | 12 | กิโลกรัม |
| เกลือ | 300 | กรัมต่อน้ำ 1000 ml |
| น้ำตาลผสมข้าวต้มสุก | 150 | กรัมต่อข้าวต้มสุก 1000 ml |

โดยใช้ส่วนประกอบหลักในการผลิตคือปลาน้ำจืดที่หาได้จากบริเวณทะเลน้อยนำปลาทั้งตัวมาล้าง คอด เกร็ดออก เอาไส้และพุงออก จากนั้นจึงนำส่วนผสมต่างๆ มาหมักให้เกิดรสเปรี้ยว แล้วจึงล้างเกลือออก จากนั้นนำไปชุบในน้ำตาลทรายผสมกับกับข้าวต้มหมัก (หมักข้าวทิ้งไว้ 2 วัน) เรียงใส่ปีบแล้วเติมน้ำข้าวหมักผสมน้ำตาลจนท่วมตัวปลา ปิดปากไหให้แน่น ทิ้งไว้ 5-7 วัน (รูปที่ 2) สามารถนำไปปรุงอาหารได้ ปลาส้มมีสารอาหารหลักที่สำคัญคือ โปรตีน 15.7% ไขมัน 3.2% และคาร์โบไฮเดรต 4% (มาโนชญ์, 2548) นอกจากนี้ปลาส้มยังถือว่าเป็นแหล่งของวิตามินและเกลือแร่อื่น ๆ อีกหลายชนิด จึงจัดเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางอาหารสูงและเป็นแหล่งของโปรตีนปลาส้มที่หมักได้ที่มีรสค่อนข้างเปรี้ยวและเค็ม เนื้อสัมผัสแน่นและยืดหยุ่น อาจรับประทานแบบดิบหรือนำไปปรุงให้สุกก่อนรับประทาน (Valyasevi and Rolle, 2002)




**ภาพที่ 1** แผนผังการผลิตปลาส้มของชุมชนทะเลน้อย อ.ควนขนุน จ.พัทลุง

**จุลินทรีย์ที่สำคัญในการหมักปลาส้ม**

การศึกษาจุลินทรีย์ในปลาส้มมีรายงานมากมาย ทั้งการศึกษาแบบอาศัยการเพาะเลี้ยง (culture-dependent) และไม่อาศัยการเพาะเลี้ยง (culture-independent) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก แบคทีเรียกรดแลคติกติกเป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก ส่วนใหญ่ จัดอยู่ใน Family.Lactobacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีทั้งรูปร่างกลมและท่อน จัดเรียงตัวแบบคู่สี่และโซ่ยาว ไม่เคลื่อนที่ (Nonmotile) ไม่สร้างสปอร์ (Non-spore Forming) มีลักษณะเด่นที่สำคัญ คือไม่สังเคราะห์กลุ่มพอร์ไฟริน(Porphyrin) ไม่มีไซโตโครม จึงทำให้แบคทีเรียกรดแลคติก ไม่มีเอนไซม์คะตะเลส สามารถผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมักคาร์โบไฮเดรต สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมชนิดอื่น ๆได้ เจริญเติบโตได้ทั้งในที่มีออกซิเจน (Aerobe) ไม่มีออกซิเจน (Anaerobe) และมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (Microaerophilic) จัดอยู่ในกลุ่มของ Mesophilic Bacteria อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.5-6.2 แต่โดยทั่วไปเชื้อสามารถเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรดด่างน้อยกว่า 5 (Riebroy *et al.*,, 2008) โดยทั่วไปแบคทีเรียกรดแลคติกในแต่ละสายพันธุ์สามารถปรับตัวเพื่อการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ต่างกัน จึงทำให้พบเชื้อกลุ่มนี้ผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ อีกทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกยังเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในคน สัตว์ และพืชบางชนิดอีกด้วย แบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญในการถนอมอาหาร และผลิตอาหารที่ดีต่อสุขภาพอนามัย (Yang *et al.*, 1997) นำมาใช้ในการถนอมอาหารหลายประเภท เพื่อเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ และสารที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคได้หลายชนิดทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยสูงขึ้น (Generally Recognized as Safe; GPRS) สามารถจัดกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกได้ตามกระบวนการและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักเป็น 2 กลุ่ม คือ

**1. Homofermentative** เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้น้ำตาลผ่าน Embden Meyerhof-Parnas Pathway (EMP) โดยอาศัยเอนไซม์ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมที่เรียกว่า Phosphoenol-Pyruvate Dependent Phosphotransferase System (PEP-PST) ทำให้แลคโตสเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่ฟอสเฟต (Phosphorelation) อยู่ในรูปแลคโตส Lactose-6-Phosphate กับ Glucose-6-Phosphate จากนั้นถูกเอนไซม์ Phopho-β-Galactosidase ไฮโดรไลซ์ได้เป็น Galactose -6-Phasphate และ Glucose โดย Glucose จะถูกส่งเข้าสู่กระบวนการต่าง ๆ โดย D-Tagatose-6 - Phosphate0Pathwayได้เป็น Tagatose-1 ,6 - Dophosphate และเปลี่ยนเป็น Dihydroxyacetone-Phosphate0ท้ายสุดเอนไซม์ Tagatose-1,6-Aldolase เปลี่ยนเป็น Glyceraldehyde-3-Phosphate โดยเอนไซม์ Tritose Phosphate0Isomerase ซึ่ง Gleceraldehyde-3-Phosphate เป็นสารตัวกลางในกระบวนการ EMP Pathway แลกเปลี่ยนเป็นแลคโตส (Lactose) ในที่สุดจากการหมักย่อยน้ำตาลดังกล่าวจะได้

กรดแลกติก ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลืออีก 5 เปอร์เซ็นต์ ผลิตกรดแอซีติก (Acetic Acid) และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อีก แบคทีเรียที่พบในกลุ่มนี้ได้แก่ *P. Streptococcus E. faecalis L. lactis* subsp. *lactis L. acidophilus* และ *L. delbrueckii* (สมคิด และอรุณี, 2556)

**2. Heterofermentative** เป็นแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลผ่าน Phosphoketolase Partway โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีเอนไซม์ Aldose ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกระบวนการ Glycolysis จึงทำให้ไม่สามารถย่อยสลาย Fructose-1 ,6 - Diphosphate เป็น Triose-Phosphate จึงต้องออกซิไดซ์ Glucose -6 - Phosphate ได้เป็น 6 - Phosphogluconate จากนั้นเกิดปฏิกิริยา Decaboxylate ได้เป็น Pentose-Phosphate กับคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่ง Pentose Phosphate จะแตกตัวเป็น Triose-Phosphate และ Acetyl-Phosphate โดยเอนไซม์ Phophoketolase โดยที่ Triose-Phosphate จะเปลี่ยนเป็น Lactase ได้เป็น Acetyl-Phosphate จะเปลี่ยน Acetyldehyde ภายหลังจากการการหมักย่อยน้ำตาลดังกล่าวแล้ว จะผลิตกรดแลกติกประมาณ 50% และอีก 50% ผลิตกรดแอซีติก กรดฟอร์มิก (Formic Acid) รวมทั้งเอทานอล (Ethanol) และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แบคทีเรียที่พบในกลุ่มนี้ได้แก่ *L. plantarum L. casei L. fermentum L. bifermentans L. mesenteroides L. brevis* และ *Leuconostoc lactis* (สมคิด และอรุณี, 2556)

**งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตปลาส้มขึ้นอยู่กับส่วนผสมในการผลิต เช่น ความเข้มข้นของเกลือในส่วนผสมการศึกษาของ Paludan-Müller *et al.* (2002) ใช้เกลือความเข้มข้นต่ำ 6-7% และกลุ่มเกลือความเข้มข้นสูง 9-11% ในการผลิตปลาส้ม โดยพบว่าเกลือความเข้มข้นต่ำมีผลต่อการเกิดแบคทีเรียกรดแลคติกได้เร็วกว่า และการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร MRS-$CaCO_3$ พบว่าความเข้มข้นของเกลือต่ำ มีปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกและความหลากหลายมากกว่ากลุ่มเกลือความเข้มข้นสูง โดยแบคทีเรียที่พบได้แก่ *P. pentosaceus L. alimentarius L. farciminis W. confusa* และ *Lactococcus garviae* แต่ทั้งสองกลุ่มพบแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดเดียวกัน คือ *L. plantarum* นอกจากนี้พบเชื้อยีสต์ *Zygosaccharomyces rouxii* ที่สามารถทนเกลือได้ดีอีกด้วย Kopermsub and Yunchalard (2010) คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากการผลิตปลาส้มบนอาหาร $CaCO_3$-MRS agar และจำแนกเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้ด้วยการหาลำดับเบสของยีน *16S rRNA* และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Acc*II และ *Hae*II พบกรดแลคติกเกิดขึ้นในชั่วโมงการหมักที่ 48 เป็นต้นไป สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ของ Yunchalard *et al.* (2005) ซึ่งพบการผลิดกรดสูงใน 3 วันแรกของการหมัก เชื้อที่พบได้แก่ *W. cibaria P. pentosaceus* และ *L. plantarum* โดยเชื้อ *W. cibaria* มีปริมาณมากในชั่วโมงที่ 24 และลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 48 จากนั้นพบ

ปริมาณเชื้อ *P. pentosaceus* สูงขึ้นในชั่วโมงที่ 48 และค่อย ๆ ลดลงอย่างช้าจนถึงชั่วโมงที่ 120 ในขณะที่เชื้อ *L. plantarum* พบชั่วโมงที่ 48 และเริ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงถัดไปจนถึงชั่วโมงที่ 144

การศึกษาประชากรของจุลินทรีย์โดยให้ความสำคัญกับกลุ่มที่ไม่สามารถเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงได้จึงมีความสำคัญและได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เช่น Cocolin *et al.* (2001) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตไส้กรอกอิตาเลี่ยน ด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีนที่แสดงออก *16S rRNA* ร่วมกับเทคนิค DGGE สามารถใช้ติดตามเชื้อที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารได้ พบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก และนอกจากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแล้วยังพบเชื้อในกลุ่ม *Micrococcaceae* อีกด้วย Ampe *et al.* (1999) ใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มปริมาณ 16S rDNA วิเคราะห์ผลด้วย DGGE เพื่อศึกษาจุลินทรีย์ที่เกิดจากกระบวนการหมักแป้งข้าวโพด สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DGGE fingerprinting) ที่เฉพาะของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและพบว่าชนิดของจุลินทรีย์ที่พบจากวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี PCR-DGGE มีความแตกต่างกัน Ben-Omar and Ampe (2000) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของประชากรจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณของยีน 16S rRNA ร่วมกับเทคนิค DGGE ในกระบวนการหมักแป้งข้าวโพดในการประกอบอาหารพื้นเมืองของชาวแมกซิกันพบความหลากหลายของจุลินทรีย์ในแต่ระยะของกระบวนการผลิต Cocolin *et al.* (2000) ใช้เทคนิค PCR เพิ่มปริมาณ 16S rDNA และเทคนิค DGGE ศึกษาและติดตามการเปลี่ยนแปลงของเชื้อยีสต์ในกระบวนการหมักไวน์ และงานวิจัยของ Ercolini *et al.* (2004) ศึกษาและติดตามการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในการผลิตชีส

การผลิตกล้าเชื้อปลาส้มมีการแยกเชื้อและพัฒนากล้าเชื้อหลายรายงาน เช่น Saithong *et al.* (2010) สามารถผลิตกล้าเชื้อบริสุทธิ์ *L. plantarum* IFRPD P15 และ *L. reuteri* IFRPD P17 โดยการคัดแยกเชื้อจากผลผลิตปลาส้มโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS กล้าเชื้อที่ได้เมื่อนำมาผลิตปลาส้มพบว่าสามารถช่วยลดระยะเวลาในการหมักได้ นอกจากนี้กรดแลคติคที่เกิดการการผลิตยังสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้หลายชนิดทั้ง *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ได้เป็นอย่างดี Hwanhlem *et al.*, (2011) คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS-$CaCO_3$ agar จากปลาส้มประกอบด้วย ปลาสด เกลือ ข้าวคั่ว และน้ำตาล ได้เชื้อ *Streptococcus salivarius* และ *Enterococcus faecalis* นำมาใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นการผลิตแบบเซลล์สด พบว่าสามรถให้ความพึงพอใจในรสชาติและเนื้อสัมผัสใกล้เคียงกับการหมักด้วยธรรมชาติ การศึกษาความหลากหลายและการคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างปลาส้มมีรายงานไม่มากนัก ตัวอย่างเช่น Paludan-Müller *et al.* (2002) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีสต์ในตัวอย่างปลาส้มที่ใช้เกลือในความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่ายีสต์สายพันธุ์ *Zygosaccharomyces rouxii* แต่พบเพียงในช่วงต้นของการหมักเท่านั้น เมื่อปริมาณกรดเพิ่มสูงขึ้นทำเกิดการยับยั้งการเจริญของยีสต์ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการพัฒนากล้าเชื้อในปัจจุบันมุ่งเน้น

แบคทีเรียกรดแลคติกเพียงอย่างเดียว มีรายงานน้อยมากสำหรับการคัดแยกยีสต์ พัฒนากล้าเชื้อยีสต์ รวมถึงการใช้เชื้อหมักร่วมระหว่างกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ และศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อทั้งสองในการพัฒนากระบวนการผลิตปลาส้ม

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปลาส้มจากชุมชนทะเลน้อยขนาดใหญ่ 2 แหล่ง ผลิตมากกว่า 10 ตันต่อเดือน ตัวอย่างจากแหล่งผลิตที่หนึ่ง (รหัสตัวอย่าง WP) วัตถุดิบประกอบด้วย ปลายี่สก *(Probarbus jullieni)* ข้าวเจ้าต้มหมัก และน้ำตาลทราย แหล่งผลิตที่สอง (รหัสตัวอย่าง SW) ประกอบด้วย ปลาตะเพียน (*Barbonymus gonionotus*) ข้าวเจ้าต้มหมัก และน้ำตาลทราย นอกจากความแตกต่างของชนิดปลาที่ใช้แล้ว อัตราส่วนของข้าวต้มหมักกับน้ำตาลทราย จากทั้งสองแหล่งมีความแตกต่างกันด้วย กระบวนการหมักหนึ่งถังมีน้ำหนักประมาณ 20 กิโลกรัม การเก็บตัวอย่างแบบสุ่มโดยเก็บทั้งหมด 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 เดือน โดยแบ่งตัวอย่างที่ผสมแล้วบรรจุในถุงขนาดถุงละ 4 กิโลกรัม ทั้งหมด 5 ถุง นำมาหมักต่อในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30$^{o}$C เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง แต่ละถุงใช้สำหรับเก็บตัวอย่าง ทุก ๆ 24 ชั่วโมง (ชั่วโมงที่ 0 24 48 72 และ 120) โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 500 g รวมทั้งเนื้อปลาและน้ำหมัก สำหรับวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและทางจุลชีววิทยาในขั้นตอนต่อไป

## 3.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และปริมาณกรดตามวิธีของ AOAC (2005) กล่าวโดยย่อคือ นำตัวอย่างน้ำหนัก 10 g (เนื้อปลาและน้ำหมัก) เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 90 ml (1:10 w/v) บดตัวอย่างให้ละเอียด 5 นาที จนเป็นเนื้อเดียวกัน วัดค่าความเป็นกรด-เบสด้วยเครื่อง pH meter และทำการหาปริมาณกรดด้วยการไตเตรตด้วย 0.1 M NaOH ใช้ phenolphthalein เป็น indicator ใช้ค่าการไตเตรตที่ได้ไปคำนวณหาค่าปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติค ดังสมการ

