การศึกษาโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพในปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติก

ศศิมาภรณ์ ดอยลอม

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ธันวาคม 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

การศึกษาโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพในปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติก

ศศิมาภรณ์ ดอยลอม

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ธันวาคม 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

BACTERIAL COMMUNITY ANALYSIS AND PHYSICOCHEMICAL CHANGES IN FERMENTED FISH (PLA-SOM) ADDING LACTIC ACID BACTERIA AS STARTER CULTURES

SASIMAPRON DOILOM

A Thesis Submitted to University of Phayao

in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Master of Science Degree in Biotechnology

December 2022

Copyright 2022 by University of Phayao

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพในปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติก

ของ ศศิมาภรณ์ ดอยลอม

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยพะเยา

---------- ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศรัณย์ พรหมสาย)

---------- ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนิตนาฎ อู่พุฒินันท์)

---------- กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ดร. รวิสรา รื่นไวย์)

---------- คณบดีคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิพรพรรณ์ เนื่องเม็ก)

เรื่อง: การศึกษาโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพในปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติก

ผู้วิจัย: ศศิมาภรณ์ ดอยลอม, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2565

อาจารย์ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนิตนาฏ อู่พุฒินันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.รวิสรา รื่นไวย์

คำสำคัญ: การคัดเลือก แบคทีเรียกรดแลคติก โพรไบโอติก ปลาส้ม โครงสร้างชุมชนของแบคทีเรีย

บทคัดย่อ

ปลาส้มเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมักพื้นบ้านที่มีการบริโภคกันในทุกภาคของประเทศไทย การผลิตอาศัยเชื้อจากธรรมชาติซึ่งควบคุมได้ยาก การใช้ต้นเชื้อบริสุทธิ์สามารถควบคุมคุณภาพให้คงที่และมีความปลอดภัยมากขึ้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากผลิตภัณฑ์ปลาส้ม เพื่อนำมาประยุกต์ใช้เป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตปลาส้ม โดยนำตัวอย่างปลาส้มในตลาดสดจังหวัดพะเยา 8 ตัวอย่างมาคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกโดยใช้อาหาร De Man Rogosa Sharpe จากนั้นนำไปทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก พบว่า มี 5 ไอโซเลทที่มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก ได้แก่ BPS2, BPS4, BPS5, BPS6 และ BPS7 เมื่อระบุสายพันธุ์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล พบว่า BPS2 คือ *Pediococcus pentosaceus* BPS4 และ BPS5 คือ *P. acidilactici* และ BPS6, BPS7 คือ *Lactiplantibacillus plantarum* จากนั้นนำ *P. acidilactici* และ *L. plantarum* มาใช้เป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตปลาส้มในระดับห้องปฏิบัติการแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม ทำการหมักที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ผลการทดลองพบว่า การทดลองชุดที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบเชื้อผสมของ *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* มีค่า pH ต่ำที่สุด ปริมาณกรดแลคติกสูงที่สุด ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกสูงที่สุด ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดต่ำที่สุด องค์ประกอบทางเคมีของอาหารมีค่าโปรตีน ไขมัน และเยื่อใยสูงที่สุด ส่วนการทดสอบทางประสาทสัมผัส ให้ค่าคะแนนความชอบสูงที่สุดใน 3 คุณลักษณะ นอกจากนี้เมื่อนำผลิตภัณฑ์ปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบเดี่ยวและแบบผสมไปทำการศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียด้วยเทคนิคเมต้าจีโนมิกส์ พบแบคทีเรียทั้งหมด 5 Phylum ได้แก่ Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes และ Proteobacteria โดยแบคทีเรียใน Phylum Firmicutes มี Taxonomy abundance สูงที่สุด 99.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปจัดจำแนกตาม Species พบทั้งหมด 49 Species โดย *Leuconostoc lactis, Pediococcus acidilactici, Lactiplantibacillus plantarum, Weissella confuse, Lactococcus cremoris, Lacticaseibacillus zeae* และ*Companilactobacillus musae* พบว่ามีความโดดเด่นซึ่งพบเป็นจำนวน 25.3, 25, 14.7, 9.7, 5.2, 3.7 และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยังพบว่าในชุดการทดลองที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสม *P. acidilactici* มีจำนวนมากกว่า *L. plantarum* จากผลการศึกษาครั้งนี้ สามารถนำไปต่อยอดในการพัฒนาเป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารหมักอื่น ๆ ได้ในอนาคต

