รายงานการวิจัย

การเตรียมกล้าเชื้อผงสำหรับการผลิตปลาส้ม

Preparation of Powder Inoculum for Ferment Fish Som Production

โดย

ชุตินุช สุจริต

ห้องสมุด มทร.

ทะเบียน 50.036

เลขหมู่ TX 947

ฉบับที่ 1

4 ม.ค. 51

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณผลประโยชน์ปี 2543

จากสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล

การเตรียมกล้าเชื้อผงสำหรับการผลิตปลาส้ม

Preparation of Powder Inoculum for Ferment Fish Som Production

ชุตินุช สุจริต[1]

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณผลประโยชน์ 2543
จากสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล

บทคัดย่อ

การศึกษาการเจริญของ *Lacctobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 ซึ่งใช้เตรียมกล้าเชื้อสำหรับผลิตปลาส้มพบว่า *L. brevis* TISTR 860และ *P. pentosaceus* TISTR 423 จะเข้าสู่ระยะ mid- log late- log และ stationary ที่เวลา 9 ,18 และ 21 ชั่วโมง ตามลำดับและมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตรเท่ากับ 1.46 และ 1.42 ตามลำดับ

เมื่อเชื้อ *L. brevis* TISTR 860 และ *P. pentosaceus* TISTR 423 ที่เจริญในระยะต่างๆ มาเตรียมกล้าเชื้อผงโดยนำซัสเพนชั่นของเซลล์ที่ได้จากการเหวี่ยงแยกเซลล์แล้วนำมาผสมกับแป้งข้าวเจ้าในอัตราส่วน 1:20 โดยมีจำนวนเชื้อเริ่มต้นที่ 7.7×10^3 โคโลนีต่อกรัมและ 8.67×10^3 โคโลนีต่อกรัม ที่เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 วัน พบว่าจำนวนเชื้อรอดชีวิตไม่แตกต่างกันและได้ทำการเลือกตัวพยุงที่เหมาะสมคือ แป้งข้าวเจ้า

ปริมาณความชื้นของกล้าเชื้อ *L. brevis* TISTR 860 และ *P. pentosaceus* TISTR 423 มีปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 15 ปริมาณความชื้นจะขึ้นกับอุณหภูมิที่ทำการเก็บรักษา เมื่อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสปริมาณความชื้นจะค่อย ๆ ลดลงจนเท่ากับ 0 ในวันที่ 30

กล้าเชื้อ *L. brevis* TISTR 860 และ *P. pentosaceus* TISTR 423 ที่บรรจุในถุงโพลีเอธิลีนฉาบด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์และถุงโพลีโพรพีลีนและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วันพบว่ามีจำนวนเชื้อรอดชีวิตไม่แตกต่างกัน คือ $4.3x10^3$ โคโลนีต่อกรัมและ $4.0 x10^3$ โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ กล้าเชื้อที่เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสมีการรอดชีวิตมากกว่าที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การเปรียบเทียบปลาส้มที่ผลิตโดยใช้กล้าเชื้อผง กล้าเชื้อสดกับปลาส้มที่ผลิตแบบสูตรดั้งเดิม พบว่าผู้ทดสอบชิมให้คะแนน สี กลิ่น รสชาติ ความเปรี้ยวและความชอบโดยรวมของปลาส้มที่ผลิตโดยใช้กล้าเชื้อสดและกล้าเชื้อผงมากกว่าปลาส้มที่ผลิตแบบดั้งเดิมแตกต่างอย่าง นัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และนำไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการพบว่ามีองค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละ) มีโปรตีน 18.90 เถ้า 2.53 ไขมัน 0.76 ความชื้น 77.81 และ เยื่อใย 0.05

ABSTRACT

Lactobacillus brevis TISTR 860, *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 are used as starter cultures for Pla Som. These bacteria were used to prepare power inoculum. The growth of the starter cultures was determined. It was found that *L.bravis* TISTR 860 produced lactic acid rapidly in early stage of fermentation. Mid-log phase, late-log phase and stationary phase of *L.brevis* TISTR 860 were at 9, 18 and 21 h of cultivation time, respectively. The highest optical density was 1.46 (OD_{500}). *P.pentosaceus* TISTR 423 produced lactic acid in the final stage of cultivation. *P.pentosaceus* TISTR 423 had mid-log phase late-log phase and stationary phase at 9, 19 and 21 h of cultivation time, respectively. The highest optical density was 1.42

Cultures of *L.brevis* TISTR 860 *P.pentosaceus* TISTR 423 growth phases were used to prepare the powder inoculums. Powder inoculums were prepared by rice flour with harvested cells that had been centrifuged. The ratio cell:rice flour was 1:20. The initial viable cell counts in the powder inoculum were 7.7×10^3 and 8.67×10^3 CFU/g, respectively. When stored at 4°C for 20 days, the highest survival of *L.brevis* TISTR 860 and *P.pentosaceus* TISTR 423 in the powder inoculums were obtained using stationary phase cultures, with the resulting count of 7.7×10^3 CFU/g and 8.67×10^3 CFU/g respectively.

Bags of polypropyline or polyethylene laminate whth aluminium foil were used to store the powder inoculum of *L.brevis*, TISTR 860 *P.pentosaceus* TISTR 423 There was no difference in survival with the viable cell count of 4.3×10^3 CFU/g and 4.0×10^3 CFU/g respectively when stored at 4°C for 20 day

Comparison of Pla Som in powder inoculum, inoculum and no inoculum found that from acceptibility tested of Pla Som quality in colour, tester sour and preferable found that had Pla Som with culture than Pla Som produce without starter culture and Pla Som were significantly different at the level of (95%)

Utilize *L.levis* TISTR 860 and *P.pentosaceus* TISTR 423 Pla Som in powder content : protein 18.90%, ash 2.53%, lipid 0.76%, moisture 77.81% and crudefiber 0.05%

[1] ภาควิชาอุตสาหกรรมประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัย ขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง ราชมงคลตรัง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ที่ได้สนับสนุนงบประมาณผลประโยชน์ประจำปี 2543 ขอขอบคุณคณบดี พนักงานและเจ้าหน้าที่ นายมนูญ ไขสะ และ นางสาวนาฏอนงค์ คงหาดงาม เป็นผู้ช่วยในการวิจัย ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้จนเสร็จสมบูรณ์

คณะผู้วิจัย

27 มีนาคม 2545

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
ABSTRACT	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
สารบัญตาราง	(7)
สารบัญรูป	(8)
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	2
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	6
สรุปผลการทดลอง	17
ข้อเสนอแนะ	18
เอกสารอ้างอิง	19
ภาคผนวก	21
ภาคผนวก ก	22
ภาคผนวก ข	24
ภาคผนวก ค	27
ภาคผนวก ง	28

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. คะแนนความชอบเฉลี่ยของปลาส้มที่มีสูตรต่างชนิดกันทั้ง 3 สูตร	16
2. คุณค่าทางโภชนาการของปลาส้มที่ได้จากการวิเคราะห์	16

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. การเจริญ (a) การเปลี่ยนแปลง pH (b) ของแบคทีเรียใช้ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 ที่อุณหภูมิห้อง 9
2. ผลของระยะการเจริญและอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 10
3. ผลของตัวพยุงต่อการรอดชีวิตของกล้าเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR860 (a) และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 (b) ที่อุณหภูมิห้อง 12
4. ผลของความชื้นในขณะเก็บรักษาของกล้าเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR860 (a) และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 (b) ที่อุณหภูมิห้องเย็น 4 องศาเซลเซียส 13
5. ผลของวัสดุที่ใช้บรรจุกล้าเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR860 (a) และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 (b) ที่อุณหภูมิห้องเย็น 15
6. แสดงตัวอย่างของปลาที่ตกแต่งแล้วก่อนนำไปผลิตเป็นปลาส้ม 28
7. ส่วนผสมต่าง ๆ ในการผลิตปลาส้ม 28
8. ส่วนผสมและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตปลาส้ม 28
9. แสดงการเปรียบเทียบปลาส้มทั้ง 3 สูตร 29
10. แสดงการเปรียบเทียบชนิดของปลาส้มแบบก่อนทอดและหลังทอด สูตรที่ 1 29
11. แสดงการเปรียบเทียบชนิดของปลาส้มแบบก่อนทอดและหลังทอด สูตรที่ 2 29
12. แสดงการเปรียบเทียบชนิดของปลาส้มแบบก่อนทอดและหลังทอด สูตรที่ 3 30
13. เปรียบเทียบลักษณะของส่วนผสมที่ได้หลังจากการหมักปลาส้ม ของสูตรที่ 1, สูตรที่ 2 และสูตรที่ 3 30
14. ตัวอย่างเชื้อบริสุทธิ์ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 30
15. ตัวอย่างเชื้อบริสุทธิ์ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 31
16. ตัวอย่างเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 ที่นำมาถ่ายเชื้อลงใน MRS agar slant และตัวอย่างเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 ที่นำมาถ่ายเชื้อลงใน MRS agar slant 31
17. แสดงวัสดุที่ใช้ในการบรรจุกล้าเชื้อ ทั้ง 2 ชนิด 31