**สูตรคำนวณ**

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมด (\%)} = \frac{\text{ml NaOH x meq.Acetic acid x 100}}{\text{ml.Sample(ml.)}}$$

**เมื่อ**

| | | |
|---|---|---|
| ml NaOH | คือ | ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรท (ml) |
| n-NaOH | คือ | ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรท (นอร์มอล) |
| meq. Acetic acid | คือ | มิลลิสมมูลย์ของกรดอะซิติก มีค่าเท่ากับ 0.06 กรัม |
| ml Sample | คือ | ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (ml) |

**3.3 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียและยีสต์**

นำตัวอย่างปลาส้มจากชั่วโมงที่ 0 24 48 72 และ 120 น้ำหนัก 25 g (รวมทั้งเนื้อปลาและน้ำหมัก) ทำการบดย่อยในสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 225 ml ทำ Serial dilution จนได้ระดับความเจือจางที่ $10^{-6}$ หาปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี pour palate สำหรับแบคทีเรีย กลุ่ม aerobic mesophilic เลี้ยงบนอาหาร PCA (Plate Count Agar) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง และกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) อาหาร MRS (Men, Rogosa and Sharpe) agar อุณหภูมิ 30องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ในสภาวะอากาศน้อยในโถเลี้ยงแบบไม่ใช้ออกซิเจนใช้ gas pack (AnaeroGen; Oxoid Ltd, UK) เพื่อกำจัดออกซิเจนและกลุ่มเชื้อยีสต์ด้วยวิธี spread plate บนอาหาร YPD (Yeast extract peptone dextrose agar) ที่ปรับ pH ให้เป็น 3.5 ด้วย tartalic acid โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน

**3.4 ติดตามการเปลี่ยนแปลงแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์**

**3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง gDNA**

สกัด gDNA ของแบคทีเรียและยีสต์จากตัวอย่าง (ชั่วโมงที่ 0 24 48 72 และ 120) โดยแต่ละตัวอย่างแยกเก็บสองส่วน คือ เนื้อปลาและน้ำหมัก ทำการสกัดด้วยชุดทดสอบ TIAN amp Bacterial and Yeast gDNA Kit (Korea) ชั่งตัวอย่างเนื้อปลาส้ม 5 g ใส่ในบีกเกอร์ เติม lysis buffer ปริมาตร 5 ml ทำการบดตัวอย่างโดยผสมกับ lysis buffer จนได้เป็นเนื้อเดียวกันปิเปตตัวอย่าง 1 ml ใส่ใน Microcentrifuge Tube ขนาด 2.0 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส ปิเปตตัวอย่าง 1 ml ใส่ในหลอด Microcentrifuge Tube เติม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติม GA Buffer ปริมาตร 200 ul มิกซ์ตัวอย่างให้เข้ากันเติม Proteinase K ปริมาตร 20 ul ของ มิกซ์ตัวอย่างให้เข้ากัน จากนั้นเติม 220 ul ของ GB Buffer ผสมให้ตัวอย่างเข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นนำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกันสังเกตจากตัวอย่างมีลักษณะหนืดขึ้น เมื่อครบเวลาเติม Ethanol ปริมาตร 220 ul ผสมตัวอย่างให้เข้ากัน นำตัวอย่างปั่นเหวี่ยงที่รอบต่ำเพื่อให้ของเหลวทั้งหมดตกลงก้นหลอด ดูดส่วนใสใส่ในคอลัมน์ CB3 (ขนาด 2 ml) บรรจุอยู่ใน collection tube แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วนำคอลัมน์ใส่กลับใน collection tube เติม แล้วเติม GD Buffer ปริมาตร 500 ul นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส ทำซ้ำแบบเดิมอีกครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง จากนั้นนำคอลัมน์ CB3 ใส่ใน Microcentrifuge Tube ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ เติม TE Buffer ปริมาตร 50 ul บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เก็บตัวอย่างที่ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวัดปริมาณ DNA ที่

สกัดได้ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ DNA โดยการทำ agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย SyBr green

**3.4.2 การเพิ่มปริมาณยีน *16S rRNA* ของแบคทีเรีย โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR)**

วิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียโดยการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *16S rRNA* ในการศึกษาชนิดของแบคทีเรียที่พบในกระบวนการหมักปลาส้มโดยใช้ไพรเมอร์ 27f (AGAGTTTGATCMTGGC TCAG) และ 1525r (AAGGAGGTGWTCCARCC) เตรียมส่วนผสมทั้งหมดปริมาตร เท่ากับ 25 µl ประกอบด้วย PCR Premix Reactions 24 ul (Master mix 10X PCR buffer 50 mM $MgCl_2$ 10 mM dNTP) ปริมาตร 12.5 ul ไพรเมอร์ทั้งสองชนิดที่มีความเข้มข้น 25 mM และ gDNA ต้นแบบ จากนั้นนำตัวอย่างไปดำเนินการต่อโดยใช้ thermal cycler โดยใช้อุณหภูมิ ดังต่อไปนี้ อุณหภูมิ annealing.ที่ 54 องศาเซลเซียส เวลา 40 วินาที จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิตจากการทำ PCR ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ 30 นาที ย้อมด้วย Fluorescent จากนั้นนำไปถ่ายรูปภายด้วยเครื่องถ่ายภาพ (ChemiDoc™ MP System from BIO-RAD) เพิ่มปริมาณรหัสพันธุกรรม ในตำแหน่ง V3 (Variable region) ของยีน *16S rRNA* ซึ่งมีความยาวประมาณ 200 bp ด้วยไพรเมอร์ 357-GC (CCTACGGGAGGCAGCAG) ที่มีเบส C และ G เป็น GC-clamp และไพรเมอร์ 518r (ATTACCGCGGCTGCTGG) โดยใช้ผลิตผลิตจากการเพิ่มปริมาณยีน *16S rRNA* เป็นตัวตั้งต้น เมื่อได้ผลผลิต PCR ของแบคทีเรีย

**3.4.3 การเพิ่มปริมาณยีน *26S rRNA* ของยีสต์**

วิเคราะห์ความหลากหลายของยีสต์โดยการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *26S rRNA* ด้วยไพรเมอร์ NL1 (CATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) และ NL4 (GTCCGTGTTTCAAGACGG) และไพรเมอร์ D1-CG และไพรเมอร์ D2 เพิ่มปริมาณในตำแหน่ง D1/D2 โดยใช้ผลผลิต PCR ของยีน *26S rRNA* เตรียมส่วนผสมทั้งหมดปริมาตร เท่ากับ 25 µl ประกอบด้วย PCR Premix Reactions 24 ul (Master mix 10X PCR buffer 50 mM $MgCl_2$ 10 mM dNTP) ปริมาตร 12.5 ul ไพรเมอร์ทั้งสองชนิดที่มีความเข้มข้น 25 mM และ gDNA ต้นแบบ จากนั้นนำตัวอย่างไปดำเนินการต่อโดยใช้ thermal cycler โดยใช้อุณหภูมิ ดังต่อไปนี้ อุณหภูมิ annealing.ที่ 54 องศาเซลเซียส เวลา 40 วินาที จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิตจากการทำ PCR ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ 30 นาที ย้อมด้วย Fluorescent จากนั้นนำไปถ่ายรูปภายด้วยเครื่องถ่ายภาพ (ChemiDoc™ MP System from BIO-RAD)

**3.4.4 วิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียและยีสต์ด้วยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)**

หลังจากนั้น PCR product ของ V3 วิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณองค์ประกอบ GC ด้วยวิธี DGGE ใช้ 8% Polyacrylamide (Separating gel) ที่มีความเข้มข้นของตัวทำลายพันธะ (Denaturant) 40-60% ซึ่งมีวิธีเตรียมโดยสังเขป ดังนี้ ให้มีความเข้มข้นของ Denaturant ซึ่งประกอบด้วย Urea และ Formamide จากนั้นเติม Ammonium Persulfate ความเข้มข้น 0.01% และ TEMED ความเข้มข้น 0.005% แล้วเตรียมผ่านเครื่อง Gradient mixer ให้ระดับความเข้มข้นของ Denaturant จากน้อยไปมากตามแนวตั้ง (จากบนลงล่าง) มีปริมาตรรวมทั้งสิ้น 26 ml เมื่อ Separating gel แข็งตัว (ประมาณ1ชั่วโมง) เตรียม Stacking gel คือ Polyacrylamide gel เข้มข้น 8% ปริมาตร 5 ml แต่ไม่มีส่วนประกอบของ Denaturant เมื่อโหลดตัวอย่างลงใน Polyacrylamide gel แล้ว ทำการผ่านกระแสไฟฟ้า 70 โวลต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วยแผ่นเจลด้วยสีย้อม Fluorescent (SyBr Gold) ถ่ายภาพและวิเคราะห์ผลด้วยเครื่องถ่ายภาพ (ChemiDoc™ MP System BIO-RAD) เลือกตัดแบนที่สนใจเพื่อเตรียมทำ PCR อีกครั้งด้วยไพรเมอร์เดิม แต่ไม่มีส่วน GC-clamp นำผลผลิต PCR ส่งหาลำดับเบส (Macrogen, Korea)

**3.4.5 การเปรียบเทียบข้อมูลพันธุกรรมตำแหน่ง V3 ของยีน *16S rRNA* และ D1/D2 ของยีน *26S rRNA***

ข้อมูลรหัสพันธุกรรมของตำแหน่ง V3 ของยีน 16S rDNA และ D1/D2-26S rDNA ที่ได้จากการส่งวิเคราะห์จัดการข้อมูลด้วยโปรอกรม Bioedit จากนั้นนำรหัสพันธุกรรมที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) และ Ribosomal database (http://rdp.cme.msu.edu/) เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลแบคทีเรียและยีสต์ที่มีรายงานในฐานข้อมูล

**3.5 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์ และจัดกลุ่มด้วยวิธี RFLP**

แบคทีเรียกรดแลคติกที่เจริญบนอาหาร MRS ที่แสดงลักษณะวงใสสีเหลืองรอบโคโลนี ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงสีม่วงของ bromocresol purple เป็นสีเหลือง นำไป restreak บนอาหารแข็ง MRS อีกครั้ง ทดสอบคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ การย้อมติดสีแกรม และการสร้างเอนไซม์แคตาเลสตามวิธีมาตรฐาน AOAC (2005) จัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์โดยวิธี PCR-RFLP (Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism) สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มปริมาณยีน *rpoB* และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (5'...GAAGAC(N)$_6$...3') แล้วทดสอบคุณสมบัติการผลิตกรดแลคติก จากนั้นเลือกตัวแทน 3 ไอโซเลตของแต่ละกลุ่มที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงที่สุด พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยการเปรียบเทียบลำดับ

นิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* สำหรับยีสต์เพิ่มปริมาณตำแหน่ง Internal transcribed spacer ด้วยไพรเมอร์ ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) และ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ทดสอบความการทดกรดแลคติก และการหมักน้ำตาล แล้วเลือกตัวแทน 3 ไอโซเลตของแต่ละกลุ่มที่มีความสามารถสูง พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยลักษณะรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหารแข็ง โดยสังเกตลักษณะสีผิวหน้าอาหาร และขอบความนูนของโคโลนี ร่วมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *26S rRNA*

**3.6 ทดสอบประสิทธิภาพการสร้างกรดของแบคทีเรียคัดแยก**

แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 44 ไอโซเลต เลี้ยงในอาหาร MSR ปริมาตร 10 ml ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียที่ความเร็ว 5,000 rpm นาน 5 นาที กรองด้วยเมมแบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วส่งส่วนใสตรวจหาปริมาณกรดแลคติกด้วยวิธี HPLC

**3.7 การเจริญของแบคทีเรียคัดแยก**

แบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. ทั้งหมด 7 ไอโซเลตที่ให้ปริมาณกรดแลคติกสูงกว่า 1% (w/v) ได้แก่ WP48/2 WP48/10 WP48/11 WP48/12 WP48/13 WP48/14 และ WP48/16 เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 250 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน candle jar จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชั่วโมง จนครบเวลา 48 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ($OD_{600}$) การเจริญของแต่ละไอโซเลต

**3.8 การเตรียมกล้าเชื้อผสมสำหรับการผลิตปลาส้มโดยวิธีทำแห้ง**

กล้าเชื้อแยกเตรียมเป็น 2 ส่วน คือ กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกผสมและกล้าเชื้อยีสต์ผสม โดยวิธี Freeze-drying ดังนี้ แบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ที่ถูกคัดเลือกจากข้อ 3.5 เลี้ยงในอาหารเหลว MRS และ YPD ตามลำดับให้อยู่ช่วง log phase ของการเจริญปริมาณเชื้อเริ่มต้นในช่วง $10^7$-$10^8$ CFU/ml ปริมาตร 500 ml จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงได้ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็วรอบ 3,000 g เวลา 30 นาที เติม 5% maltodextrin (w/w) เป็นสารป้องกันเซลล์ (protective compound) ส่งทำแห้งด้วยวิธีระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Freeze dry)

**3.9 อัตราส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก**

ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียรดแลคติก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. casei* WP 48/2 *L. amylovorans* WP 48/11 และ *L. plantarum* WP 48/12 ในอัตราส่วน 0.5 1.0 และ 1.5% (w/v) โดยมีชุดการทดลองทั้งหมด 10 สูตร ดังนี้

T1 คือ ไม่เติมกล้าเชื้อ

T2 คือ หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. casei* WP 48/2 อัตราส่วน 0.5% (w/v)

T3 คือ หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. casei* WP 48/2 อัตราส่วน 1.0% (w/v)

T4 คือ หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. casei* WP 48/2 อัตราส่วน 1.5% (w/v)

T5 คือ หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. amylovorans* WP 48/11 อัตราส่วน 0.5% (w/v)

T6 คือ หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. amylovorans* WP 48/11 อัตราส่วน 1.0% (w/v)

T7 คือ หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. amylovorans* WP 48/11 อัตราส่วน 1.5% (w/v)

T8 คือ หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* WP 48/12 อัตราส่วน 0.5% (w/v)

T9 คือ หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* WP 48/12 อัตราส่วน 1.0% (w/v)

T10 คือ หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* WP 48/12 อัตราส่วน 1.5% (w/v)

ที่ผสมกล้าเชื้อกับข้าเจ้าต้มหมัก แล้วหมักที่อุณหภูมิห้อง 30องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง การเก็บตัวอย่างโดยแบ่งตัวอย่างที่ผสมแล้วบรรจุในถุงขนาดถุงละ 4 กิโลกรัม ทั้งหมด 5 ถุง เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง แต่ละถุงใช้สำหรับเก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง (ชั่วโมงที่ 0 24 48 72 และ 120) โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 500 g รวมทั้งเนื้อปลาและน้ำหมัก สำหรับวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-เบส ปริมาณกรด และตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียกรดแลคติก และยีสต์ รวมถึงทดสอบความพึงพอใจของผู้บริโภค

**3.10 อัตราส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกร่วมกับยีสต์ผสม**

ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกผสมและยีสต์ผสม ดังนี้

T1 คือ สูตรควบคุม (เติม 1.0% (w/v) *L. plantarum* WP48/12)

T2 คือ สูตรเติม 1.0% (w/v) *L. plantarum* WP48/12 + 0.5% (w/v) *S. cerevisiae*

T3 คือ สูตรเติม 1.0% (w/v) *L. plantarum* WP48/12 + 1.0% (w/v) *S. cerevisiae*

T4 คือ สูตาเติม 1.0% (w/v) *L. plantarum* WP48/12 + 1.5% (w/v) *S. cerevisiae*

โดยใช้วิธีการเตรียมและขนาดการผลิตเช่นเดียวกับข้อ 3.8 ติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกรดแลคติก และทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภค

**3.11 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาส้มและการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการ**

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาส้มโดยโดยใช้ปลาส้มที่พัฒนากระบวนการผลิตด้วยกล้าเชื้อในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดและมีความพึงพอใจในระดับใกล้เคียงกับการผลิตแบบปกติสำหรับใช้แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ และวิเคราะห์ข้อมูลทางโภชนาการจากฝ่ายโภชนาการและสุขภาพ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยทำการพัฒนาสูตรการแปรรูปปลาส้มเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ดังนี้ ที่มีปลาส้มเป็นวัตถุดิบหลัก ได้แก่

3.11.1. ปลาส้มสมุนไพร เป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพที่ใช้สมุนไพรในท้องถิ่นมาเป็นส่วนผสมและใช้ปลาส้มเป็นวัตถุดิบหลัก

3.11.2. น้ำพริกนรกปลาส้ม พัฒนาสูตรน้ำพริกจากปลาส้มที่มีความเหมาะสมและรสชาติที่ถูกปากคนไทย โดยการใช้ปลาส้มเป็นส่วนผสม

3.11.3. ปลาส้มคั่วกลิ้ง ทำการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารท้องถิ่นที่เป็นที่รู้จักกันดีของ จ.พัทลุง ให้มีความแตกต่างจากรูปแบบเดิม โดยการใช้ปลาส้มเป็นวัตถุดิบ

การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ที่กล่าวมาข้างต้นให้มีความเหมาะสมและตรงตามความต้องการของผู้บริโภคโดยการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคเพื่อนำตำรับที่ได้จัดทำเป็นสูตรต้นแบบและทำการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของตำรับเหล่านั้นพร้อมทั้งศึกษาอายุการเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสม

**3.12 การทดสอบทางประสาทสัมผัส**

การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์ปลาส้มทั้ง 10 สูตร โดยวิธี Hedonic Scaling 9 point จากผู้บริโภคจำนวน 30 คน โดยผู้บริโภคแต่ละคนจะชิมผลิตภัณฑ์ครั้งละ 3 ตัวอย่างแบบสุ่ม ประเมินทางประสาทสัมผัสแบบหาอัตราความชอบ มีระดับคะแนนทั้งหมด 9 คะแนน ได้แก่ 1=ไม่ชอบมากอย่างยิ่ง 2=ไม่ชอบ มาก 3=ไม่ชอบปานกลาง 4=ไม่ชอบ เล็กน้อย 5=เฉยๆ 6=ชอบเล็กน้อย 7=ชอบปานกลาง 8=ชอบมาก และ 9=ชอบมากอย่างยิ่ง ทำการประเมินทางประสาทสัมผัสในด้าน สี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม การยอมรับของผู้บริโภคโดยการปรุงปลาส้มให้สุกโดยการทอดด้วยไฟอ่อน เป็นเวลา 8-10 นาที ผู้บริโภคทดสอบชิมครั้งละ 3 ตัวอย่าง คั้นแต่ละตัวอย่างด้วยน้ำเปล่าก่อนชิมตัวอย่างถัดไป

**3.13 ค่าสถิติที่ใช้วิเคราะห์**

การทดสอบค่าทางสถิตใช้วิธี one-way ANOVA และ Duncan's multiple rang test ที่ระดับความเชื่อมั่น .95 ($p<0.05$) ทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคด้วยวิธี 9 point hedonic scale

# บทที่ 4
# ผลการวิจัย

## 4.1 คุณสมบัติทางเคมีของตัวอย่างปลาส้ม

ตัวอย่างปลาส้มจากแหล่งผลิตในชุมชนทะเลน้อยเก็บทั้งหมด เก็บตัวอย่างครั้งแรกวันที่ 8 กุมภาพันธ์ 2561 (รหัสตัวอย่าง คือ Sample 1) ครั้งที่สอง วันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2561 (รหัสตัวอย่าง คือ Sample 2) และครั้งที่สาม วันที่ 8 มีนาคม พ.ศ. 2561 (รหัสตัวอย่าง คือ Sample 3) โดยปลาส้มมีวัตถุดิบประกอบด้วย ปลายี่สก/หรือปลาจีน ข้าวเจ้าต้ม เกลือ และน้ำตาลทรายแดง หมักที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่าตัวอย่างปลาส้มค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ชั่วโมง 0 24 48 72 96 และ 120 ของการหมักมีการเปลี่ยนแปลง โดยช่วงเริ่มต้นค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.17-6.43 และลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 48-96 และเมื่อสิ้นสุดชั่วโมงที่ 120 ของการหมัก ความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างปลาส้ม เท่ากับ 3.37-3.85 (ตารางที่ 1) สัมพันธ์กับปริมาณกรดทั้งหมดที่ตรวจพบในตัวอย่างมีการสร้างกรดได้มากในชั่วโมงที่ 48-96 โดยปริมาณกรดทั้งหมดของตัวอย่างเริ่มต้นเท่ากับ 0.87-1.10% และเมื่อสิ้นสุดการหมักมีปริมาณกรดสะสม เท่ากับ 1.67-1.90% (ตารางที่ 1) ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณกรดทั้งหมดของตัวอย่างที่เก็บ 3 ครั้งมีความสอดคล้องกัน

**ตารางที่ 1** ค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณกรดของตัวอย่างปลาส้ม

| Fermentation time (hour) | pH | | | Titratable acidity (%) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 |
| 0 | 6.34±0.02$^{a}$ | 6.46±0.02$^{a}$ | 6.17±0.02$^{a}$ | 1.01±0.02$^{a}$ | 0.87±0.03$^{a}$ | 1.10±0.01$^{a}$ |
| 24 | 5.77±0.03$^{b}$ | 6.19±0.04$^{a}$ | 5.64±0.02$^{b}$ | 1.06±0.01$^{a}$ | 0.98±0.04$^{a}$ | 1.29±0.03$^{ab}$ |
| 48 | 5.63±0.02$^{b}$ | 5.42±0.02$^{b}$ | 5.25±0.02$^{b}$ | 1.30±0.01$^{b}$ | 1.12±0.01$^{a}$ | 1.54±0.03$^{b}$ |
| 72 | 4.94±0.03$^{c}$ | 4.34±0.03$^{c}$ | 4.31±0.01$^{c}$ | 1.66±0.02$^{b}$ | 1.46±0.01$^{b}$ | 1.68±0.02$^{bc}$ |
| 96 | 4.41±0.02$^{c}$ | 4.34±0.04$^{c}$ | 3.97±0.05$^{c}$ | 1.80±0.01$^{b}$ | 1.62±0.02$^{b}$ | 1.92±0.04$^{c}$ |
| 120 | 4.37±0.02$^{c}$ | 4.22±0.02$^{c}$ | 3.85±0.05$^{c}$ | 1.77±0.01$^{b}$ | 1.68±0.01$^{b}$ | 1.90±0.03$^{c}$ |

## 4.2 ปริมาณแบคทีเรียและยีสต์ในตัวอย่างปลาส้ม

จากตารางที่ 2 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดตรวจนับด้วยวิธีมาตรฐานการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร PCA มีการเปลี่ยนแปลงในชั่วโมงที่ 0 24 48 72 96 และ 120 โดยพบปริมาณแบคทีเรียในตัวอย่างชั่วโมงที่ 0

(เริ่มต้น) อยู่ในช่วง 7.85–8.88 Log CFU/g และปริมาณแบคทีเรียไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมักพบปริมาณเท่ากับ 8.11–8.34 Log CFU/g ซึ่งทั้งสามตัวอย่างที่เก็บมาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการหมัก โดยมีแบคทีเรียกรดแลคติกเริ่มต้นที่ 3.04–4.58 Log CFU/g และมีปริมาณสูงสุดชั่วโมงที่120 ของการหมักเท่ากับ 5.76–6.58 Log CFU/g (ตารางที่ 2) ในส่วนของปริมาณยีสต์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมักเริ่มต้นเท่ากับ 2.08–2.72 Log CFU/g และเท่ากับ 2.26–3.58 Log CFU/g เมื่อสิ้นสุดชั่วโมงที่ 120 ของการหมัก (ตารางที่ 3)

**ตารางที่ 2** ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียกรดแลคติกของตัวอย่างปลาส้ม

| Fermentation | Total bacteria (Log CFU/g) | | | LAB (Log CFU/g) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| time (hour) | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 |
| 0 | 8.88±0.20$^{a}$ | 8.71±0.11$^{a}$ | 7.85±0.08$^{a}$ | 4.38±0.03$^{b}$ | 3.04±0.08$^{c}$ | 4.58±0.08$^{c}$ |
| 24 | 8.82±0.14$^{a}$ | 8.76±0.06$^{a}$ | 7.65±0.12$^{a}$ | 4.82±0.14$^{b}$ | 3.38±0.11$^{c}$ | 4.67±0.07$^{c}$ |
| 48 | 8.23±0.07$^{a}$ | 8.66±0.08$^{a}$ | 7.51±0.12$^{a}$ | 5.57±0.08$^{a}$ | 3.76±0.06$^{c}$ | 5.83±0.10$^{b}$ |
| 72 | 7.88±0.13$^{a}$ | 8.16±0.11$^{a}$ | 7.35±0.09$^{a}$ | 5.71±0.10$^{a}$ | 4.48±0.09$^{b}$ | 6.32±0.08$^{ab}$ |
| 96 | 8.10±0.07$^{a}$ | 8.21±0.04$^{a}$ | 8.15±0.13$^{a}$ | 6.08±0.05$^{a}$ | 5.34±0.03$^{a}$ | 6.49±0.06$^{a}$ |
| 120 | 8.11±0.09$^{a}$ | 8.34±0.08$^{a}$ | 8.24±0.11$^{a}$ | 6.26±0.07$^{a}$ | 5.76±0.10$^{a}$ | 6.58±0.12$^{a}$ |

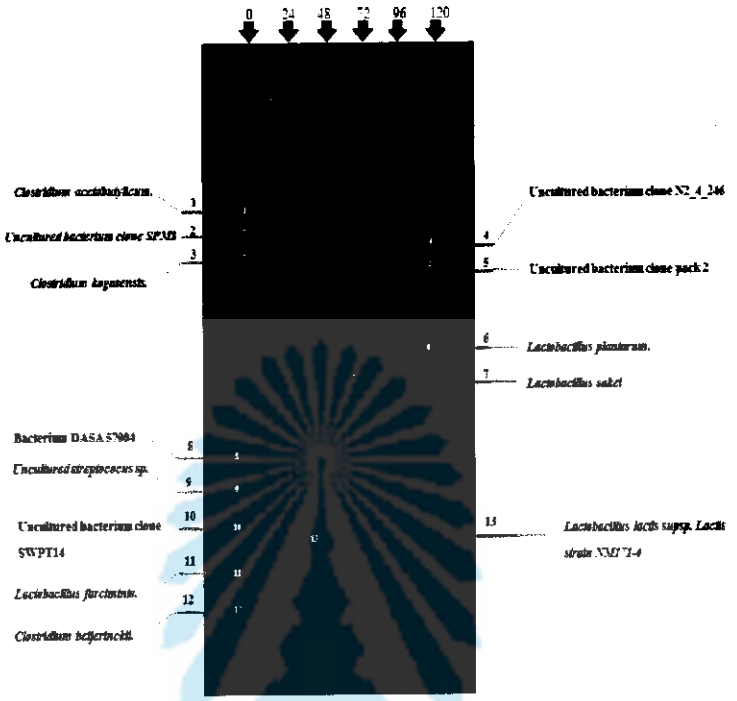
**ตารางที่ 3** ปริมาณยีสต์ของตัวอย่างปลาส้มในชั่งโมงที่ 0 24 48 72 96 และ 120 ของการหมัก

| Fermentation time | Yeast (Log CFU/g) | | |
|---|---|---|---|
| (hour) | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 |
| 0 | 2.62±0.24$^{b}$ | 2.08±0.19$^{a}$ | 2.72±0.11$^{a}$ |
| 24 | 3.66±0.13$^{a}$ | 2.53±0.14$^{a}$ | 3.43±0.13$^{a}$ |
| 48 | 3.76±0.11$^{a}$ | 2.76±0.09$^{a}$ | 3.56±0.11$^{a}$ |
| 72 | 3.71±0.09$^{a}$ | 2.62±0.21$^{a}$ | 3.59±0.12$^{a}$ |
| 96 | 2.91±0.21a$^{b}$ | 2.34±0.12$^{a}$ | 3.62±0.09$^{a}$ |
| 120 | 2.89±0.10a$^{b}$ | 2.26±0.08$^{a}$ | 3.58±0.09$^{a}$ |

**4.3 การติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรของแบคทีเรียและยีสต์จากตัวอย่างปลาส้มด้วยเทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)**

ตัวอย่างปลาส้มจากการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 โดยแบ่งเก็บตัวอย่างเป็นช่วงเวลา ตั้งแต่ชั่วโมงการหมักที่ 0 24 48 72 96 และ 120 (รหัสตัวอย่าง PS-0 P-24 P-48 P-72 P-96 และ PS-120 ตามลำดับ) ทั้งหมด 6 ตัวอย่าง จากนั้นสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (gDNA) ของแบคทีเรียด้วยชุดสกัด TIANgen Bacteria DNA kit ได้ความเข้มข้นของ gDNA อยู่ในช่วง 50-200 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปรับความเข้มข้นโดยเจือจาง gDNA ของแต่ละตัวอย่างให้เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร สำหรับเป็น DNA ต้นแบบ (DNA template) เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *16S rRNA* ด้วยไพรเมอร์ 27f และ 1525r พบผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ผลผลิต PCR ที่ได้นำมาทำบริสุทธิ์ด้วยชุดทำบริสุทธิ์ PureLink PCR product purification และใช้เป็นดีDNA ต้นแบบของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมตำแหน่ง V3 ของยีน *16S rRNA* ด้วยไพรเมอร์ 357f-GC และ 518r ได้ผลผลิต PCR ขนาด 250 คู่เบส แยกความแตกต่างของผลผลิต PCR ของ V3 บน 8% polyacrylamide ด้วยความแตกต่างของตัวทำลายพันธะไฮโดรเจนความเข้มข้นตั้งแต่ 40-50% และส่งหลังจากวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยวิธี Blast พบความแตกต่างของแบคทีเรีย 13 ไรโบไทป์ (13 แบนด์) เป็นแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum C. kogasensis C. beijerinckii* แบคทีเรียกรดแลคติก *Lactococus plantarum L. sakei L. lactis* และ *L. farciminis* นอกจากนั้นเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Unculture bacteria (ภาพที่ 2 และ ตารางที่ 4) จากตัวอย่างปลาส้มที่เก็บทั้ง 3 ครั้งมีแบคทีเรียกรดแลคติกที่สำคัญกับกระบวนการหมัก คือ กลุ่ม *Lactobacillus* spp.