บทนำ

ปลาส้มเป็นผลิตภัณฑ์จากเนื้อปลาที่นำมาหมักด้วยเกลือและคาร์โบไฮเดรตเพื่อให้เกิดกลิ่นรส ลักษณะเนื้อสัมผัสตามที่ต้องการอีกทั้งยังเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมักแบบดั้งเดิมของไทยที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, ภาคเหนือ มีลักษณะการผลิตเป็นแบบอุตสาหกรรมในครัวเรือนซึ่งเป็นการหมักที่อาศัยการหมักแบบธรรมชาติทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ วิลาวัณย์ และอุบลวรรณ(2540) และผู้บริโภคอาจรับประทานโดยไม่มีการผ่านความร้อนจึงทำให้เสี่ยงต่อการติดเชื้อก่อโรคจากอาหาร อาหารที่หมักตามธรรมชาตินั้นในระยะเริ่มต้นปริมาณของเชื้อในการหมักตามธรรมชาติอาจจะยังไม่เพียงพอที่จะทำให้การหมักเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ทำให้เชื้อที่ทำให้เกิดโรคสามารถเจริญเติบโตและสร้างสารพิษได้ซึ่งเป็นปัญหาที่พบได้ในประเทศที่กำลังพัฒนารวมทั้งประเทศไทยก็เป็นอีกประเทศที่มักจะพบว่าเกิดโรคอาหารเป็นพิษและโรคท้องร่วงซึ่งเกิดจากแบคทีเรียที่ก่อโรค ได้แก่ *Staphylococcus aureus* , *Salmonella typhimurium* และ *Escherichia coli*

ผู้บริโภคอาหารได้ให้ความสำคัญและหันมาสนใจเกี่ยวกับความปลอดภัยในการบริโภคอาหารกันมากขึ้นรวมทั้งความปลอดภัยในจากเชื้อก่อโรคและสารเคมีที่ใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร (chemical preservatives)ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาหาทางป้องกันเชื้อก่อโรคและหาสารกันเสียในธรรมชาติ (natural biopreservatives) มาทดแทน แนวทางหนึ่งที่ได้รับความสนใจและเริ่มมีการศึกษากันคือ การใช้สารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตอาหารหมัก คือ แบคทีเรียแลกติกซึ่งสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดอินทรีย์และสารพวกแบคเทอริโอซิน วิลาวัณย์(2543) และแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่แยกได้จากอาหารหมักและยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* , *L. brevis* , และ *L. bavaricus* วิลาวัณย์ และอุบลวรรณ (2540); ปาริชาติ,พงศ์ศักดิ์ และยุภารัตน์ (2543)

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์โดยใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสมลงในผลิตภัณฑ์เพื่อพัฒนาคุณภาพผลิตภัณฑ์ให้ดีสม่ำเสมอในแง่ลักษณะเนื้อสัมผัสและลักษณะสีที่ปรากฏของผลิตภัณฑ์ แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงปริมาณและอัตราการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของกล้าเชื้อที่ใส่ลงในผลิตภัณฑ์ จึงได้ทำการศึกษาการทำปลาส้มโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 ในการทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอายุ สิ่งแวดล้อม ที่เหมาะสมในการเจริญของกล้าเชื้อเพื่อลดระยะเวลาการหมักในการผลิตปลาส้มและผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพเป็นที่ยอมรับโดยทั่ว

ระเบียบวิธีการวิจัย

วัสดุ

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตกล้าเชื้อผง ได้แก่ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423
2. ตัวพยุง (supporting materials)
   - 2.1 แป้งข้าวเจ้า ตราช้างสามเศียร
   - 2.2 แป้งข้าวเหนียว ตราช้างสามเศียร
   - 2.3 แป้งผสม ระหว่างแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวเหนียวในอัตราส่วน 3:1
3. วัสดุที่ใช้บรรจุกล้าเชื้อผง
   - 3.1 ถุงโพลีโพรพีลีน ชนิดทนร้อน
   - 3.2 ถุงโพลีเอธิลีนฉาบด้วยอลูมิเนียมฟอยล์
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

   อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สำหรับตรวจหาเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423

   อาหารเลี้ยงเชื้อ GYP สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423
5. ส่วนประกอบและเครื่องปรุงสำหรับการผลิตปลาส้ม ดังภาคผนวก ข หิรัญ (2544)

5.1 ปลา	1000 กรัม
5.2 กระเทียมสับ	33 กรัม
5.3 เกลือ	100 กรัม
5.4 ข้าวเหนียวนึ่ง	160 กรัม
5.5 ข้าวเจ้าสุก	80 กรัม
5.6 ข้าวคั่ว	80 กรัม

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา ประกอบด้วย
   - 1.1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
   - 1.2 เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter)

1.3 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

1.4 ตู้อบอากาศร้อน (Hot air oven)

2. อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี เกรดวิเคราะห์

วิธีการดำเนินการ

1. **การผลิตกล้าเชื้อผง**

1.1 การหาระยะการเจริญของเชื้อ

การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860และ *Pedicoccus pentosaceus* TISTR 423 จากหลอดอาหารแข็ง MRS ลงในหลอดอาหารเหลว GYP ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง

1.2 การเพาะเลี้ยง

ถ่ายเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860และ *Pedicoccus pentosaceus* TISTR 423 ร้อยละ 3 ลงใน อาหารเหลวปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง สุ่มตัวอย่างเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pedicoccus pentosaceus* TISTR 423 ที่เวลา 0 3 6 9 12 15 18 21 24 และ 30 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ การเจริญเติบของเชื้อโดยการวัดความขุ่นในรูปของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร และพีเอช โดยใช้พีเอชมิเตอร์

2. ผลของการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้เตรียมกล้าเชื้อผงและอุณหภูมิการเก็บรักษาต่อการรอดชีวิตของกล้าเชื้อผง

เตรียมเชื้อและการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับข้อ 1.1 ผลิตกล้าเชื้อผง แต่ละชนิดโดยใช้วิธีการของ ศุภศิลป์ มณีรัตน์ (2541) เก็บเซลล์ที่อยู่ในระยะ mid - log late - log และ Stationary ที่หาได้จาก 1.1 เหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 2500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยสารละลายน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร 1 ครั้ง แล้วเติมสารละลายน้ำเกลือร้อยละ 0.85 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรทำให้เป็นซัสเพนชั่นของเชื้อ แล้วคลุกกับแป้งข้าวเจ้า (ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ที่บรรจุในถุงโพลีโพรพิลีน โดยใช้ซัสเพนชั่นของเชื้อ 1 มิลลิลิตรต่อแป้งข้าวเจ้า 20 กรัม ปิดปากถุงด้วยเครื่องปิดปากถุงแล้วคลุกแป้งข้าวเจ้ากับเชื้อให้เข้ากันทุกส่วน เก็บกล้าเชื้อผงที่ได้ไว้ที่

อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิห้องเย็น (4 องศาเซลเซียส) นับจำนวนเชื้อทั้งหมดก่อนและหลังการคลุกกับแป้งข้าวเจ้าโดยเจือจางซัสเพนชั่นของเชื้อและตัวอย่างแป้งที่คลุกกับซัสเพนชั่นของเชื้อแล้วให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้วนับจำนวนเชื้อด้วยวิธีการ pour plate ในอาหาร MRS บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง หาปริมาณความชื้นหลังคลุกแป้งข้าวเจ้า สุ่มตัวอย่างกล้าเชื้อทุก 5 วัน เพื่อตรวจหาจำนวนเชื้อทั้งหมดและปริมาณความชื้นในขณะเก็บรักษา

3. **ผลของตัวพยุงต่อการรอดชีวิตของกล้าเชื้อผงในขณะเก็บรักษา**

เลือกอายุของกล้าเชื้อแต่ละชนิดที่มีการรอดชีวิตมากที่สุดจากข้อ 1.1 มาผลิตกล้าเชื้อผงแต่ละวิธีตามวิธีการในข้อ 2 โดยใช้ตัวพยุง 3 ชนิด คือ แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวเจ้าต่อแป้งข้าวเหนียว ในอัตราส่วน 3:1 เก็บกล้าเชื้อผงที่ได้และตรวจสอบเช่นเดียวกับข้อ 2 ทุก 10 วันเป็นเวลา 60 วัน คัดเลือกตัวพยุงที่มีการรอดชีวิตมากที่สุด ใช้ในการทดลองต่อไป