ยีน *26S rRNA* ของยีสต์เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ NL1-GC และ NL4 ได้ผลผลิต PCR ขนาด 330 คู่เบส หลังจากวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี DGGE พบทั้งหมด 6 ไรโบไทป์ เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank พบว่าเป็นยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae Candida tropicalis Pichia kudriavzevii* และ *Kodamaea ohmeri* และ *S. cerevisiae* เป็นสายพันธุ์เด่นที่มีความถี่ในการพบมากที่สุด



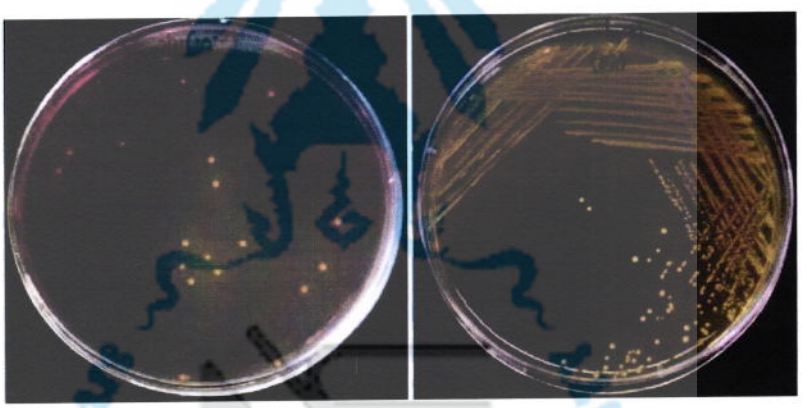

**ภาพที่ 2** ประชากรแบคทีเรียในตัวอย่างปลาส้มจากชั่วโมงการหมักที่ 0 ถึง 120

**ตารางที่ 4** ชนิดของแบคทีเรียที่พบในในตัวอย่างปลาส้มด้วยเทคนิค 16S rDNA-PCR และ DGGE

| Organisms | % identity | Accession No. | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 |
|---|---|---|---|---|---|
| *Clostridium acetobutylicum* | 100% | GU046544 | ✓ | ✓ | - |
| *Uncultured bacterium clone SPM8* | 96% | FJ657846 | ✓ | - | - |
| *Clostridium kogasensis* | 100% | AB696983 | ✓ | ✓ | ✓ |
| Uncultured bacterium clone N2_4_246 | 96% | FJ392123 | ✓ | ✓ | ✓ |
| Uncultured bacterium clone pack 2 | 96% | GQ136645 | ✓ | - | - |
| *Lactobacillus plantarum* | 94% | JN587506 | ✓ | ✓ | ✓ |
| *Lactobacillus sakei* | 99% | KM207825 | ✓ | - | ✓ |
| *Bacterium DASA 57004* | 97% | FJ657776 | ✓ | ✓ | ✓ |
| *Uncultured Streptococcus* sp. | 94% | GQ136645 | ✓ | - | ✓ |
| *Uncultured bacterium clone SWPT14* | 98% | AB696983 | ✓ | - | - |
| *Lactobacillus farciminis* | 99% | KR011008 | ✓ | - | - |
| *Clostridium beijerinckii.* | 99% | GU046544 | ✓ | ✓ | ✓ |
| *Lactobacillus lactis* | 96% | AB969778 | ✓ | ✓ | ✓ |

**4.4 การคัดแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp. จากตัวอย่างปลาส้ม**

แบคทีเรียกรดแลคติกที่เป็นสายพันธุ์เด่น พบได้ตั้งแต่ชั่วโมงแรก ๆ จนถึงสิ้นสุดการหมักปลาส้ม คือ *Lactobacillus* spp. จึงทำการคัดแยกบนอาหารแข็ง de Man Rogosa and Sharpe agar (MRS) ที่เติม Bromocresol purple 0.04 กรัมต่อลิตร (0.004% w/v) เป็นอินดิเคเตอร์ บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบแบคทีเรียบนอาหาร MRS ทั้งหมด 473 โคโลนี และสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลือง (ภาพที่ 3) ได้ทั้งหมด 168 โคโลนี คิดเป็น 40.80% เป็นแบคทีเรียรูปท่อนแกรมบวกไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส (ภาพที่ 4) จำนวน 44 ไอโซเลต แบคทีเรียรูปร่างกลมแกรมบวกไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส จำนวน 31 ไอโซเลต และแบคทีเรียรูปร่างท่อนสั้นติดสีแกรมลบจำนวน 53 ไอโซเลต และแบคทีเรียรูปร่างกลมติดสีแกรมลบจำนวน 40 ไอโซเลต



**ภาพที่ 3** การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกอาหาร MRS ที่เติม 0.004% bromocresol purple

A B

**ภาพที่ 4** แบคทีเรียรูปร่างท่อนติดสีย้อมแกรมบวก (A) และการทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลส (B)

**4.5 คัดแยกยีสต์จากตัวอย่างปลาส้ม**

การคัดแยกยีสต์ใช้อาหารแข็ง Yeast and Malt extracts agar (YM) พบยีสต์ทั้งหมด 63 โคโลนี มีลักษณะขอบโคโลนีหยัก ยกนูน และรูปร่างของเซลล์แตกต่างกัน 5 ลักษณะ (ตารางที่ 5) ได้แก่ (1) โคโลนีสีขาวครีม สร้างเส้นใยเทียม รูปร่างเซลล์ยาวรี (2) โคโลนีสีขาว รูปร่างเซลล์ยาวรี (3) โคโลนีขาวครีม สร้างเส้นใยเทียม รูปร่างเซลล์กลม (4) โคโลนีขาวครีม สร้างเส้นใยเทียม รูปร่างเซลล์รูปไข่ และ (5) โคโลนีขาวครีม รูปร่างเซลล์ยาวรี จากนั้นเลือกตัวแทนของยีสต์ทั้ง 5 กลุ่ม ๆ ละ 2 ไอโซเลตทดสอบความสามารถการทนกรดแลคติกโดยเลี้ยงในอาหารเหลว YM เติมกรดแลคติกความเข้มข้น 0.5 1 2 และ 3% (v/v) วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 540 nm ($OD_{540}$) หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่ายีสต์ทั้ง 10 ไอโซเลต สามารถทนกรดแลคติกที่ความเข้มข้น 2% นาน 48 ชั่วโมง และมี 3 ไอโซเลตที่สามารถทนกรดแลคติกความเข้มข้น 3% นาน 48 ชั่วโมงได้ คือ ไอโซเลต PK2 PK3 และ PS1 (ตารางที่ 6) จากนั้นเลือกยีสต์ 3 ไอโซเลตจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ข้อมูลยีน *26S rRNA* พบว่าไอโซเลต PS1 เป็นยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* (HM107789) PK1 และ PK2 เป็นยีสต์สายพันธุ์ *Pichia kudriavzevii* (KM234446)

**ตารางที่ 5** ลักษณะโคโลนีและรูปร่างเซลล์ของยีสต์คัดแยกได้จากปลาส้ม

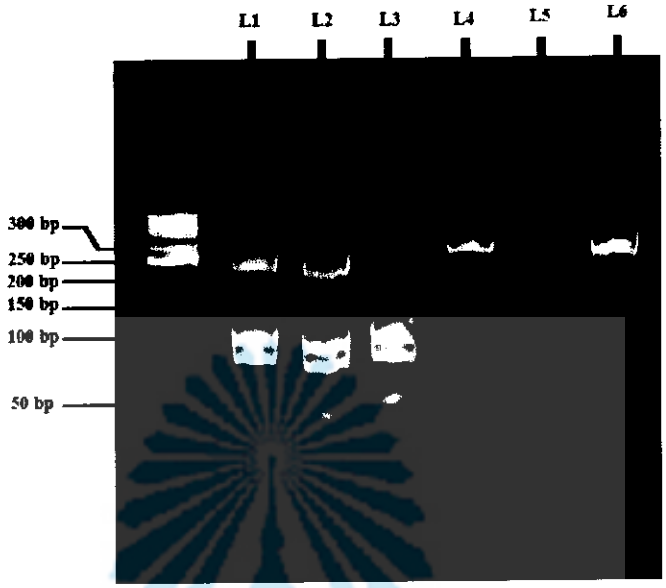
| กลุ่มที่ | ลักษณะโคโลนี | สีของโคโลนี | รูปร่างของเซลล์ | จำนวนไอโซเลต |
|---|---|---|---|---|
| 1 | ขอบหยัก ยกนูน | สีขาวครีม สร้างเส้นใยเทียม | ยาวรี | 8 |
| 2 | ขอบหยัก ยกนูน | สีขาวครีม สร้างเส้นใยเทียม | รูปไข่ | 6 |
| 3 | ขอบเรียบ ยกนูน | สีขาว | ยาวรี | 13 |
| 4 | ขอบหยัก ยกนูน | สีขาว | กลม | 27 |
| 5 | ขอบหยัก ยกนูน | สีขาวครีม | รูปไข่ | 9 |

**ตารางที่ 6** การดูดกลืนแสง ($OD_{540}$) ของเซลล์ยีสต์ในอาหารเหลว YM ที่เติมกรดแลคติก

| Isolates | 24 hours | | | | 48 hours | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Lactic acid (% v/v) | | | | Lactic acid (% v/v) | | | |
| | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 3.0 |
| PK1 | 1.72 | 0.80 | 0.36 | -0.01 | 1.83 | 1.21 | 1.17 | -0.01 |
| PK2 | 1.37 | 1.38 | 1.35 | 0.82 | 1.79 | 1.51 | 1.71 | 1.32 |
| PK3 | 1.40 | 1.40 | 1.30 | 0.73 | 1.97 | 1.66 | 1.37 | 1.54 |
| PK4 | 1.19 | 0.75 | 0.36 | 0.13 | 2.02 | 1.22 | 0.60 | 0.02 |
| PK5 | 1.60 | 0.62 | 0.20 | -0.03 | 1.82 | 1.08 | 0.80 | -0.02 |
| PK6 | 1.55 | 0.74 | 0.40 | -0.03 | 1.80 | 1.24 | 0.80 | -0.03 |
| PK7 | 0.66 | 0.15 | 0.06 | 0.01 | 1.66 | 0.14 | 0.04 | -0.02 |
| PR3 | 1.48 | 1.04 | 0.30 | -0.01 | 1.78 | 1.47 | 0.20 | -0.04 |
| PR5 | 0.44 | 0.15 | 0.16 | 0.03 | 0.81 | 0.18 | 0.15 | 0.11 |
| PS1 | 1.73 | 1.69 | 1.61 | 1.04 | 1.86 | 1.89 | 1.76 | 1.26 |

**4.6 การจัดกลุ่มแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. ที่คัดแยกได้ด้วยวิธี RFLP**

การสร้างเครื่องหมายทางโมเลกุลสำหรับจำแนกสายพันธุ์เชื้อ *Lactobacillus* spp. โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP เพิ่มปริมาณยีน *rpoB* และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bpsl* ที่มีลำดับจดจำ (5'...GAAGAC$(N)_6$...3' ,3'...CTTCTG $(N)_6$... 5') ทดสอบประสิทธิภาพการจัดกลุ่มด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง *Lactobacillus* spp. ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. plantarum* (TISTR 926) *L. lactis* (TISTR 420) *L. bulgaricus* (TISTR 1339) *L. delbrueckii* (TISTR 326) *L. amylovorans* (TISTR 1110) และ *L. casei* (TISTR 1340) ได้จากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (วว.) สามารถสร้างความแตกต่างของสายพันธุ์ทั้ง 6 สายพันธุ์ (ภาพที่ 5 และตารางที่ 7) ได้ 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *L. plantarum* และ *L. lactis* กลุ่มที่ 2 *L. bulgaricus* กลุ่มที่ 3 *L. delbrueckii* กลุ่มที่ 4 *L. amylovorans* และกลุ่มที่5 *L. casei* และพบว่าตัวอย่างไอโซเลตทั้ง 44 ไอโซเลต มีความแตกต่างเพียง 3 กลุ่ม ได้แก่ คล้ายกับกลุ่มที่ 1 *L. plantarum* (TISTR 926) หรือ *L. lactis* (TISTR 420) ทั้งหมด 30 ไอโซเลต (68.18%) กลุ่มที่ 4 *L. amylovorans* (TISTR 1110) ทั้งหมด 8 ไอโซเลต (18.18%) และกลุ่มที่ 5 *L. casei* (TISTR 1340) ทั้งหมด 6 ไอโซเลต (13.64%) (ตารางที่ 7)



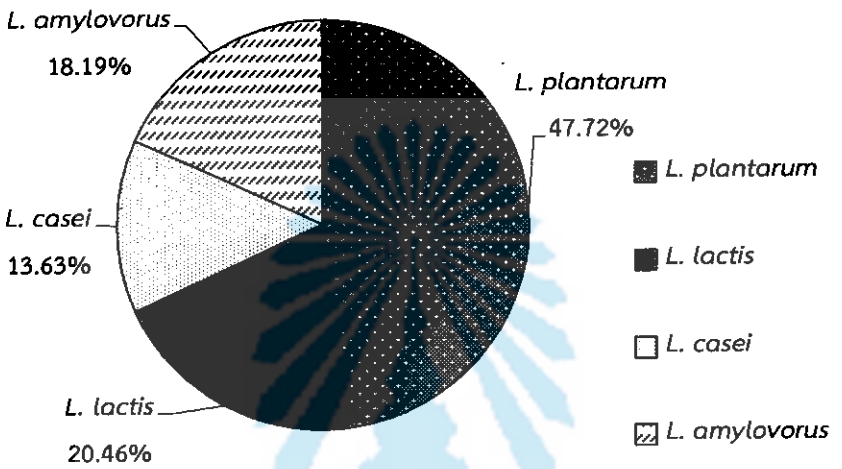

**ภาพที่ 5** รูปแบบของการตัดยีน *rpoB*-RFLP ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bpsl* L1: *L. plantarum* ( TISTR 926); L2: *L. lactis* (TISTR 420); L3: *L. bulgaricus* (TISTR 1339); L4: *L. delbrueckii* (TISTR 326); L5: *L. amylovorans* (TISTR 1110); L6: *L. casei* (TISTR 1340)

**ตารางที่ 7** ขนาดของยีน *rpoB* จากแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. ด้วยเทคนิค RFLP ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Bpsl*

| กลุ่มที่ | สายพันธุ์อ้างอิง | ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bpsl* (คู่เบส) | จำนวนไอโซเลต | % |
|---|---|---|---|---|
| 1 | *L. plantarum* ( TISTR 926) | 30, 50, 80, 120, 250, 300 | 30 | 68.18 |
| | *L. lactis* (TISTR 420) | 30, 50, 80, 120, 250, 300 | | |
| 2 | *L. bulgaricus.* (TISTR 1339) | 30, 50, 80, 120 | 0 | 0 |
| 3 | *L. delbrueckii* (TISTR 326) | 80, 120, 350 | 0 | 0 |
| 4 | *L. amylovorans* (TISTR 1110) | 300 | 8 | 18.18 |
| 5 | *L. casei* (TISTR 1340) | 50, 100, 150, 300 | 6 | 13.64 |

30.ไอโซเลต มีรูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอคล้ายคลึงกับเชื้อ *L. plantarum* และ *L. lactis* พบว่ามี 21 ไอโซเลต เป็นเชื้อ *L. plantarum* ( 47.72%) และ 9 ไอโซเลต เป็นเชื้อ *L. lactis* (20.46%) ส่วนอีก 2

รูปแบบให้ผลตรงกับวิธี PCR-RFLP คือ 8 ไอโซเลต จากกลุ่ม *L. amylovorans* และ 6 ไอโซเลต จากกลุ่ม *L. casei* ให้ผลตรงกันทั้งหมด ดังภาพที่ 6




**ภาพที่ 6** ค่าร้อยละของแบคทีเรีย *Lactobacillus spp.* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่าง

**4.7 ทดสอบการสร้างกรดแลคติกของ *Lactobacillus* spp. ที่คัดแยกได้**

ทดสอบการสร้างกรดแลคติกของเชื้อที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว MRS มีน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นตรวจปริมาณกรดแลคติกด้วยเทคนิค HPLC พบว่าจากทั้งหมด 44 ไอโซเลต มีเพียง 7 ไอโซเลตที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้มากกว่ากว่า 1% (w/v) ได้แก่ ไอโซเลต WP48/2 WP48/10 WP48/11 WP48/12 WP48/13 WP48/14 และ WP48/16 มีปริมาณกรดแลคติกเท่ากับ 1.27 1.26 1.04 1.36 1.01 1.03 และ 1.32% (w/v) ตามลำดับ (ตารางที่ 8) จากการจำแนกสายพันธุ์ด้วยข้อมูลของยีน *16S rRNA* พบว่า 4 ไอโซเลต คือ WP48/10 WP48/12 WP48/14 และ WP 48/16 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. plantarum* 1 ไอโซเลต คือ WP 48/2 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. casei* และ 2 ไอโซเลต คือ WP48/11 และ WP48/13 เป็นแบคทีเรีย *L. amylovorans*