4. **ผลของความชื้นต่อการรอดชีวิตของกล้าเชื้อผงในขณะเก็บรักษา**

เลือกตัวพยุงที่มีการรอดชีวิตของกล้าเชื้อมากที่สุดจากข้อ 3 มาผลิตกล้าเชื้อ โดยตัวพยุงที่ใช้จะฆ่าเชื้อแตกต่างกัน 2 วิธี คือ การนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 30 นาที และการอบแห้งด้วยตู้อบอากาศร้อน 180 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ควบคุมจำนวนเชื้อเริ่มต้นโดยใช้สารละลายน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ทำให้เป็นซัสเพนชั่นของสารละลายเชื้อ แล้วใช้ซัสเพนชั่นของเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร คลุกกับตัวพยุง 20 กรัม เก็บกล้าเชื้อผงที่ได้และตรวจสอบความชื้น เช่นเดียวกับข้อ 2 ทุก 10 วัน เป็นเวลา 60 วัน

5. **ผลของวัสดุสำหรับบรรจุกล้าเชื้อผงและวิธีการปิดผนึกกล้าเชื้อผงต่อการรอดชีวิตของกล้าเชื้อผงในขณะเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ**

ผลิตกล้าเชื้อผงตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4 แล้ว บรรจุถุงโพลีโพรพีลีนชนิดทนร้อนและถุงโพลีเอธิลีนฉาบด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ ปิดปากถุงด้วยเครื่องปิดปากถุงแบบธรรมดา เก็บกล้าเชื้อผงที่ผลิตได้ที่อุณหภูมิห้องเย็น (4 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้อง สุ่มตัวอย่างทุก 10 วัน ตรวจสอบเช่นเดียวกับข้อ 2 ทุก 10 วัน เป็นเวลา 60 วัน คัดเลือกวัสดุสำหรับทำกล้าเชื้อผงและวิธีการปิดผนึกกล้าเชื้อผงรอดชีวิตที่ดีที่สุดใช้ในการทดลองต่อไป

6. **เปรียบเทียบปลาส้มที่ผลิตโดยใช้กล้าเชื้อผงและกล้าเชื้อสดกับปลาส้มที่ผลิตตามวิธีดั้งเดิม**

ชุดทดลองแบ่งเป็น 3 ชุด กล่าวคือ

ชุดทดลองที่ 1 ใช้กล้าเชื้อผงที่มีการรอดชีวิตมากที่สุดจากข้อ 1

ชุดทดลองที่ 2 ใช้กล้าเชื้อสดจากข้อ 1

ชุดทดลองที่ 3 ปลาส้มทำการหมักด้วยวิธีดั้งเดิม คือไม่มีการใส่กล้าเชื้อ

ทำการหมักปลาส้มเป็นเวลา 3 วัน วิเคราะห์ปลาส้มที่เวลาเริ่มต้นและวันที่ 2 โดยวิเคราะห์พีเอชและปริมาณกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลกติกและทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้ทดสอบชิมที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 20 คนโดยวิธีเชิงพรรณาเชิงปริมาณ (Qualtative Discription Analysis) ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เพื่อหาความแตกต่างระหว่างชุดทดลองคัดเลือกสูตรที่ดีที่สุดไปทำการตรวจคุณค่าทางโภชนาการ

สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาอุตสาหกรรมประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล อำเภอสิเกา จังหวัด ตรัง

ระยะเวลาในการดำเนินการ

ตั้งแต่เดือน มีนาคม 2544 สิ้นสุด มีนาคม 2545

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการเจริญของแบคทีเรีย

เมื่อเลี้ยง *Lactobacillus brevis* TISTR 860 ในอาหารเหลว GYP พบว่า *Lactobacillus brevis* TISTR 860 เจริญขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 9 ของการเจริญ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มช้าลง โดยมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 21 ชั่วโมง โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เท่ากับ1.46 (ดังรูปที่ 1)และในระหว่างการเจริญของ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างรวดเร็วใน 9 ชั่วโมงแรกของการเจริญ โดยมีค่าลดลงจาก 5.87 เป็น 4.45 ต่อจากนั้นพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะค่อย ๆ ลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการเจริญที่เวลา 30 ชั่วโมง มีค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.45(ดังรูปที่ 1) โดยจะมีค่าความเป็นกรดที่เกิดขึ้นจะมีค่าเพิ่มขึ้นมากในชั่วโมงที่ 15 ของการเจริญ ต่อจากนั้นพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะค่อย ๆ ลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการเจริญที่เวลา 30 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 1จะพบว่า *Lactobacillus brevis* TISTR 860 จะพิจารณาได้ว่า ในชั่วโมงที่ 9 (mid - log) จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เป็น 0.982และค่าพีเอช 5.14 ส่วนชั่วโมงที่ 18 (late - log)จะมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.391 และค่าพีเอช 4.60 และชั่วโมงที่ 21 (stationary) จะมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.45และค่าพีเอช 4.59 ซึ่งให้ผลการทดลองใกล้เคียงกันกับผลการทดลองของ ศุภศิลป์ (2541)

เมื่อเลี้ยง *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 ในอาหารเหลว GYP พบว่า Pediococcus *pentosaceus* TISTR 423 เจริญขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 9 ของการเจริญ โดยมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 21 ชั่วโมงแรกของการเจริญเติบโตและมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรเท่ากับ 1.42 (ดังรูปที่ 1) และในระหว่างการเจริญของ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างรวดเร็วใน 9 ชั่วโมงแรกของการเจริญ โดยมีค่าลดลงจาก 6.15 เป็น 4.56 ต่อจากนั้นพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะค่อย ๆ ลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการเจริญที่เวลา 30 ชั่วโมง จากกราฟจะพิจารณาได้ว่า ในชั่วโมงที่ 9 (mid – log) จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เท่ากับ 0.600และค่าพีเอช 5.55 ส่วนชั่วโมงที่ 18 (late - log)จะมีค่าการดูดกลืนแสงเป็น 1.300 และค่าพีเอช 4.8 และชั่วโมงที่ 21 (stationary) จะมีค่าการดูดกลืนแสง 1.421และค่าพีเอช 4.75 ซึ่งให้ผลการทดลองใกล้เคียงกันกับผลการทดลองของ ศุภศิลป์ (2541) มีค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.56 โดยปริมาณกรดที่เกิดขึ้นจะมีค่าเพิ่มขึ้นมากในช่วง 15 ชั่วโมงแรกของการเจริญ

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 จะพบว่า *Lactobacillus brevis* TISTR 860 จะมีการเจริญสูงสุด รองลงมาก็คือ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 (ดังรูปที่ 1) เมื่อพิจารณาค่าการเปลี่ยนแปลงของพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว GYP พบว่า *Lactobacillus brevis* TISTR 860 ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นได้อย่างรวดเร็วในช่วงแรกและจะเริ่มลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 21 ส่วน *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 ค่าของการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นได้อย่างรวดเร็วในช่วงแรกและจะเริ่มเจริญลดลงในชั่วโมงที่ 21 ซึ่งจะถือเป็นข้อดีในการนำไปใช้ในการทำเป็นกล้าเชื้อในการผลิตปลาส้ม ซึ่งจัดเป็นความสามารถในการผลิตกรดแลกติกให้มากขึ้น โดยในช่วงแรกจะอาศัยการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และในช่วงหลังจะอาศัยการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 ทำให้สอดคล้องกันกับการผลิตแหนมที่วิลาวัลย์ (2526) กล่าวว่า *Pediococcus* จะเจริญอย่างรวดเร็วในระยะแรกของการหมักแหนมและสร้างกรดแลกติกขึ้น ส่วน *Lactobacillus* จะเจริญขึ้นอย่างช้า ๆ ในระยะแรก หลังจากการหมัก 3 วัน *Pediococcus* ซึ่งทนกรดได้ไม่มากนักจะเติบโตช้าลงและหยุดเติบโตในที่สุด ในระยะนี้ *Lactobacillus* จะเติบโตและสร้างกรดต่อไปเนื่องจาก *Lactobacillus*จะมีความต้านทานกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียแลกติกชนิดอื่น ๆ และมักมีบทบาทสำคัญในช่วงท้ายของการหมัก