**ตารางที่ 8** ปริมาณกรดแลคติกและปริมาณกรดแอซิติกของแต่ละไอโซเลตด้วยวิธี HPLC

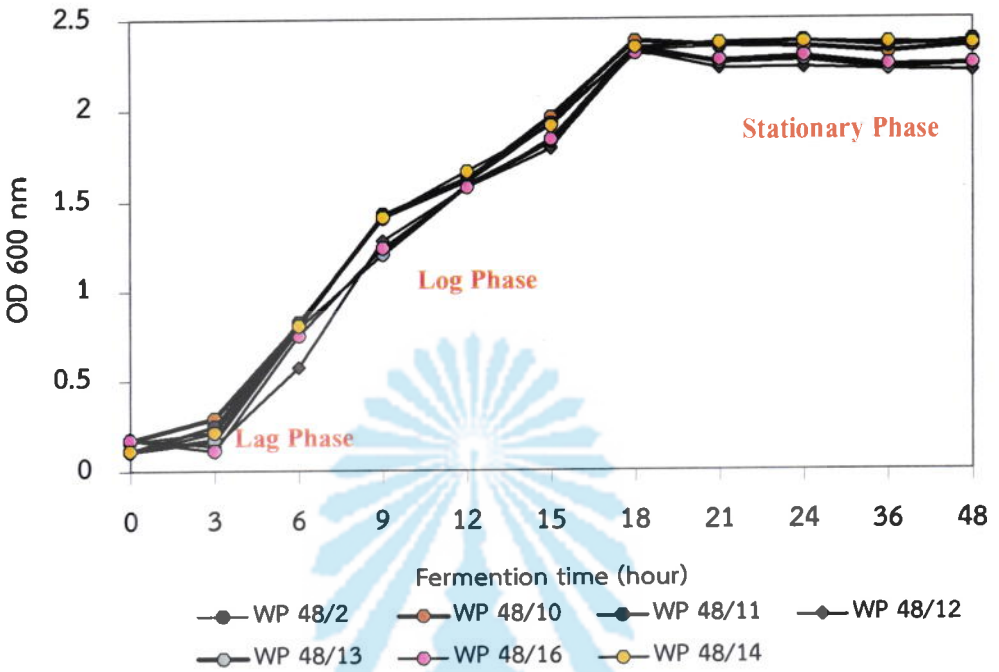
| ไอโซเลตที่ | รหัสเชื้อ | % (w/v) | |
|---|---|---|---|
| | | Acetic acid | Lactic acid |
| 1 | WP 48/2 | 0.72 | 1.27 |
| 2 | WP 48/3 | 0.41 | 0.67 |
| 3 | WP 48/4 | 0.34 | 0.54 |
| 4 | WP 48/5 | 0.41 | 0.51 |
| 5 | WP 48/6 | 0.42 | 0.43 |
| 6 | WP 48/8 | 0.43 | 0.58 |
| 7 | WP 48/9 | 0.40 | 0.61 |
| 8 | WP 48/10 | 0.63 | 1.26 |
| 9 | WP 48/11 | 0.47 | 1.04 |
| 10 | WP 48/12 | 0.70 | 1.36 |
| 11 | WP 48/13 | 0.55 | 1.01 |
| 12 | WP 48/14 | 0.54 | 1.03 |
| 13 | WP 48/16 | 0.73 | 1.32 |
| 14 | WP 48/19 | 0.49 | 0.95 |
| 15 | WP 48/20 | 0.35 | 0.55 |
| 16 | WP 48/21 | 0.40 | 0.41 |
| 17 | WP 48/22 | 0.51 | 0.84 |
| 18 | WP 48/23 | 0.47 | 0.78 |
| 19 | WP 48/24 | 0.49 | 0.74 |
| 20 | WP 48/25 | 0.50 | 0.81 |
| 21 | WP 48/28 | 0.43 | 0.76 |
| 22 | WP 48/30 | 0.42 | 0.63 |
| 23 | WP 48/31 | 0.51 | 0.77 |
| 24 | WP 48/32 | 0.55 | 0.94 |
| 25 | WP 72/1 | 0.43 | 0.56 |
| 26 | WP 72/2 | 0.63 | 0.70 |
| 27 | WP 72/4 | 0.40 | 0.64 |
| 28 | WP 72/5 | 0.42 | 0.70 |
| 29 | WP 72/7 | 0.42 | 0.43 |

**ตารางที่ 8** (ต่อ)

| ไอโซเลตที่ | รหัสเชื้อ | % (w/v) | |
|---|---|---|---|
| | | Acetic acid | Lactic acid |
| 30 | WP 72/8 | 0.41 | 0.67 |
| 31 | WP 72/9 | 0.40 | 0.61 |
| 39 | WP 72/27 | 0.59 | 0.77 |
| 40 | WP 96/2 | 0.5 | 0.81 |
| 41 | WP 96/5 | 0.49 | 0.74 |
| 42 | WP 120/45 | 0.38 | 0.51 |
| 43 | WP 120/58 | 0.43 | 0.56 |
| 44 | WP 120/60 | 0.31 | 0.11 |

**4.8 การเจริญของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่คัดแยกได้**

เลือกแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. ทั้ง 7 ไอโซเลตที่ให้ปริมาณกรดแลคติกสูงกว่า 1% (w/v) ได้แก่ WP48/2 WP48/10 WP48/11 WP48/12 WP48/13 WP48/14 และ WP48/16 เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 250 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน candle jar จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชั่วโมง จนครบเวลา 48 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ($OD_{600}$) การเจริญของแต่ละไอโซเลต (ภาพที่ 7) การเจริญของแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลตมีลักษณะคล้ายคลึงกัน มีระยะ Lag phase อยู่ในชั่วโมงที่ 0-3 ระยะ Log phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3-18 และระยะ stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 18 เป็นต้นไป ดังนั้นจึงคัดเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ดังนี้ ไอโซเลต WP48/2 เป็นตัวแทนของ *Lb.1casei* ไอโซเลต WP48/11 เป็นตัวแทนของ *L. amylovorans* และ ไอโซเลต WP48/12 เป็นตัวแทนของ *L. plantarum*




**ภาพที่ 7** การเจริญของ *Lactobacillus* spp. ที่คัดแยกได้จากปลาส้ม วัดการเจริญด้วยการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ($OD_{600}$)

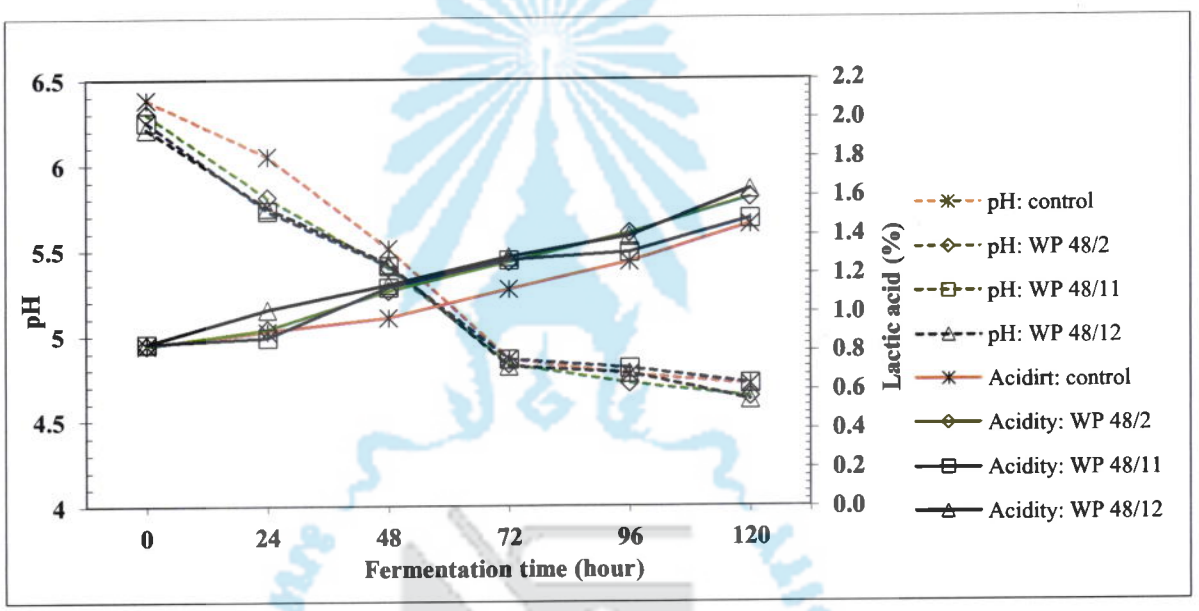
**4.9 อัตราส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อ *Lb.33casei* WP48/2 *L. amylovorans* WP48/11 และ *L. plantarum* WP48/12**

ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lb.1casei* WP48/2 *L. amylovorans* WP48/11 และ *L. plantarum* WP48/12 เตรียมกล้าเชื้ออัตราส่วน 0.5 1.0 และ 1.5% (w/v) หมักปลาส้ม เปรียบเทียบกับการหมักตามธรรมชาติ ติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดแลคติกและค่าความเป็นกรด-ด่าง ในชั่วโมงการหมักที่ 24 48 72 96 และ 120 จากภาพที่ 8 การหมักตามธรรมชาติมีกรดแลคติกเริ่มต้นเท่ากับ 0.83 และเพิ่มขึ้นเป็น 0.90 0.97 1.12 1.26 และ 1.45% (w/v) และสอดคล้องกับความเป็นกรด–ด่าง ที่ลดลงจาก 6.38 เป็น 6.05 5.51 4.86 4.77 และ 4.71 ตามลำดับ

กล้าเชื้อ *L. casei* WP 48/2 ที่อัตราส่วน 0.5% (w/v) พบปริมาณกรดแลคติกเท่ากับ 0.83 0.91 1.11 1.26 1.40 และ 1.59% (w/v) และค่าความเป็นกรด–ด่าง ลดลงจาก 6.30 5.81 5.4 4.83 4.72 และ 4.64 ตามลำดับ

กล้าเชื้อ *L. amylovorans* WP48/11 ที่อัตราส่วน 0.5% (w/v) ปริมาณกรดแลคติกเท่ากับ 0.84 0.87 1.13 1.27 1.31 และ 1.48% (w/v) และค่าความเป็นกรด–ด่างลดลงจาก 6.25 5.73 5.41 4.86 4.81 และ 4.72 ตามลำดับ

กล้าเชื้อ *L. plantarum* WP48/12 ที่อัตราส่วน 0.5% (w/v) มีปริมาณกรดแลคติกเท่ากับ 0.84 1.01 1.14 1.29 1.3และ 1.63% (w/v) และค่าความเป็นกรด–ด่าง ลดลงจาก 6.21 5.75 4.42 4.82 4.78 และ 4.62 ตามลำดับ

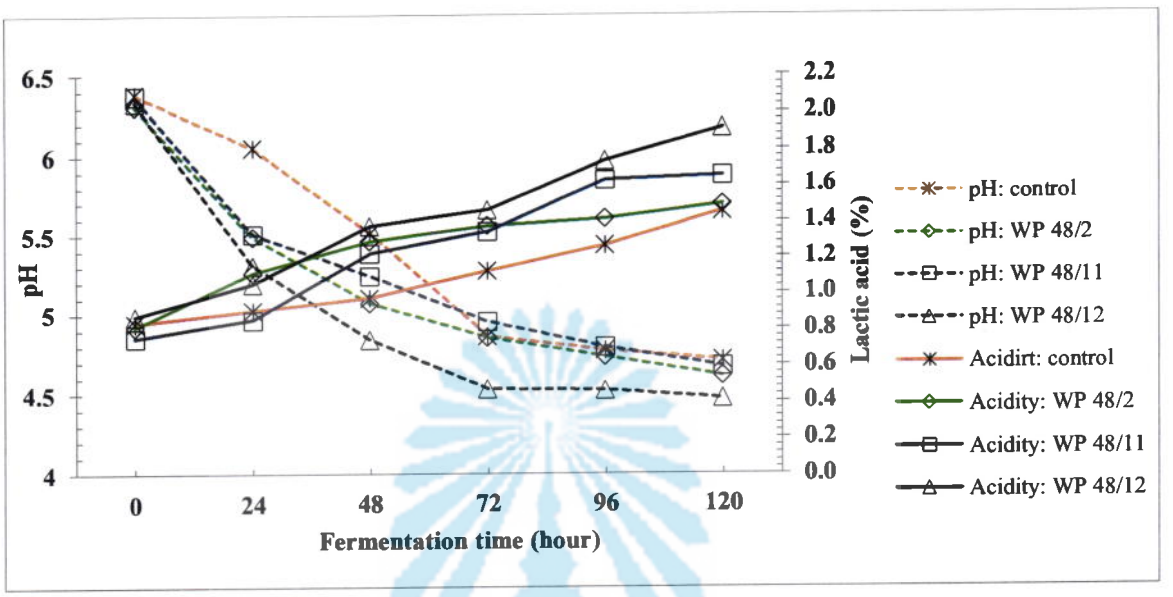



**ภาพที่ 8** ปริมาณกรดแลคติกและค่าความเป็นกรด-ด่างของปลาส้มที่เติมกล้าเชื้อ *Lactobacillus* spp. อัตราส่วน 0.5% (w/v)

ภาพที่ 9 กล้าเชื้อที่อัตราส่วน 1.0% (w/v) *L. casei* WP 48/2 ปริมาณกรดแลคติก 0.81 1.11 1.29 1.37 1.41 และ 1.49% (w/v) และค่าความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลงจาก 6.31 เป็น 5.49 5.07 4.85 4.73 และ 4.61 ตามลำดับ

กล้าเชื้อ *L. amylovorans* WP48/11 มีปริมาณกรดแลคติกเท่ากับ 0.75 0.85 1.27 1.34 1.62 และ 1.65% (w/v) และค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงจาก 6.37 เป็น 5.51 5.24 4.95 4.79 และ 4.67 ตามลำดับ

กล้าเชื้อ *L. plantarum* WP48/12 มีปริมาณกรดแลคติกเท่ากับ 0.87 1.05 1.37 1.46 1.73 และ 1.91% (w/v) และค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงจาก 6.33 เป็น 5.31 4.84 4.53 4.52 และ 4.47 ตามลำดับ