2. **การเพาะเลี้ยง**

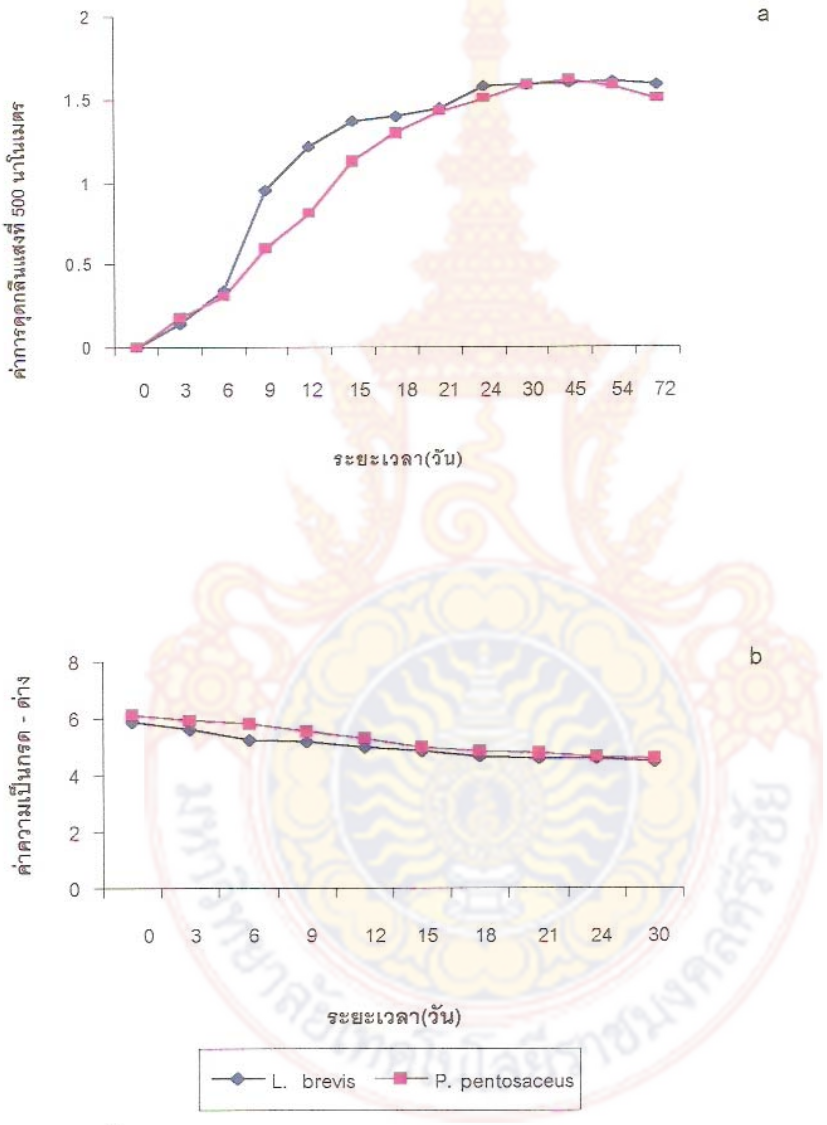
การเตรียมกล้าเชื้อโดยใช้แบคทีเรียที่มีระยะการเจริญในระยะการเจริญต่างๆ กัน ในช่วงระยะ mid - log (9 ชั่วโมง) late - log (18 ชั่วโมง) และ stationary (21 ชั่วโมง) เริ่มตั้งแต่ (0 ชั่วโมง) จนถึงระยะสุดท้ายที่ 30 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บกล้าเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิห้องเย็น(4 องศาเซลเซียส) พบว่าระยะการเจริญและอุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลต่อการรอดชีวิตของกล้าเชื้อที่เตรียมจาก *Lactobacillus brevis* TISTR 860 ซึ่งเจริญอยู่ในระยะ mid - log มีค่าของการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.982 late - log มีค่าของการดูดกลืนแสงเท่ากับ1.351 และ stationary มีค่าของการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.450มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ $7.73x10^3$ โคโลนีต่อกรัม เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน ตรวจไม่พบการรอดชีวิตของกล้าเชื้อ เมื่อใช้เชื้อที่เจริญอยู่ในระยะ mid - log late - log เมื่อใช้เชื้อที่อยู่ในระยะ stationary มีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตประมาณ $0.6x10^3$ โคโลนีต่อกรัม แต่เมื่อเก็บกล้าเชื้อเหล่านี้ที่อุณหภูมิห้องเย็นเป็นเวลา 20 วัน พบว่ามีเชื้อรอดชีวิตมากกว่า โดยมีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตประมาณ $2.33x10^3$ โคโลนีต่อกรัม (ดังรูปที่ 2) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระยะการเจริญและอุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลต่อการรอดชีวิตของกล้าเชื้อของกล้าเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 โดยอุณหภูมิในการเก็บ

รักษามีอิทธิพลต่อการรอดชีวิตของกล้าเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 มากกว่าระยะการเจริญ ปริมาณความชื้นเริ่มต้นของกล้าเชื้อมีค่าร้อยละ 15 และมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา

การเตรียมกล้าเชื้อจากเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 ที่มีระยะการเจริญในช่วง ระยะ mid - log (ที่ 9 ชั่วโมง) มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.600 late - log (ที่ 18 ชั่วโมง) มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.300และ stationary (ที่ 21 ชั่วโมง)มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.421 เริ่มตั้งแต่ (0 ชั่วโมง) จนถึงระยะสุดท้าย (30 ชั่วโมง) แล้วทำการเก็บกล้าเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิห้องเย็น (4 องศาเซลเซียส) พบว่าระยะการเจริญและอุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลต่อการรอดชีวิตของกล้าเชื้อที่เตรียมจาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 ซึ่งเจริญอยู่ในระยะ mid - log late - log และ stationary มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น ประมาณ $8.67x10^3$ โคโลนีต่อกรัม เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน ตรวจไม่พบการรอดชีวิตของกล้าเชื้อ เมื่อใช้เชื้อที่เจริญอยู่ในระยะ mid - log late - log เมื่อใช้เชื้อที่อยู่ในระยะ stationary มีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตประมาณ $0.4x10^3$ โคโลนีต่อกรัม แต่เมื่อเก็บกล้าเชื้อเหล่านี้ที่อุณหภูมิห้องเย็นเป็นเวลา 15 วัน พบว่ามีเชื้อรอดชีวิตมากกว่า โดยมีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตประมาณ $0.7x10^3$ โคโลนีต่อกรัม (รูปที่ 2) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระยะการเจริญและอุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลต่อการรอดชีวิตของกล้าเชื้อของกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 โดยอุณหภูมิในการเก็บรักษามีอิทธิพลต่อการรอดชีวิตของกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 มากกว่าระยะการเจริญ ปริมาณความชื้นเริ่มต้นของกล้าเชื้อมีค่าร้อยละ 15 และมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา จากผลการทดลองจะแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่อยู่ในช่วง stationary มีการรอดชีวิตสูงกว่าแบคทีเรียที่อยู่ในช่วง late - log และ mid - log ตามลำดับ ซึ่งโดยปกติแบคทีเรียเหล่านี้จะสามารถต้านทานต่อสภาวะการทำแห้งได้ดีที่สุดที่ระยะ stationary

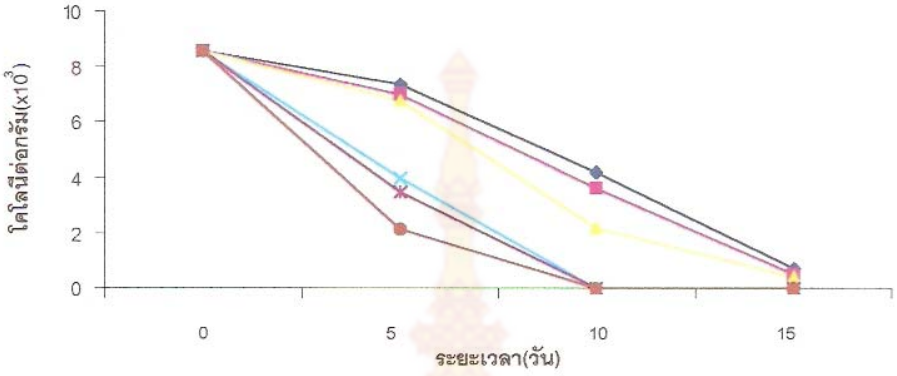
อุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลต่อการรอดชีวิตของกล้าเชื้อทั้ง 2 ชนิด โดยแบคทีเรียชนิดเดียวกันและมีการเจริญอยู่ในระยะเดียวกันแต่เมื่อเก็บรักษากล้าเชื้อที่อุณหภูมิห้องเย็นมีการรอดชีวิตของกล้าเชื้อมากกว่าการเก็บรักษากล้าเชื้อที่อุณหภูมิห้องในกล้าเชื้อทุกชนิดและทุกระยะของการเจริญ การเก็บรักษากล้าเชื้อที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยทำให้กล้าเชื้อมีอายุการเก็บรักษานานขึ้นชนิดของแบคทีเรียก็มีอิทธิพลต่อการรอดชีวิตของกล้าเชื้อและจากการทดลองจะพบว่าเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 จะมีค่าการดูดกลืนแสงในชั่วโมงที่ 21 สูงสุด เท่ากับ 1.444 และ 1. 421 ตามลำดับแสดงว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตในปริมาณมาก และสังเกตได้จากพีเอชที่ลดลง (ดังรูปที่ 2)

ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 ที่เจริญเติบโตในชั่วโมงที่ 21 มาทดลองในขั้นตอนต่อไป

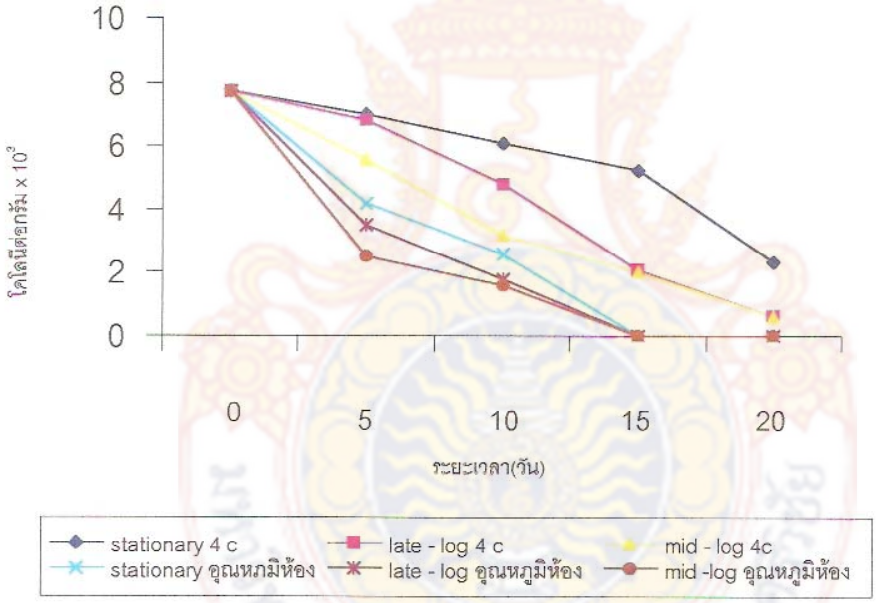


รูปที่ 1 การเจริญ (a) การเปลี่ยนแปลง pH (b) ของแบคทีเรียใช้ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 ที่อุณหภูมิห้อง

a



b



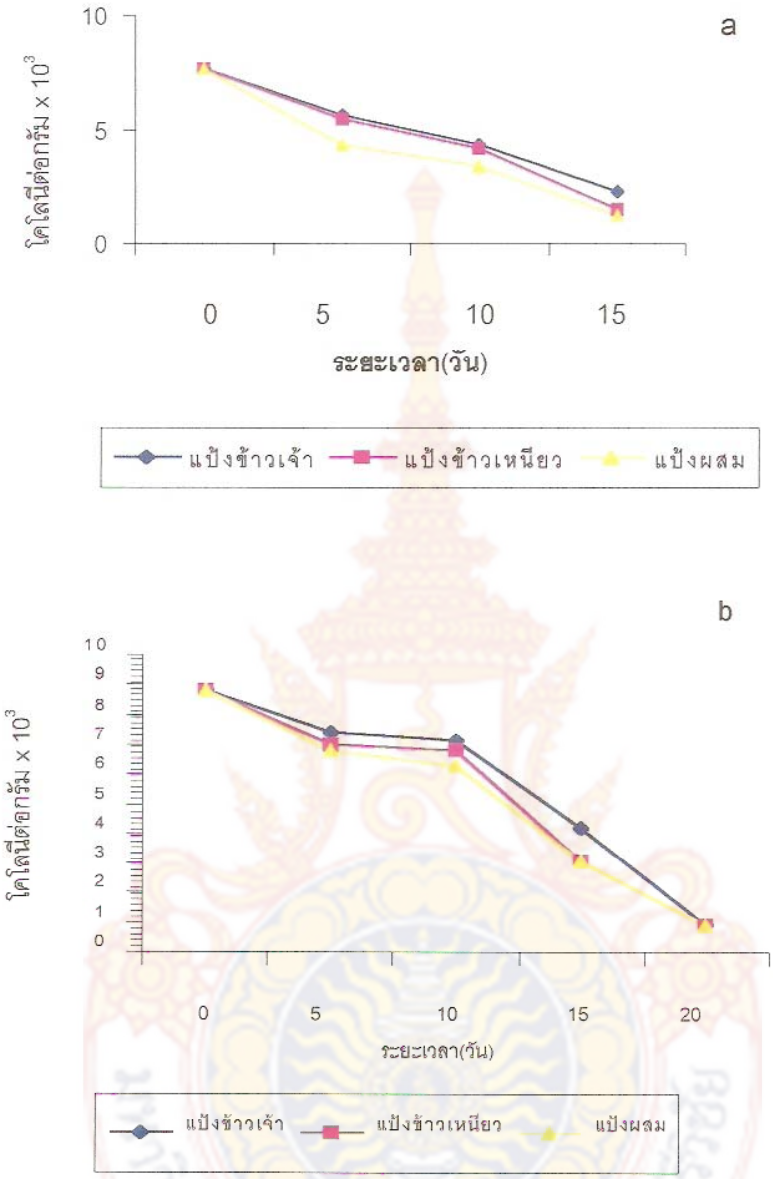
รูปที่ 2 ผลของระยะการเจริญและอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423

3. **ผลของตัวพยุงต่อการรอดชีวิตของกล้าเชื้อในขณะเก็บรักษา**

การเตรียมกล้าเชื้อโดยใช้ตัวพยุงที่แตกต่างกัน คือ แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว และแป้งข้าวเจ้าผสมกับแป้งข้าวเหนียวในอัตราส่วน 3:1 ของ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 โดยกล้าเชื้อที่เตรียมจาก *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นที่ประมาณ $7.7x10^3$ โคโลนีต่อกรัมและ $8.8x10^3$ โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับและเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องเย็นเป็นเวลา 20 วัน พบว่ามีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตประมาณ $0.9x10^3$ โคโลนีต่อกรัม (ดังรูปที่ 3)

ดังนั้นจากการผลทดลองจึงเลือกใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นตัวพยุงสำหรับผลิตกล้าเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 ในการทดลองครั้งต่อไป เนื่องจากแป้งข้าวเจ้าราคาถูกกว่าแป้งข้าวเหนียวโดยที่แป้งข้าวเจ้าราคากิโลกรัมละ 18 บาท ส่วนแป้งข้าวเหนียวราคากิโลกรัมละ 19 บาท และในขณะที่แป้งผสมมีความยุ่งยากในการเตรียมและปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อที่ใส่ลงในตัวพยุงทั้ง 3 ชนิด จะมีอัตราการรอดในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน (ดังรูปที่ 3)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

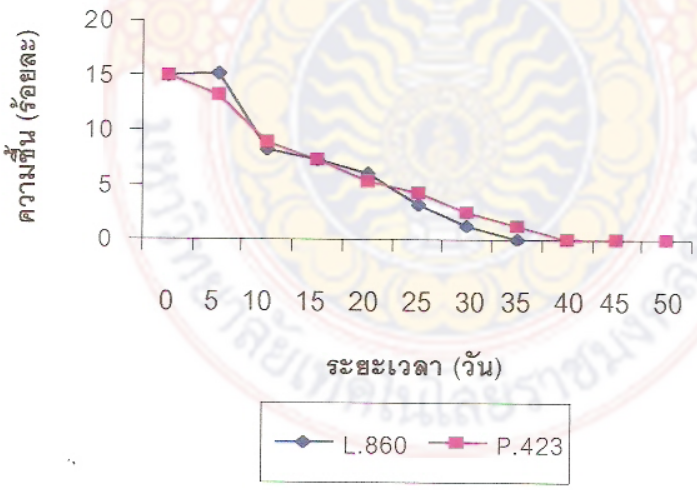


รูปที่ 3 ผลของตัวพยุงต่อการรอดชีวิตของกล้าเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 (a) และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 (b) ที่อุณหภูมิห้อง

3. ผลของความชื้นต่อการรอดชีวิตของกล้าเชื้อในขณะเก็บรักษา

วิธีการเตรียมตัวพยุง คือ นำแป้งข้าวเจ้ามาทำให้ปลอดเชื้อได้ 2 วิธี คือ นำแป้งไปอบในตู้อบอากาศร้อนที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง หรือนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที และนำกล้าเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus* TISTR 423 ใส่ลงไป พบว่าปริมาณความชื้นเริ่มต้นของกล้าเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 มีร้อยละ 15 มีจำนวนกล้าเชื้อที่ประมาณ 7.8×10^3 โคโลนีต่อกรัม เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องจะพบว่าปริมาณความชื้นจะค่อย ๆ ลดลง ส่วนกล้าเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเย็น จะมีปริมาณความชื้นในระยะแรก ๆ เพิ่มปริมาณขึ้นและค่อย ๆ ลดจำนวนลงในที่สุด (ดังรูปที่ 4) ปริมาณความชื้นของกล้าเชื้อจะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา

ส่วนปริมาณความชื้นเริ่มต้นของกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 มี ร้อยละ 15 มีจำนวนกล้าเชื้อที่ประมาณ 8.8×10^3 โคโลนีต่อกรัม เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องจะพบว่าปริมาณความชื้นจะค่อย ๆ ลดลง ส่วนกล้าเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเย็น จะมีปริมาณความชื้นในระยะแรก ๆ เพิ่มปริมาณขึ้นและค่อย ๆลดจำนวนลงในที่สุด (ดังรูปที่ 4) ปริมาณความชื้นของกล้าเชื้อจะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา

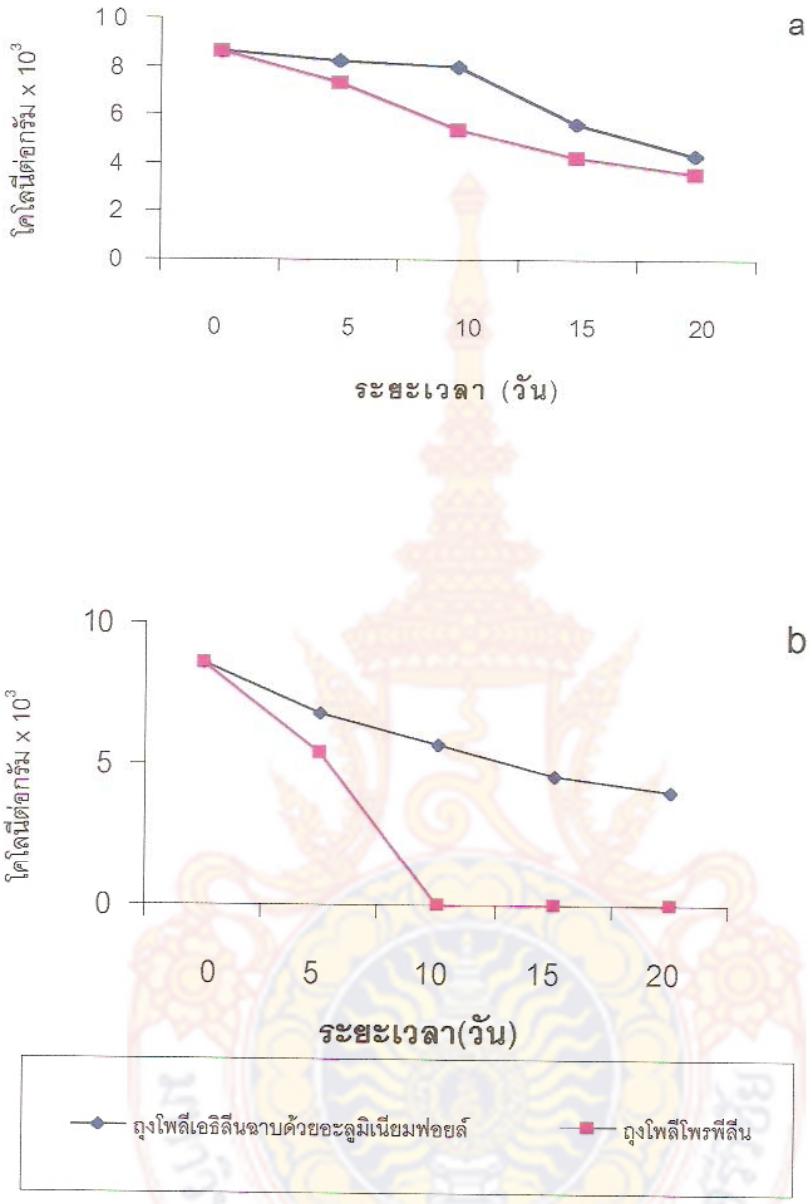


รูปที่ 4 ผลของความชื้นในขณะเก็บรักษาของกล้าเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 (a) และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 (b) ที่อุณหภูมิห้องเย็น 4 องศาเซลเซียส

4. **ผลของวัสดุสำหรับบรรจุกล้าเชื้อและวิธีการปิดผนึกกล้าเชื้อต่อการรอดชีวิต**

ผลของวัสดุที่ใช้บรรจุกล้าเชื้อและอุณหภูมิในการเก็บรักษากล้าเชื้อต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 โดยนำเชื้อที่ได้จากข้อ 1 (ที่ 21 ชั่วโมง)นำมาผสมกับตัวพยุงที่เลือกได้จากข้อ 2 (แป้งข้าวเจ้า) จึงนำไปบรรจุในถุงโพลีเอธิลีนฉาบด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์และถุงโพลีโพรพิลีน ในขณะที่อุณหภูมิในการเก็บรักษามีอิทธิพลอย่างมากต่อการรอดชีวิตของกล้าเชื้อผง *Lactobacillus brevis* TISTR 860โดยกล้าเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น $8.6x10^3$ โคโลนีต่อกรัม เมื่อบรรจุกล้าเชื้อผง *Lactobacillus brevis* TISTR 860ในถุงโพลีเอธิลีนฉาบด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์และถุงโพลีโพรพีลีนแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องพบว่า มีจำนวนเชื้อลดลง *Lactobacillus brevis* TISTR 860ภายในระยะเวลา 10 วัน เป็น $5.4x\ 10^3$ โคโลนีต่อกรัม และในวันที่ 20 ตรวจไม่พบเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860ในกล้าเชื้อที่บรรจุในถุงทั้ง 2 ชนิด(ดังรูปที่ 5)แต่เมื่อบรรจุกล้าเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860ในถุงทั้ง สองชนิดแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเย็นเป็นเวลา 20 วัน พบว่าจำนวนเชื้อในวันที่ 20 ลดลงเหลือ $4.3\ x10^3$ โคโลนีต่อกรัม

การศึกษาผลของวัสดุที่ใช้ในการเก็บรักษากล้าเชื้อผง *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 พบว่าวัสดุที่ใช้บรรจุ คือ ถุงโพลีเอธิลีนฉาบด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์และถุงโพลีโพรพีลีนไม่มีผลต่อการรอดชีวิตในขณะที่ปัจจัยที่มีอิทธิพลอย่างสูงต่อการรอดชีวิตของกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษา โดยพบว่ากล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 มีจำนวนเริ่มต้น $8.6x10^3$ โคโลนีต่อกรัม เมื่อเก็บกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 ไว้ในถุงโพลีเอธิลีนฉาบด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์และถุงโพลีโพรพีลีนแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วันพบว่า ไม่สามารถตรวจพบการเจริญเติบโตแต่ถ้านำถุงทั้งสองชนิดไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเย็นเป็นเวลา 20 วัน พบว่าจำนวนเชื้อในวันที่ 20 ลดลงเหลือ $4.0\ x10^3$ โคโลนีต่อกรัม



รูปที่ 5 ผลของวัสดุที่ใช้บรรจุกล้าเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 (a) และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 (b) ที่อุณหภูมิห้องเย็น

5. เปรียบเทียบปลาส้มที่ผลิตโดยใช้กล้าเชื้อผงและกล้าเชื้อสดกับปลาส้มที่ผลิตตามวิธีดั้งเดิม

ตารางที่ 2 คะแนนความชอบเฉลี่ยของปลาส้มที่มีสูตรต่างชนิดกันทั้ง 3 สูตร

ชุดการทดลอง	คะแนนความชอบ				
ที่	สี	กลิ่น	รสชาติ	ลักษณะปรากฏ	ความชอบรวม
1	7.41[a]	2.03[a]	7.52[a]	6.33[a]	6.75[c]
2	7.91[a]	2.02[a]	8.00[a]	8.25[a]	8.58[a]
3	7.41[a]	5.91[b]	6.52[b]	7.75[b]	7.23[b]

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกันในแต่ละสดมภ์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

จากตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่าชุดการทดลองที่ 2 คือกล้าเชื้อผง (แป้งข้าวเจ้า) มีลักษณะปรากฏและความชอบรวมของปลาส้มอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) โดยมีคะแนนความชอบสูงกว่าระดับอื่นอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

ตารางที่ 3 คุณค่าทางโภชนาการของปลาส้มที่ได้จากการวิเคราะห์

สูตรที่	ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์				
	โปรตีน	ไขมัน	ความชื้น	เถ้า	เยื่อใย
1	20.11	1.66	69.58	2.31	0.09
2	18.90	0.76	77.81	2.53	0.05
3	19.34	0.74	70.94	2.31	0.04