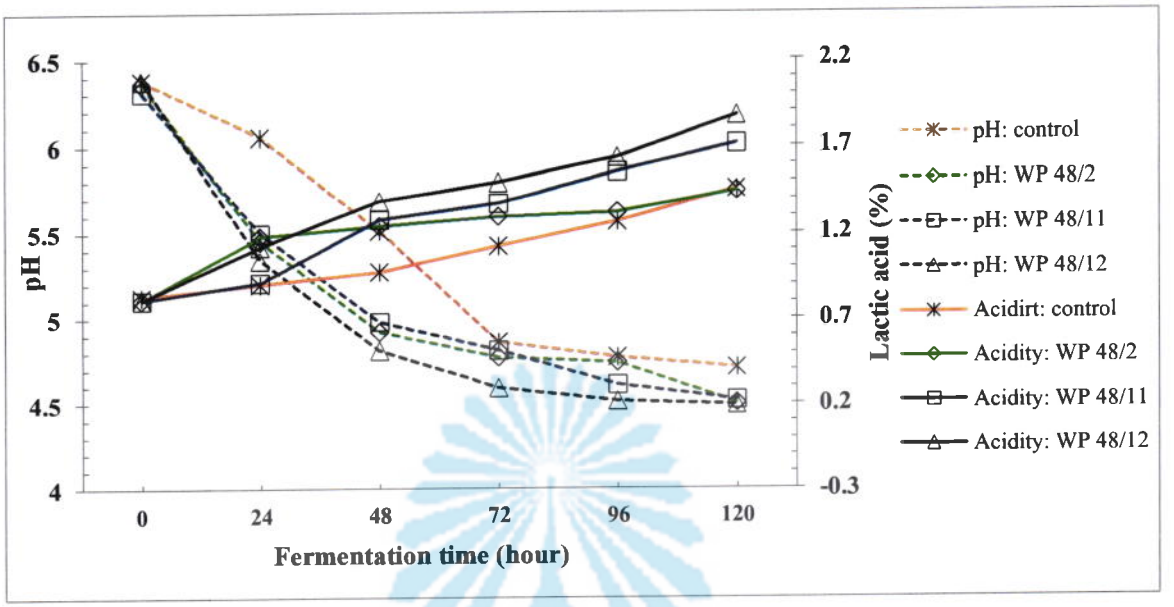



**ภาพที่ 9** ปริมาณกรดแลคติกและค่าความเป็นกรด-ด่างของปลาส้มที่เติมกล้าเชื้อ *Lactobacillus* spp. อัตราส่วน 1.0% (w/v)

ภาพที่ 10 เมื่อเติมกล้าเชื้อในอัตราส่วน 1.5% (w/v) *L. casei* WP 48/2 มีปริมาณกรดแลคติก 0.81 1.18 1.24 1.29 1.32 และ 1.44% (w/v) และค่าความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลงจาก 6.36 เป็น 5.45 4.92 4.77 4.74 และ 4.50 ตามลำดับ

กล้าเชื้อ*L. amylovorans* WP48/11 มีปริมาณกรดแลคติกเท่ากับ 0.81 0.91 1.27 1.37 1.55 และ 1.71% (w/v) และค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงจาก 6.31 เป็น 5.50 4.98 4.81 4.61 และ 4.52 ตามลำดับ

กล้าเชื้อ *L. plantarum* WP48/12 มีปริมาณกรดแลคติกเท่ากับ 0.81 1.12 1.39 1.49 1.63 และ 1.87% (w/v) และค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงจาก 6.38 เป็น 5.34 4.81 4.59 4.51 และ 4.49 ตามลำดับ




**ภาพที่ 10** ปริมาณกรดแลคติกและค่าความเป็นกรด-ด่างของปลาส้มที่เติมกล้าเชื้อ *Lactobacillus* spp. อัตราส่วน 1.5% (w/v)

**4.10 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของปลาส้มที่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรีย**

จากการประเมินผลทางด้านประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ โดยการนำตัวอย่างปลาส้มมาให้ผู้ทดสอบจำนวน 30 คนโดยเป็นผู้ที่ผ่านการอบรมการทดสอบประสาทสัมผัส ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์การทดสอบจากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน โดยประเมินสี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม ตัวอย่างปลาส้มที่ผ่านการหมักทั้งหมด 10 สูตร ได้แก่ ผ่านการทอดสุก

รหัส 0101 ไม่เติมกล้าเชื้อ

รหัส 0201 หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. casei* WP 48/2 อัตราส่วน 0.5% (w/v)

รหัส 0202 หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. casei* WP 48/2 อัตราส่วน 1.0% (w/v)

รหัส 0203 หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. casei* WP 48/2 อัตราส่วน 1.5% (w/v)

รหัส 0301 หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. amylovorans* WP 48/11 อัตราส่วน 0.5% (w/v)

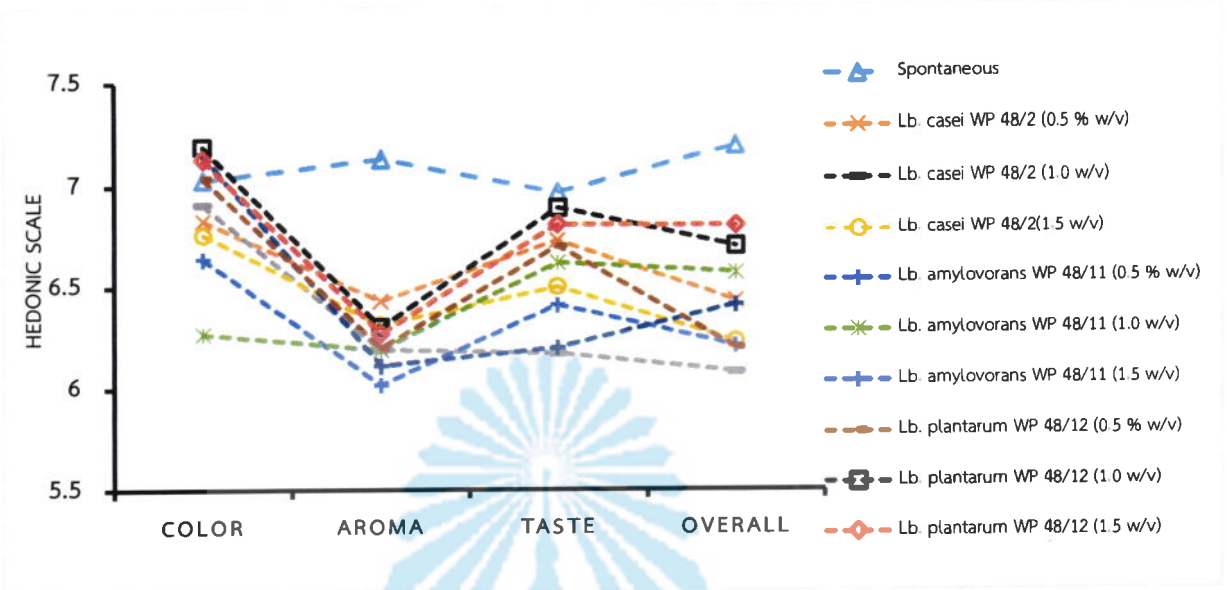
รหัส 0302 หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. amylovorans* WP 48/11 อัตราส่วน 1.0% (w/v)

รหัส 0303 หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. amylovorans* WP 48/11 อัตราส่วน 1.5% (w/v)

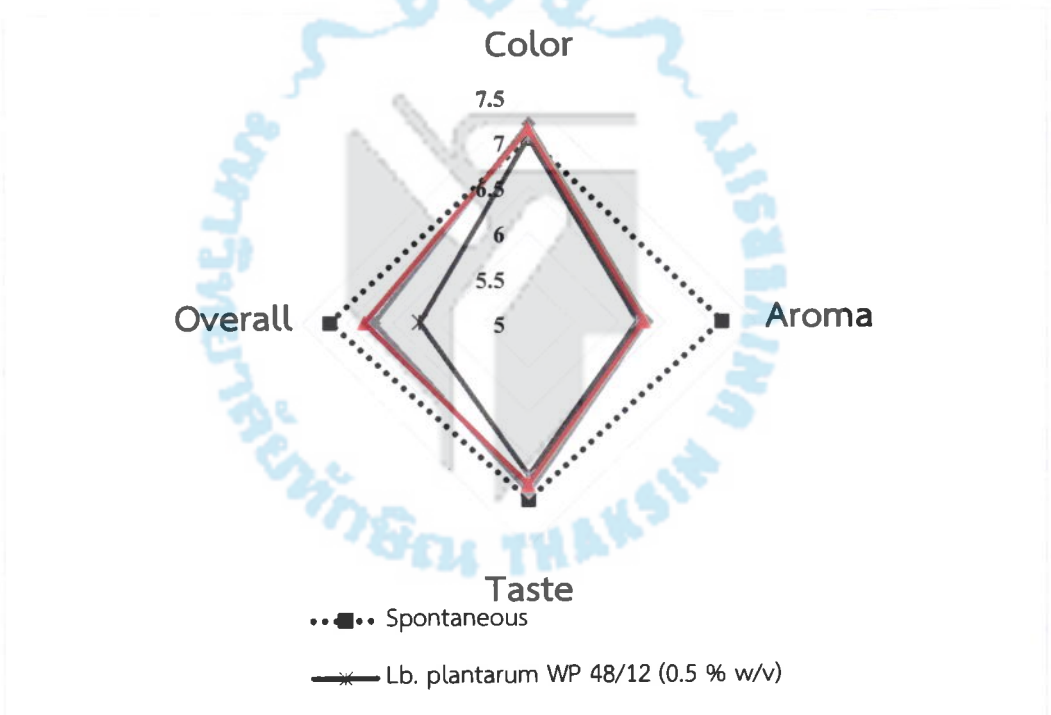
รหัส 0401 หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* WP 48/12 อัตราส่วน 0.5% (w/v)

รหัส 0402 หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* WP 48/12 อัตราส่วน 1.0% (w/v)

รหัส 0403 หมักด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* WP 48/12 อัตราส่วน 1.5% (w/v)




**ภาพที่ 11** คะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์ปลาส้มที่หมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. ความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5% (w/v)




**ภาพที่ 12** คะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์ปลาส้มเติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* WP48/12 ที่อัตราส่วน 0.5 1.0 และ 1.5% (w/v)

โดยวิธี Hedonic Scaling 9 point ประเมินทางประสาทสัมผัสแบบหาอัตราความชอบ มีระดับคะแนนทั้งหมด 9 คะแนน ได้แก่ 1=ไม่ชอบมากอย่างยิ่ง 2=ไม่ชอบ มาก 3=ไม่ชอบปานกลาง 4=ไม่ชอบเล็กน้อย 5=เฉยๆ 6=ชอบเล็กน้อย 7=ชอบปานกลาง 8=ชอบมาก และ 9=ชอบมากอย่างยิ่ง ทำการประเมินทางประสาทสัมผัสในด้าน สี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม เลือกเปรียบเทียบปลาส้มที่เติมกล้าเชื้อทั้งหมด 9 สูตร ใช้เวลาหมัก 3-4 วัน เปรียบเทียบกับปลาส้มที่หมักด้วยวิธีธรรมชาติ ใช้เวลาหมัก 7-8 วัน โดยพิจารณาจากปริมาณกรดที่เท่ากันในตัวอย่างปลาส้มหมัก พบว่าการใช้กล้าเชื้อทั้งสามชนิดให้ผลต่อประสาทสัมผัสของปลาส้มแตกต่างกัน โดยเฉพาะในด้านกลิ่นของผลิตภัณฑ์ มีคะแนนอยู่ในเกณฑ์ ชอบเล็กน้อย ต่างจากปลาส้มที่หมักโดยวิธีธรรมชาติที่ได้คะแนนในเกณฑ์ชอบปานกลาง เช่นเดียวกับด้านความชอบโดยรวมที่ปลาส้มจากการหมักโดยวิธีธรรมชาติได้คะแนนการยอบรับสูงกว่า แต่ด้านรสชาติและสีของปลาส้มกลับไม่มีความแตกต่างกัน จึงแสดงให้เห็นว่าการใช้กล้าเชื้อสามารถช่วยลดระเวลาในการหมักปลาส้มได้ โดยไม่ส่งผลต่อสีสันและรสชาติของปลาส้ม แต่มีผลต่อกลิ่น และความชอบโดยรวม (ภาพที่ 11)

การเปรียบเทียบกล้าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่ากล้าเชื้อแบคทีเรีย *L. plantarum* WP48/12 ได้รับคะแนนการยอบรับทั้ง 4 ด้านมากกว่าการใช้กล้าเชื้ออื่น ๆ และที่อัตราส่วน 1.0% (w/v) ให้ผลการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงกว่าที่อัตราส่วน 0.5% (w/v) แต่ไม่แตกต่างกับอัตราส่วน 1.5% (w/v) (ภาพที่ 12) ดังนั้นจึงเลือกกล้าเชื้อ *L. plantarum* WP48/12 อัตราส่วน 1.0% (w/v) ในการศึกษาการหมักร่วมกับยีสต์ต่อไป

**4.11 อัตราส่วนที่เหมาะสมของกล้าเชื้อแลคทีเรียกรดแลคติกผสมและกล้าเชื้อยีสต์ผสม**

อัตราส่วนคัดกล้าเชื้อแบคทีเรีย *plantarum* WP48/12 ที่เหมาะสมในการหมักปลาส้ม คือ อัตราส่วน 1.0% (w/v) นำมาทดสอบการหมักร่วมกับยีสต์ที่คัดแยกได้จากปลาส้ม *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในอาหาร เตรียมกล้าเชื้อทั้งแบคทีเรียและยีสต์ด้วยการทำแห้งในอุณหภูมิต่ำ แล้วใช้เป็นกล้าเชื้อร่วมสำหรับหมักปลาส้ม โดยมีชุดการทดลองทั้งหมด 4 สูตร

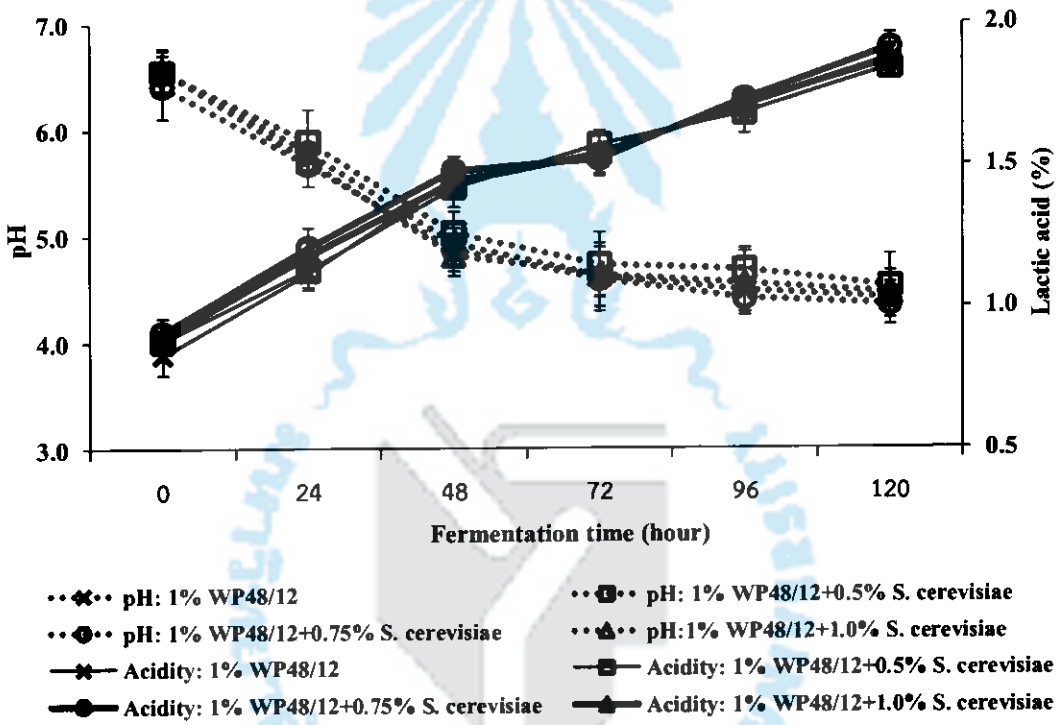
T1 คือ สูตรควบคุม (เติม 1.0% (w/v) *L. plantarum* WP48/12)

T2 คือ สูตรเติม 1.0% (w/v) *L. plantarum* WP48/12 + 0.5% (w/v) *S. cerevisiae*

T3 คือ สูตรเติม 1.0% (w/v) *L. plantarum* WP48/12 + 0.75% (w/v) *S. cerevisiae*

T4 คือ สูตาเติม 1.0% (w/v) *L. plantarum* WP48/12 + 1.0% (w/v) *S. cerevisiae*

ติดตามการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดแลคติกและทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส พบว่าการหมักร่วมระหว่างแบคทีเรียและยีสต์ทุกอัตราส่วนให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกรดแลคติกไม่แตกต่างกับการหมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว ค่าความเป็นกรด-ด่าง (ภาพที่ 13) แต่การทดสอบทางประสาทสัมผัส การหมักร่วมกับยีสต์ให้ผลดีกว่าการหมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทดสอบประสาทสัมผัสด้านกลิ่นของผลิตภัณฑ์ได้คะแนนการยอมรับอยู่ในเกณฑ์ชอบมากและพบว่าอัตราส่วนของยีสต์ให้ผลการทดสอบทางประสามสัมผัสไม่แตกต่างกัน




**ภาพที่ 13** ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกรดแลคติกในตัวอย่างปลาส้มที่หมักร่วมระหว่าง *L. plantarum* WP48/12 และ *S. cerevisiae* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

**4.12 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาส้มพร้อมรับประทานและคุณค่าทางโภชนาการ**

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาส้มที่ได้จากการหมักร่วมระหว่างแบคทีเรีย 1% (w/v) *L. plantarum* WP48/12 และ 0.5% (w/v) *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.21 กรดแลคติก เท่ากับ 1.04% (v/v) นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เป็นปลาส้มพร้อมรับประทาน จำนวน 3 ผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ปลาส้มทอดทรงเครื่อง น้ำพริกปลาส้ม และปลาส้มคั่วกลิ้ง โดยมีส่วนประกอบดังนี้

**วัตถุดิบสำหรับปลาส้มทอดทรงเครื่อง**

1. ปลาส้ม (ปลายี่สก) 800 กรัม
2. หอมแดง 100 กรัม
3. พริกแห้ง 80 กรัม
4. ใบมะกรูด 60 กรัม
5. ตะไคร้ 120 กรัม
6. น้ำมันพืช 100 ml
7. แป้งทอดกรอบ 50 กรัม

**วัตถุดิบสำหรับปลาส้มคั่งกลิ้ง**

1. ปลาส้มอ (ปลายี่สก) 600 กรัม
2. กระเทียม 150 กรัม
3. พริกแห้ง 250 กรัม
4. ตะไคร้ 100 กรัม
5. น้ำมะขามเปียก 50 ml
6. น้ำปลา 10 ml

**วัตถุดิบสำหรับน้ำพริกปลาส้ม**

1. ปลาส้ม 600 กรัม
2. หอมแดง 200 กรัม
3. ตะไคร้ 250 กรัม
4. ใบมะกรูด 50 กรัม
5. กระเทียม 150 กรัม
6. พริกขี้หนูสด 250 กรัม

การทดสอบประสาทสัมผัสของผู้บริโภคพบว่าผู้ทดสอบให้คะแนนปลาส้มทรงทอดเครื่องมากที่สุด ทั้งนี้เพราะให้รสชาติของปลาส้มชัดเจนมากกว่า ในขณะที่น้ำพริกปลาส้มและคั่วกลิ้งปลาส้มได้รับคะแนนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เพราะผลิตภัณฑ์ทั้งสองมีรสจัดจึงทำให้ผู้ทดสอบกลุ่มที่ไม่ชอบรสจัดให้คะแนนต่ำกว่า ดังนั้นจึงเลือกผลิตภัณฑ์ปลาส้มทอดทรงเครื่องสำหรับการส่งตรวจฉลากโภชนาการพร้อมกับปลาส้มที่หมักด้วยกล้าเชื้อ 1% (w/v) *L. plantarum* WP48/12 และ 0.5% (w/v) *S. cerevisiae*

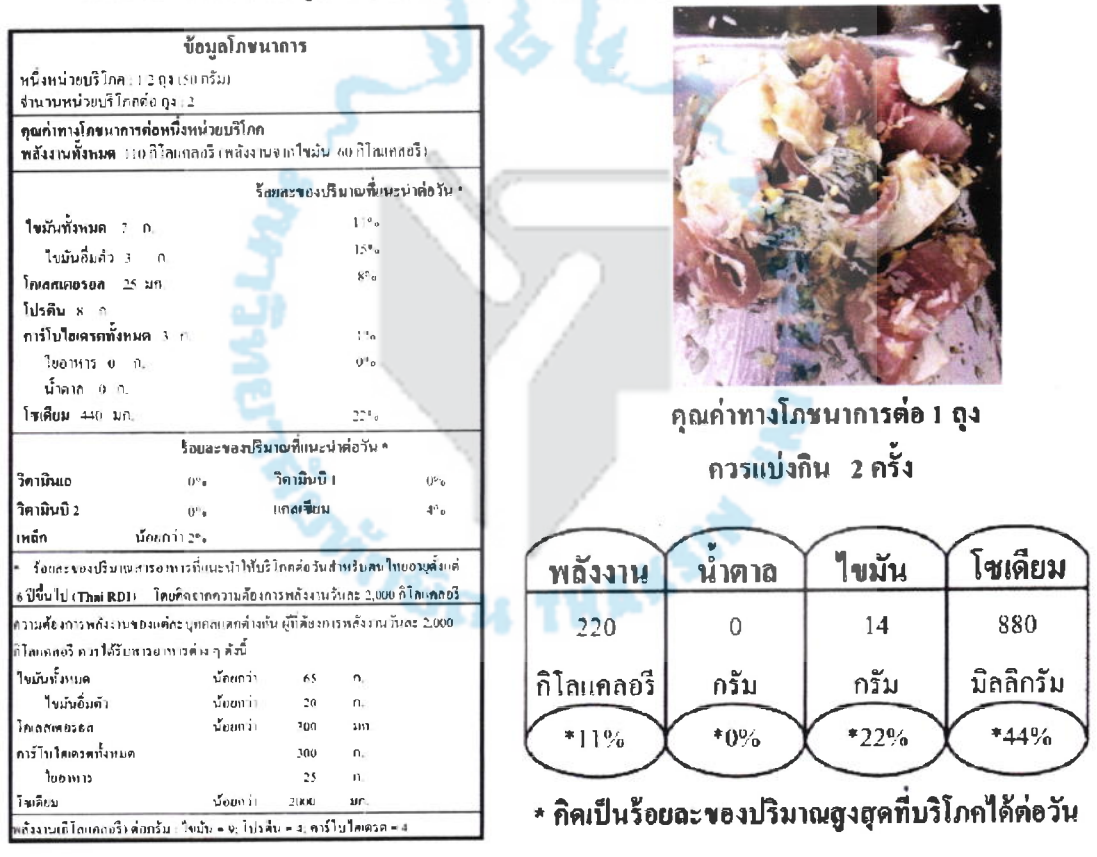
การตรวจฉลากโภชนาการและความปลอดภัยของปลาส้มที่หมักด้วยกล้าเชื้อผสม 1% (w/v) *L. plantarum* WP48/12 และ 0.5% (w/v) *S. cerevisiae* ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน โดยส่งตรวจที่บริษัท Central Lab (ประเทศไทย) จำกัด พบว่า ปลาส้มปริมาณ 100 กรัม มีคุณค่าทางโภชนาการ ดังนี้ โปรตีน 15.16 กรัม คาร์โบไฮเดรต 5.12 กรัม ไขมัน 13.25 กรัม และพลังงาน 200 กิโลแคลอรี (รายละเอียดแสดงดังภาพที่ 14) สำหรับความปลอดภัยทางจุลชีววิทยา พบว่าปลาส้มที่หมักด้วยกล้าเชื้อตรวจไม่พบแบคทีเรียก่อโรคทั้งหมด และยังไม่พบพยาธิใบไม้ตับและพยาธิตัวจี๊ด ปริมาณที่แนะนำต่อ 1 หน่วยบริโภค เท่ากับ 50 กรัม โดยมีคุณค่าทางโภชนาการ ดังนี้ โปรตีน 8 กรัม คาร์โบไฮเดรต 3 กรัม ไขมัน 7 กรัม และพลังงาน 110 กิโลแคลอรี (รายละเอียดแสดงดังภาพที่ 14)

สำหรับปลาส้มทรงเครื่องปริมาณ 100 กรัม มีคุณค่าทางโภชนาการ ดังนี้ โปรตีน 27.39 กรัม คาร์โบไฮเดรต 13.40 กรัม ไขมัน 22.49 กรัม และพลังงาน 366 กิโลแคลอรี (รายละเอียดแสดงดังภาพที่ ) สำหรับความปลอดภัยทางจุลชีววิทยา (รายละเอียดแสดงดังภาพที่ 15) ปริมาณที่แนะนำต่อ 1 หน่วยบริโภค เท่ากับ 45 กรัม โดยมีคุณค่าทางโภชนาการ ดังนี้ โปรตีน 12 กรัม คาร์โบไฮเดรต 6 กรัม ไขมัน 10 กรัม และพลังงาน 160 กิโลแคลอรี (รายละเอียดแสดงดังภาพที่ 15)

**ผลการทดสอบ**

| รายการทดสอบ | ต่อ 100 กรัม | ต่อหนึ่งหน่วยบริโภค | %RDI | วิธีทดสอบอ้างอิง |
|---|---|---|---|---|
| พลังงานทั้งหมด (กิโลแคลอรี) * | 200.93 | 110 | - | Journal of AOAC INTERNATIONAL 1993 p 106 |
| พลังงานจากไขมัน (กิโลแคลอรี) * | 119.25 | 60 | - | Journal of AOAC INTERNATIONAL 1993 p 106 |
| ไขมันทั้งหมด (ก.) * | 13.25 | 7 | 11 | AOAC (2019) 948.15 |
| ไขมันอิ่มตัว (ก.) | 5.96 | 3 | 15 | In-house method TE-CH-208 by GC Technique |
| โคเลสเตอรอล (มก.) | 49.33 | 25 | 8 | In-house method TE-CH-141 based on AOAC (2016) 976.26 |
| โปรตีน (ก.) (*N x 6.25) | 15.16 | 8 | - | In-house method TE-CH-642 based on AOAC (2019) 991.10 |
| คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (ก.) | 5.26 | 3 | 1 | Journal of AOAC INTERNATIONAL 1993 p 106 |
| ใยอาหาร (ก.) * | 0.00 | 0 | 0 | AOAC (2019) 985.29 |
| น้ำตาล (ก.) | 0.00 | 0 | - | AOAC (2016) 923.09 (B) |
| โซเดียม (มก.) | 872.556 | 440 | 22 | In-house method TE-CH-134 based on AOAC (2019) 984.27 |
| วิตามินเอ (มคก.) * | ไม่พบ | <0.001 | 0 | In-house method TE-CH-622 based on Bull Dept Med Sci 1995;37(1):57-64 |
| วิตามินบี 1 (มก.) | น้อยกว่า 0.50 | <0.001 | 0 | In-house method TE-CH-311 based on Journal of AOAC International Vol 85,No 4,2002 |
| วิตามินบี 2 (มก.) | ไม่พบ | <0.001 | 0 | In-house method TE-CH-225 based on Journal of Agriculture Food Chemistry (1984) 32 p 1326-1341 |
| แคลเซียม (มก.) | 57.748 | (28.87) | 4 | In-house method TE-CH-134 based on AOAC (2019) 984.27 |
| เหล็ก (มก.) | 0.583 | (0.29) | น้อยกว่า 2 | In-house method TE-CH-134 based on AOAC (2019) 984.27 |
| เถ้า (ก.) | 3.27 | - | - | AOAC (2019) 938.08 |
| ความชื้น (ก.) | 63.06 | - | - | In-house method TE-CH-180 based on AOAC (2019) 950.46 (B) |

หมายเหตุ * เป็นการทดสอบที่ไม่อยู่ในขอบข่ายที่ได้รับการรองจากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรม วิทยาศาสตร์การแพทย์ ตามมาตรฐาน ISO IEC 17025 : 2017 และนโยบายข้อกำหนดเงื่อนไข การรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุข สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ




**ภาพที่ 14** คุณค่าทางโภชนาการของปลาส้มที่หมักด้วยกล้าเชื้อ 1% (w/v) *L. plantarum* WP48/12 และ 0.5% (w/v) *S. cerevisiae*

**ผลการทดสอบ**

| รายการทดสอบ | ต่อ 100 กรัม | ต่อหนึ่งหน่วยบริโภค | %RDI | วิธีทดสอบอ้างอิง |
|---|---|---|---|---|
| พลังงานทั้งหมด (กิโลแคลอรี) * | 365.57 | 160 | - | Journal of AOAC INTERNATIONAL 1993 p 106 |
| ไขมันทั้งหมด (กรัม) * | 22.46 | 10 | 15 | AOAC (2019) 948.15 |
| โคเลสเตอรอล (มก.) | 12.15 | 5 | 2 | In-house method TF-CH-143 based on AOAC (2016) 976.26 |
| โปรตีน (กรัม) | 27.36 | 12 | - | In-house method TF-CH-043 based on AOAC (2019) 981.10 |
| คาร์โบไฮเดรต (กรัม) | 13.80 | 6 | 2 | Journal of AOAC INTERNATIONAL 1993 p 106 |
| น้ำตาล (กรัม) | 7.14 | 3 | - | AOAC (2016) 925.35(B) |
| โซเดียม (มก.) | 1255.700 | 560 | 28 | In-house method TF-CH-134 based on AOAC (2019) 984.27 |
| เส้น (กรัม) | 4.51 | - | - | AOAC (2019) 935.38 |
| ความชื้น (กรัม) | 32.21 | - | - | In-house method TF-CH-160 based on AOAC (2019) 950.46 (B) |

หมายเหตุ: * เป็นการทดสอบที่ไม่อยู่ในขอบข่ายที่ได้รับรองจากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2017 และดูรายชื่อคำหมดเครื่องหมาย การรับรองห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และสาธารณสุข สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ

**ฉลากโภชนาการไทย (ย่อ)**

**ข้อมูลโภชนาการ**

หนึ่งหน่วยบริโภค 1 ถุง (45 กรัม)

จำนวนหน่วยบริโภคต่อ ถุง 1

**คุณค่าทางโภชนาการต่อหนึ่งหน่วยบริโภค**

**พลังงานทั้งหมด** 160 กิโลแคลอรี

| | ร้อยละของปริมาณที่แนะนำต่อวัน * |
|---|---|
| **ไขมันทั้งหมด** 10 ก. | 15% |
| **โคเลสเตอรอล** 5 มก. | 2% |
| **โปรตีน** 12 ก. | |
| **คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด** 6 ก. | 2% |
| น้ำตาล 3 ก. | |
| **โซเดียม** 560 มก. | 28% |

* ร้อยละของปริมาณสารอาหารที่แนะนำให้บริโภคต่อวันสำหรับคนไทยอายุตั้งแต่ 6 ปีขึ้นไป (Thai RDI) โดยคิดจากความต้องการพลังงานวันละ 2,000 กิโลแคลอรี

**คุณค่าทางโภชนาการต่อ 1 ถุง**

| พลังงาน | น้ำตาล | ไขมัน | โซเดียม |
|---|---|---|---|
| 160 กิโลแคลอรี | 3 กรัม | 10 กรัม | 560 มิลลิกรัม |
| *8% | *5% | *15% | *28% |

*** คิดเป็นร้อยละของปริมาณสูงสุดที่บริโภคได้ต่อวัน**

**ภาพที่ 15** คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ปลาสัมทอดทรงเครื่องที่หมักด้วยกล้าเชื้อ 1% (w/v) *L. plantarum* WP48/12 และ 0.5% (w/v) *S. cerevisiae*