สูตรที่ให้คุณค่าทางโปรตีน และไขมันมากที่สุด คือ สูตรที่ 1 ซึ่งเป็นสูตรดั้งเดิม รองลงมา คือ สูตรที่ 3 ซึ่งเป็นสูตรเชื้อสด และสุดท้าย คือ สูตรที่ 2

เนื่องจากสูตรที่ 1 เป็นสูตรดั้งเดิมซึ่งได้จากการหมักตามธรรมชาติ ซึ่งใช้ระยะเวลาในการหมักด้วยระยะเวลานานกว่าสูตรอื่นเพราะไม่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียแลคติกจึงทำให้โปรตีนและไขมันมีมากกว่าสูตรอื่น ๆ

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการเจริญของ *Lacctobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 ซึ่งใช้เตรียมกล้าเชื้อสำหรับผลิตปลาส้มพบว่า *L. brevis* TISTR 860 และ *P. pentosaceus* TISTR 423 จะเข้าสู่ระยะ mid- log late- log และ stationary ที่เวลา 9 ,18 และ 21 ชั่วโมง ตามลำดับและมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตรเท่ากับ1.46 และ 1.42 ตามลำดับ

เมื่อน้ำเชื้อ *L. brevis* TISTR 860 และ *P. pentosaceus* TISTR 423 ที่เจริญในระยะต่าง ๆ มาเตรียมกล้าเชื้อผงโดยนำซัสเพนชั่นของเซลล์ที่ได้จากการเหวี่ยงแยกเซลล์แล้วนำมาผสมกับแป้งข้าวเจ้าในอัตราส่วน 1:20 โดยมีจำนวนเชื้อเริ่มต้นที่ $7.7x\ 10^3$ โคโลนีต่อกรัมและ $8.67x10^3$ โคโลนีต่อกรัม ที่เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 วันมีจำนวนเชื้อรอดชีวิตไม่แตกต่างกันและได้ทำการเลือกตัวพยุงที่เหมาะสมคือ แป้งข้าวเจ้า

ปริมาณความชื้นของกล้าเชื้อ *L. brevis* TISTR 860 และ *P. pentosaceus* TISTR 423 มีปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 15 ปริมาณความชื้นจะขึ้นกับอุณหภูมิที่ทำการเก็บรักษา เมื่อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสปริมาณความชื้นจะค่อย ๆ ลดลงจนเท่ากับ 0 ในวันที่ 30

กล้าเชื้อ *L. brevis* TISTR 860 และ *P. pentosaceus* TISTR 423 ที่บรรจุในถุงโพลีเอธิลีนฉาบด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์และถุงโพลีโพรพีลีนและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วันพบว่ามีจำนวนเชื้อรอดชีวิตไม่แตกต่างกัน คือ $4.3x10^3$ โคโลนีต่อกรัมและ $4.0\ x10^3$ โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ กล้าเชื้อที่เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสมีการรอดชีวิตมากกว่าที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การเปรียบเทียบปลาส้มที่ผลิตโดยใช้กล้าเชื้อผง กล้าเชื้อสดกับปลาส้มที่ผลิตแบบสูตรดั้งเดิมพบว่าผู้ทดสอบชิมให้คะแนน สี กลิ่น รสชาติ ความเปรี้ยวและความชอบโดยรวมของปลาส้มที่ผลิตโดยใช้กล้าเชื้อสดและกล้าเชื้อผงมากกว่าปลาส้มที่ผลิตแบบดั้งเดิมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์ปลาส้ม พบว่ามีปริมาณคิดเป็น (ร้อยละ) โปรตีน 18.90 ไขมัน 0.76 ความชื้น 77.81 เถ้า 2.53 และเยื่อใย 0.05

ข้อเสนอแนะ

1. ในการผลิตปลาส้มควรจะทำการศึกษาองค์ประกอบของส่วนผสมโดยการทำแห้งส่วนผสมที่ใช้
2. ในการปิดผนึกถุงควรปิดให้สนิทอย่าให้มีการรั่ว
3. ในการผลิตปลาส้มควรจะมีการคิดต้นทุนและจุดคุ้มทุนในการผลิตด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

เอกสารอ้างอิง

ทองคำ คิมหะมานนท์. 2538. การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการผลิตปลาหมัก (ส้มฟัก). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีการอาหาร. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปาริชาติ พุ่มขจร ,พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และยุภารัตน์ เครือวงษา. 2543. ความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก. ว. วิทยาศาสตร์ มข. 28(1): 22-33.

พันธ์ณรงค์ จันแสงสี และปราณี อ่านเปรื่อง. 2537. การตรึงรูปร่วมกันของเซลล์จุลินทรีย์สำหรับทดลองผลิตน้ำซีอิ๊ว: ตอนที่ 1 :ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปร่วมกันของเซลล์จุลินทรีย์ในเจลแคลเซียมอัลจิเนต. วท. ม.ธรรมศาสตร์ .3(1): 42-50.

พันธ์ณรงค์ จันแสงสี และปราณี อ่านเปรื่อง. 2540. การตรึงรูปร่วมกันของเซลล์จุลินทรีย์สำหรับทดลองผลิตน้ำซีอิ๊ว: ตอนที่ 2: การผลิตน้ำซีอิ๊วอย่างต่อเนื่องในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเซลล์ตรึงรูปร่วมกัน. วารสาร วท. 6(1) : 24-38.

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2537. การพัฒนาการผลิตแหนมโดยการใช้เทคโนโลยีเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในเอกสารการประชุมวิชาการเทคโนโลยีการพัฒนาภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. คณะเทคโนโลยี ม. ขอนแก่น .

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2543. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทย. ว. สงขลานครินทร์ .22(2) : 177-189.

วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล และอุบลวรรณ รอดประดิษฐ์. 2540. การแยกเชื้อ คัดเชื้อและเทียบเคียงชนิดแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมัก . ว . สงขลานครินทร์ .19(2) : 181-198.

วัฒนา ประทุมสิทธิ์. 2522. การหมักดองในตำราวิชาการถนอมอาหาร. ภาควิชาคหกรรมศาสตร์ คณะศึกษาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์ .

สมพร ตั้นสกุล. 2538. การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์. วารสารวิทยาศาสตร์.172-178.

ศุภศิลป์ มณีรัตน์ . 2541. การเตรียมกล้าเชื้อผงสำหรับการผลิตแหนม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

A.O.A.C. 1990. Official Method of Analysis Association of Official Analytical Chemists 15th ed. Virginia : The Association of Official Analytical Chemists, Inc.1050pp.

Bacus ,J, 1984. Utilization of Microorganisium in Meat Processing .Research Press, Ltd, England.

Gibbs, P.A. 1987. Novel used for lactic acid fermentation in food preservation .J.Appl. Bacteriol. Symposium Supplement, 51-58.

Gilliland, S.E. 1985. Bacterial Starter Cultures for Foods .CRC Press ,Inc, Boca Raton , Florida.

Ludbrook. K.A., C.M. Russell, and R.I Greig. 1997. Exopolysaccharide Production from Lactic acid Bacteria Isolate from Fermented Foods. Journal of Food Science : 62 (3). 597-600.

Oumer. A., Ganrde S., Gaya P., Medina M ., and Nunez M.2001. Journal of Food Protection. 64 (1): 81 – 86.

Rodrigo D., Martinez A., Harte F., Barbosa – Canoves G. V. and Rodrigo M. 2001. Study of Inactivation of *Lactobacillus plantarum* in Orange – Carrot Juice by Means of Pulsed Electric Fields : Comparison of Inactivation Kinetic Models Journal of Food Protection. 64(2) : 259 – 263.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ อาหารทดสอบเชื้อและวิธีการทดสอบ

1. MRS agar

Peptone	10.0	กรัม
Beef extract	8.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
di – Potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
di – ammonium hydrogen citrate	2.0	กรัม
Sodiiium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganese sulfate	0.04	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 52.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 950 มิลลิลิตร ปรับพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.5 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เติม Brom cresol purple ร้อยละ 1.6 จำนวน 1 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

การทดสอบหาการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Lactibacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 โดยจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นจนมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ทำการ pour plate กับตัวอย่างที่เจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นับจำนวน โคโลนีที่มีสีขาวและมีเคลียร์โซนรอบ ๆ โคโลนี

2. GYP

Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Sodium acetate	10.0	มิลลิลิตร
Solution B*	5.0	มิลลิลิตร

น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

SOLUTION B*

Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganese sulfate	10.0	กรัม
Ferus sulfate	10.0	กรัม
Sodium chloride	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ชั่งสารทุกอย่างตามสูตร ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.8 ให้ความร้อนจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อเดือด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ภาคผนวก ข

ส่วนประกอบและเครื่องปรุงในการผลิตปลาส้ม หิรัญ (2544)