# บทที่ 5
# อภิปรายผล สรุปผล และข้อเสนอแนะ

## อภิปรายผล

ตัวอย่างปลาส้มที่เก็บจากชุมชนทะเลน้อย อ.ควนขนุน จ.พัทลุง โดยมีการหมักแบบธรรมชาติและใช้ข้าวต้มแทนการใช้ข้าวเจ้าหรือข้าวเหนียวเหมือนกับแหล่งผลิตอื่น ๆ ใช้เวลาในการหมักประมาณ 5-7 วัน ขึ้นอยู่สภาพอากาศ มีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด–ด่างและปริมาณกรด ในช่วงต้นมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย และเริ่มเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัดในชั่วโมงการหมักที่ 48-72 แล้วคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 120 แล้วเริ่มลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักปลาส้มด้วยข้าวจ้าวหรือข้าวเหนียวสุก พบว่ามีปริมาณกรดน้อยกว่าแต่มีการเปลี่ยนแปลงเร็วกว่า โดยการหมักด้วยข้าวจ้าวหรือข้าวเหนียวมีการเปลี่ยนแปลงชัดเจนในชั่วโมงที่ 72-96 (Yunchalard *et al*., 2005; Saithong *et al*., 2010) ทั้งนี้เพราะการใช้ข้าวต้มในการหมักทำให้จุลินทรีย์สามารถย่อยแป้งได้ง่ายกว่าการใช้ข้าวสุก ซึ่งสอดคล้องกับการพบเชื้อยีสต์ในชั่วโมงการหมักเริ่มต้น เมื่อยีสต์ย่อยแป้งเป็นน้ำตาลส่วนหนึ่งจะเกิดการหมักเป็นเอทานอลและอีกส่วนถูกแบคทีเรียกรดแลคติกนำไปใช้ในการหมัก

ปริมาณแบคทีเรียและยีสต์ที่พบในตัวอย่างปลาส้มมีการเปลี่ยนแปลงสอดคล้องกับปริมาณกรดที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น แบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 72 และสูงสุดในชั่วโมงที่ 120 มีปริมาณ Log 4-5 CFU/g ซึ่งน้อยกว่างานวิจัยอื่น ๆ ((Paludan-Muller *et al*., 2002; Yunchalard *et al*., 2005; Kopermsub and Yunchalard 2010) การเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียกรดแลคติกทำให้ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดลดลง และควบคุมปริมาณยีสต์และราไม่ให้เจริญได้ โดยพบว่าปริมาณยีสต์เพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงเริ่มต้นจนถึง ชั่วโมงที่ 24 จากนั้นจะลงที่และลดลงเล็กน้อย ซึ่งเกิดจาก หลังจากแบคทีเรียเริ่มการหมักค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง ปริมารกรดแลคติกเพิ่มสูงขึ้น ทำให้ปริมาณยีสต์ไม่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ปริมาณกรดที่สูงขึ้นทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นไม่สามารถเจริญเติบโตได้จึงเป็นการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคอีกด้วย (Kopermsub and Yunchalard 2010)

จากการวิเคราะห์ประชากรแบคทีเรียในตัวอย่างปลาส้มของชุมชนทะเลน้อย ติดตามการเปลี่ยนแปลงของประชากรแบคทีเรียชั่วแต่เริ่มต้นจนครบชั่วโมงที่ 120 ด้วยวิธี PCR-DGGE และไพรเมอร์ 357f-GC และ 518r แบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. เป็นสายพันธุ์เด่นในการหมัก โดยพบทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. plantarum L. sakei, L. farciminis* และ *L. lactis* สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร MRS สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่ม *Lactobacillus* spp. ได้มากที่สุด ทั้งนี้เพราะแบคทีเรีย

กลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญในการหมักปลาส้ม โดยเฉพาะ *L. plantarum* และ *L. lactis* มักพบในปลาส้มและอาหารหมักจากเนื้อสัตว์และผักได้ทั่วไป (Kopermsub and Yunchalard. 2010; Saithong *et al*., 2010; Hwanhlem *et al*. 2011; Zeng *et al*., 2014; Sanchart *et al*.2015; Thongruck *et al*., 2017)

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์จากตัวอย่างปลาส้มโดยเลือกตัวอย่างจากชั่วโมงการหมักที่แตกต่างกัน แบคทีเรียแลคติกที่เจริญได้บนอาหาร MRS ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียรูปท่อนติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส จำนวน 44 ไอโซเลต โดยพบในชั่วโมงการหมักที่ 48 และ 72 มากที่สุด คิดเป็น 54.54% และ 18.18% ของจำนวนไอโซเลตทั้งหมด เพราะเป็นช่วง log phase ของเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus* spp. ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียเด่นในการหมักปลาส้มของชุมชนทะเลน้อย จากจัดกลุ่มเชื้อด้วยวิธี PCR-RFLP ด้วยยีน *RpoB* (Dahllof *et al*., 2000; Ko *et al*., 2002; Sanchart *et al*., 2015) มีลักษณะของแถบ DNA แตกต่างกัน ให้ผลสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วย DGGE แบคทีเรียเด่นยังคงเป็น *L. plantarum* แต่พบแบคทีเรีย *L. casei* และ *L. amylovoran* ที่แตกต่างไปจากวิธี DGGE โดย *L. amylovoran* มีรายงานการพบในอาหารหมักที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ และอาจมีบทบาทสำคัญในการย่อยแป้งและการหมักกรดแลคติก ส่วน *L. casei* มักพบในอาหารหมักจากนมหรือผลิตภัณฑ์จากนมเป็นส่วนใหญ่ แต่มีรายงานการพบในอาหารหมักจากเนื้อสัตว์ได้เช่นกัน การคัดแยกแบคทีเรียและจัดจำแนกด้วยวิธี PCR-RFLP ให้ความแตกต่างจากการตรวจด้วยวิธี DGGE ทั้งนี้อาจเป็นเพราะข้อจำกัดของการเมปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR เนื่องจากการทำ PCR ของวิธี DGGE ใช้ DNA ต้นแบบจากแบคทีเรียความหลากหลายทำให้ต้นแบบของแบคทีเรียแต่ละชนิดมีปริมาณไม่เท่ากัน ซึ่งส่งผลต่อการเข้าทำปฏิกิริยาของไพรเมอร์และเอนไซม์ DNA polymerase มีการแข่งขันกันทำปฏิกิริยา ทำให้ต้นแบบ DNA ที่มีปริมาณมากกว่ามีโอกาสทำปฏิกิริยาได้ก่อนและรบกวนหรือขัดขวางการทำปฏิกิริยาของต้นแบบ DNA ที่มีปริมาณน้อย (Chahrom and Prakitchaiwattana, 2018)

กล้าเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่คัดแยกได้ในการผลิตปลาส้ม คือ *L. casei* WP 48/2 *L. amylovorans* WP 48/11 และ *L. plantarum* WP 48/12 นำมาใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นของการหมักปลาส้มที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตสามารถเร่งกระบวนการหมักให้เร็วขึ้นทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ลดลงอย่างรวดเร็วและมีปริมาณกรดแลคติกสูงกว่าชุดควบคุมเติมกล้าเชื้อ *L. casei* WP 48/2 *L. amylovorans* WP 48/11 และ *L. plantarum* WP 48/12 ในปริมาณ 0.5% ให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม และกล้าเชื้อความเข้มข้น 1 และ 1.5% สามารถเร่งกระบวนการหมักได้รวดเร็วขึ้นและกล้าเชื้อ *L. plantarum* WP 48/12 ให้ผลดีกว่าแบคทีเรีย *L. casei* WP 48/2 และ *L. amylovorans* WP 48/11 ทั้งนี้เพราะ *L. plantarum* เป็นแบคทีเรียเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีเกลือ

และน้ำตาลสูง และสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะของการหมักได้รวดเร็วกล้าอีก 2 ไอโซเลต ทำให้สามารถผลิตกรดแลคติกและปรับค่ากรด-ด่างในกระบวนการหมักให้เหมาะสมกับการเจริญจะเห็ดได้จากปลาส้มที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* WP 48/12 มีปริมารกรดแลคติกสูงขึ้นใน 24 ชั่วโมงของการหมัก สอดคล้องกับรายงานของ Saithong *et al.* (2010) พบว่าการใช้กล้าเชื้อ *L. plantarum* IFRPD P15 สามารถเร่งกระบวนการหมักปลาส้มได้ดี มีการผลิตกรดแลคติกสูงหลังชั่วโมงที่ 48 นอกจากนี้ Riebroy *et al.* (2008) รายงานว่าการหมักผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (Som-fug) ด้วยกล้าเชื้อ *L. plantarum* PA104 เพิ่มอัตราการผลิตกรดแลคติกและลดค่าความเป็นกรด-ด่างได้หลังจากชั่วโมงการหมักที่ 48 เช่นกัน พิทยาและรัชนี (2560) ใช้กล้าเชื้อ *L. casei* 01 เป็นกล้าเชื้อในการหมักปลาส้ม โดยกล้าเชื้อที่ความเข้มข้น 6 และ 8% (v/w) สามารถสร้างกรดได้มากกว่าการหมักตามธรรมชาติ แต่ไม่มีสามารถลดระยะเวลาการหมักได้อย่างมีนัยสำคัญ และกล้าเชื้อที่ใช้เป็นกล้าเชื้อที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ และต้องเลี้ยงให้ได้จำนวนเชื้อสูงถึง $10^{10}$ CFU/ml ซึ่งทำให้มีค่าใช้จ่ายเพิ่มมากขึ้น แตกต่างจากงานวิจัยนี้ที่ใช้กล้าเชื้อที่คัดแยกได้จากปลาส้มโดยตรงซึ่งเป็นเชื้อที่เจริญได้ง่ายในสภาพอากาศของประเทศไทย และใช้กล้าเชื้อในปริมาณที่น้อยกว่า

การเติมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากปลาส้มโดยตรง ร่วมกับกล้าเชื้อ *L. plantarum* WP 48/12 ความเข้มข้น 1% ส่งผลต่อการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคทำให้ของปลาส้มที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียร่วมกับยีสต์ได้คะแนนการยอมรับสูงกว่าปลาส้มที่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียเพียงอย่างเดียวและ โดยเฉพาะในด้านกลิ่นของผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้การเติมกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* ทำให้ยีสต์สามารถเจริญได้มากกว่าและคงอยู่ในระบบการหมักได้นานกว่าการหมักตามธรรมชาติ มีรายงานว่ายีสต์ *S. cerevisiae* สามารถสร้างกรดไขมันระเหยง่ายที่ส่งผลต่อกลิ่นของผลิตภัณฑ์อาหารหมัก (Park and Kim, 2019) แต่ความเข้มข้นที่ของ *S. cerevisiae* ที่ใช้ในการทดลองให้ผลไม่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

## เอกสารอ้างอิง


พิทยา ใจคา และ รัชนี แก้วจินดา. (2560). การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลาส้มในระหว่างการหมักร่วมกับโพรไบโอติก *Lactobacillus casei* 01 ที่ระดับแตกต่างกัน. **วารสารวิจัยและพัฒนาวไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์**. 12(3): 37-53

มาโนชญ์.สุธีรวัฒนานนท์..(2548). **ปลาส้มสำเร็จรูปพร้อมรับประทาน**. รายงานการวิจัย ฐานข้อมูลโครงสร้างพื้นฐานภาครัฐด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 9(2): 26-27

สมคิด ดีจริง และอรุณี คงดี. (2556). **การคัดแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกจากแป้งโดยตรงเพื่อลดต้นทุนการผลิตพลาสติกชีวภาพ**. รายงานการวิจัย สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่. 107 หน้า

อังคณา รัตนพันธ์. (2549). **การปรับปรุงคุณภาพและการเก็บรักษาปลาหมักปลาส้ม**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร. 68 หน้า

AOAC international. (2005). **Official Methods of Analysis**. 18th ed.AOAC, Gaithersburg, MD.

Ben Omar, N., and Ampe, F. (2000). Microbial community dynamics during production of the mexican fermented maize dough pozol. **Applied Environ Microbiol Journal**. 66, 3664–3673

Chahrom, K., and Prakitchaiwattana, C. (2018). Application of reverse transcriptase-PCR-DGGE as a rapid method for routine determination of *Vibrio* spp. in foods. **International Journal of Food Microbiology**. 264(2): 46-52

Cocolin, L., Bisson, L.F., and Mills, D.A. (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology**. 189, 81–87

Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., and Comi, G. (2001). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis of the *16S rRNA gene* V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. **Applied Environmental Microbiology Journal**. 67, 5113–5121

Dahllof, I., Baillie, H., and Kjelleberg, S. (2000). *RpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in *16S rRNA* gene intra-species heterogeneity. **Journal of Applied Environmental Microbiology**. 66(8): 3376-3380

Ercolini, D., Mauriello, G., Blaiotta, G., Moschetti, G., and Coppola, S. (2004). PCR–DGGE Fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo mozzarella cheese. **Journal of Applied Microbiology**. 96: 263–270

Hwanhlem, N., Buradaleng S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A., and Maneerat, S. (2011). Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. **Food Control**. 22: 401-407

Ko K.S., Lee H. K., Park M.Y., Lee K.H., Yun Y.J., Woo S.Y., Miyamoto H., and Kook Y.H. (2002). Application of RNA polymerase -subunit gene (*rpoB*) sequences for the molecular differentiation of *Legionella* species. **Journal of clinical microbiology**. 40(7): 2653-2658

Kopermsub, P., and Yunchalard, S. (2010). Identification of lactic acid bacteria associated with the production of Plaa-som, a traditional fermented fish product of Thailand. **International Journal Food Microbiology**. 138: 200-204

Paludan-Muller, C., Madsen, M., Sophanodora, P., Gram, L., and Moller, P.L. (2002). Fermentation and microflora of Plaa-som, a Thai fermented fish product prepared with different salt concentrations. **International Journal of Food Microbiology**. 73: 61– 70

Park M.K., and Kim, Y.S. (2019). Distinctive formation of volatile compounds in fermented rice Inoculated by different molds, yeasts, and lactic acid bacteria. **Molecules**. 24(11): 2123-2138

Riebroy, S., Benjaku,l S., and Visessanguan, W. (2008).Properties and acceptability of Som-fug, a Thai fermented fish mince, inoculated with lactic acid bacteria starters. **Journal of Food Microbiology**. 41: 569–580

Saithong, P., Panthavee,W., Boonyaratanakornkit, M., and Sikkhamondhol, C. (2010). Use of a starter culture of lactic acid bacteria in plaa-som, a Thai fermented fish. **Journal of Bioscience and Bioengineering**.110: 553-557

Sanchart, C., Benjakul, S., Rattanaporn, O., Haltrich, D., and Maneerat, S. (2015). Efficiency of the V3 region of *16S rDNA* and the *rpo*B gene for bacterial community detection in Thai traditional fermented shrimp (*Kung-Som*). **Journal Science and Technology**. 37(3): 291-297

Thongruck K., Saelao S., Sumpavapol P., Benjakul S., and Maneerat S. (2017). Monitoring of changes in lactic acid bacteria during production of Thai traditional fermented shrimp (Kung-Som) by culturing method and PCR-DGGE technique. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. 39(1): 41-47

Valyasevi R., and Rolle, R. S. (2002). An overview of small-scale food fermentation technologies in developing countries with special reference to Thailand: scope for their improvement. **International Journal of Food Microbiology**. 75: 231-239.

Yang, Z., Suomalainen, T., Maeyrae-Maekinen, A., and Huttunen, E. (1997). Antimicrobial activity of 2-Pyrolidone-5-Carboxylic acid produce by lactic acid bacteria. **Journal of Applied Environmental Microbiology**. 60: 786-790.

Yunchalard S., Vichiphan,S., Nontaso, N., and Kopermsub, P. (2005). Microbial population and chemical change during fermentation of Plaa-som, a Thai fermented fish product. **KKU Research Journal**. 10: 188-198.

Zeng X., Xia W., Jiang Q., Xu Y., and Wang H. (2014). Technological properties of Lactobacillus plantarum strain isolated from Chainese traditional low salt fermented whole fish. **Food Control**. 40: 351-358