1. ส่วนประกอบและเครื่องปรุงในการผลิตปลาส้ม

ปลา	1000	กรัม
เกลือ	33	กรัม
กระเทียม	100	กรัม
ข้าวเจ้าสุก	80	กรัม
ข้าวเหนียว	160	กรัม
ข้าวคั่ว	80	กรัม

เชื้อบริสุทธิ์

Lactobacillus brevis TISTR 860

Pediococcus pentosaceus TISTR 423

2. การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

เลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 ในอาหารเหลว GYP โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง มาเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 2500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยสารละลายเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร 1 ครั้ง แล้วเติมสารละลายน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำให้เป็นซัสเพนชั่นของเชื้อก่อนที่จะนำไปเติมในกระบวนการผลิตปลาส้มจะต้องนับจำนวนเชื้อเริ่มต้น โดยเจือจางซัสเพนชั่นของเชื้อในอัตราส่วนที่เหมาะสม แล้วทำการ pour plate ด้วยอาหาร MRS agar สำหรับ *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเชื้อ

3. วิธีการผลิตปลาส้ม

กรรมวิธีการผลิตปลาส้มตามวิธีของ ศศิวิมล (2541) โดยปรับกระบวนการผลิตเพื่อความเหมาะสมดังนี้

นำปลาน้ำจืดมาทำการขอดเกล็ด ดึงเหงือก ตัดหาง ตัดครีบ ควักไส้ออก ล้างด้วยน้ำ

สะอาดและน้ำเกลือให้หมดกลิ่นคาวตั้งไว้ให้สะเด็ดน้ำ นำเกลือป่น กระเทียม ข้าวเจ้าสุก ข้าวเหนียว ข้าวคั่ว มาผสมกันให้เข้ากันกับปลา โดยทำการทดสอบจำนวน 3 ชุดการทดสอบ คือ

ชุดการทดลองที่ 1 ใช้กล้าเชื้อสด

ชุดการทดลองที่ 2 ใช้กล้าเชื้อผง(แป้งข้าวเจ้า)

ชุดการทดลองที่ 3 ใช้กรรมวิธีดั้งเดิม คือ ไม่มีการผสมหรือใส่กล้าเชื้อ

โดยจะทำการหมักปลาส้มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน

ภาคผนวก ค

ใบรายงานการทดสอบ
การให้คะแนนความชอบ (Hendonic scale)

ชื่อ.....วันที่.....เวลา.....

ผลิตภัณฑ์.....

คำแนะนำ กรุณาชิมตัวอย่างจากซ้ายไปขวาแล้วให้คะแนนความชอบตัวอย่างในแต่ละปัจจัยที่ใกล้เคียงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด

9	ชอบมากที่สุด	4	ไม่ชอบเล็กน้อย
8	ชอบมาก	3	ไม่ชอบปานกลาง
7	ชอบปานกลาง	2	ไม่ชอบมาก
6	ชอบเล็กน้อย	1	ไม่ชอบมากที่สุด
5	เฉย ๆ		

ปัจจัย	คะแนนความชอบของตัวอย่าง		
	.....	.....	.....
1. สี			
2. กลิ่น			
3. รสชาติ			
4. ความเปรี้ยว			
5. คะแนนความชอบโดยรวม			

ข้อเสนอแนะ.....

.....

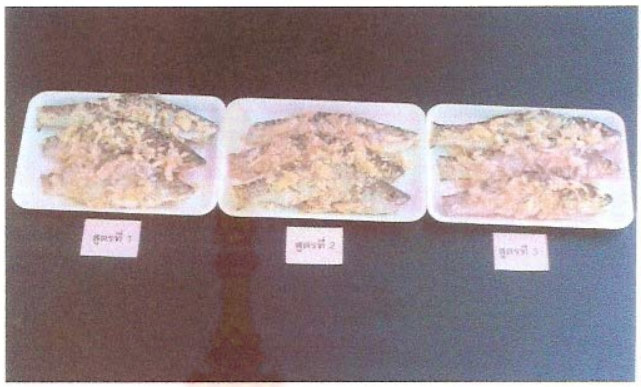
.....ขอขอบคุณ

ภาคผนวก ง

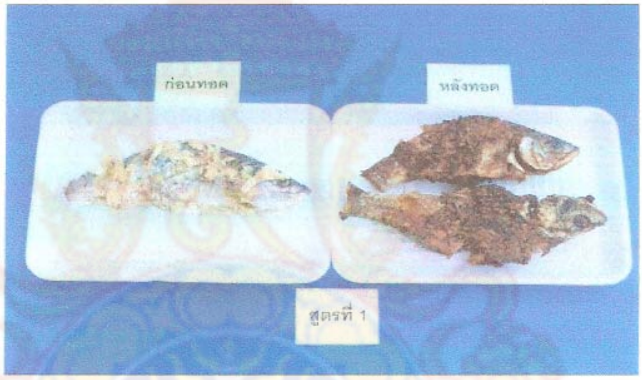
รูปที่ 6 แสดงตัวอย่างของปลาที่ตกแต่งแล้วก่อนนำไปผลิตเป็นปลาส้ม

รูปที่ 7 ส่วนผสมต่าง ๆ ในการผลิตปลาส้ม

รูปที่ 8 ส่วนผสมและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตปลาส้ม

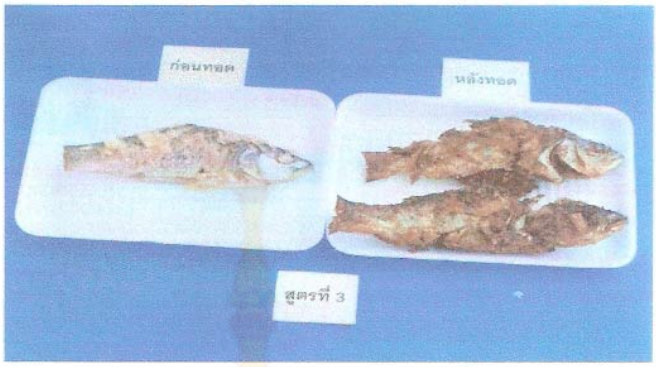


รูปที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบปลาส้มทั้ง 3 สูตร



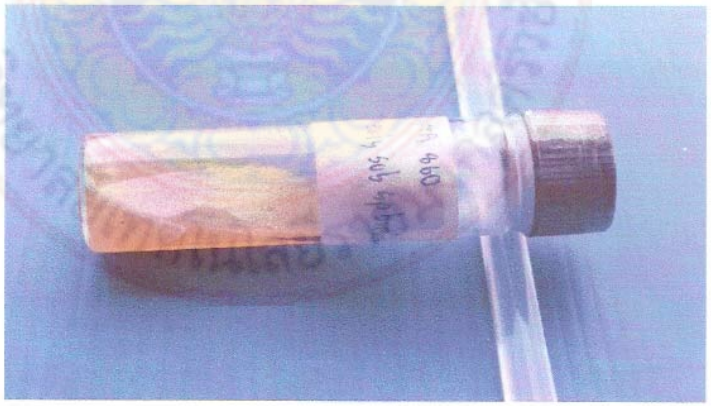
รูปที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบชนิดของปลาส้มแบบก่อนทอด
และหลังทอด สูตรที่ 1

รูปที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบชนิดของปลาส้มแบบก่อนทอด
และหลังทอด สูตรที่ 2



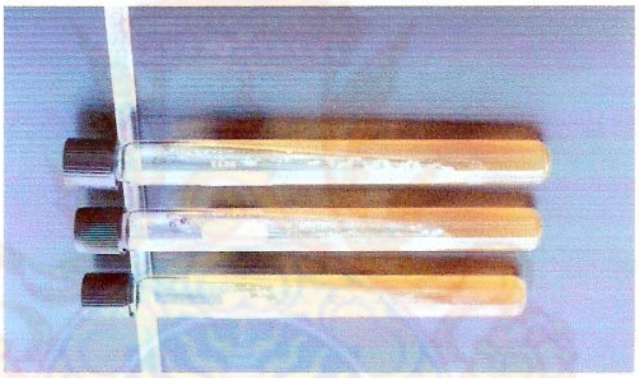
รูปที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบชนิดของปลาส้มแบบก่อนทอด และหลังทอด สูตรที่ 3

รูปที่ 13 เปรียบเทียบลักษณะของส่วนผสมที่ได้หลังจากการหมักปลาส้มของสูตรที่ 1 สูตรที่ 2 และสูตรที่ 3



รูปที่ 14 ตัวอย่างเชื้อ *Lactobacillus brevis* TISTR 860

รูปที่ 10 ตัวอย่างเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423



รูปที่ 11 ตัวอย่างเชื้อ *L. brevis* TISTR 860 และ *P. pentosaceus* TISTR 423 ที่นำมาถ่ายลงใน MRS agar slant

รูปที่ 12 แสดงวัสดุที่ใช้ในการบรรจุกล้าเชื้อทั้ง 2 ชนิด