Title: BACTERIAL COMMUNITY ANALYSIS AND PHYSICOCHEMICAL CHANGES IN FERMENTED FISH (PLA-SOM) ADDING LACTIC ACID BACTERIA AS STARTER CULTURES

Author: Sasimapron Doilom, Thesis: M.Sc. (Biotechnology), University of Phayao, 2022

Advisor: Assistant Professor Dr. Panitnart Auputinan Co-advisor Dr.RAWISARA RUENWAI

Keywords: Screening Lactic acid bacteria Probiotic Plasom Bacterial Community

ABSTRACT

Pla-som is a traditional fermented fish product widely consume in many regions of Thailand. Production of Pla-som relied on natural culture which uncontrollable. Using starter culture helps product having more consistence and good hygiene. This research was aim to screen for lactic acid bacteria with probiotic property from Pla-som in order to apply to use as starter culture in Pla-som production. Eight Pla-som samples from Phayao market were used for screening of lactic acid bacteria using De Man Rogosa Sharpe media. The probiotic property was investigated. The results showed that there are 5 isolates were probiotic BPS2, BPS4, BPS5, BPS6 and BPS7. Identification of strain by biomolecular technique found that BPS2 was *Pediococcus pentosaceus*, BPS4 and BPS5 were *P. acidilactici* and BPS6, BPS7 was *Lactiplantibacillus plantarum.* Then *P. acidilactici* and *L. plantarum* were used as starter cultures in the laboratory scale of Pla-som production with single and mix starter culture and incubated at 30 degrees Celsius for 5 days. The result showed that the mix starter culture of *P. acidilactici* and *L. plantarum* sample gave the lowest pH, highest lactic acid content, highest lactic acid bacteria, lowest total bacteria, highest protein fat and fiber content in proximate analysis and highest score in sensory evaluation in 3 categories. Moreover, the Pla-som products with single and mix starter culture were study for the bacterial community using metagenomic and found 5 Phylum including Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes and Proteobacteria, the Firmicutes Phylum showed the highest of Taxonomy abundance with 99.6%, and the species could be classified in 49 species, *Leuconostoc lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Weissella confuse*, *Lactococcus cremoris*, *Lacticaseibacillus musaecil* and *Companilactobacillus musae* showed the highest of Taxonomy abundance with 25.3, 25, 14.7, 9.7, 5.2, 3.7 and 3.5 %, respectively. It also showed that in mix culture samples the amount of *P. acidilactici* were higher than *L. plantarum*. From this research, we can apply to use for developing as starter culture for other fermented food in the future.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาและความช่วยเหลือจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนิตนาฎ อู่พุฒินันท์ อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย ที่ให้คำแนะนำ ตรวจแก้ไขให้ข้อเสนอแนะ และติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินการวิจัย ทำให้ดำเนินงานวิจัยสำเร็จไปได้อย่างราบรื่น ตั้งแต่เริ่มดำเนินการจนกระทั่งดำเนินการเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของอาจารย์เป็นอย่างยิ่งและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรัณย์ พรหมสาย ประธานสอบวิทยานิพนธ์ และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ดร.รวิสรา รื่นไวย์ ที่ได้ให้ข้อเสนอแนะ และแนวคิดต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ในการจัดทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยาทุกท่าน โดยเฉพาะ ดร.วนิดา แซ่จึง ที่คอยให้ความรู้และคำปรึกษาในด้านต่าง ๆ ทางวิชาการ และอำนวยความสะดวกในงานวิจัย ซึ่งมีส่วนสำคัญมากที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ และห้องปฏิบัติการ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยาที่อำนวยความสะดวก เอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย เพื่อให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ดี

ขอขอบคุณผู้ตอบแบบสอบถามทุก ๆ ท่าน ที่ได้กรุณาให้ความร่วมมือในการตอบแบบสอบถาม รวมถึงเพื่อนและพี่น้องที่เป็นผู้ช่วยในการเก็บข้อมูลและรวบรวมข้อมูลในการวิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณงบประมาณการสนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้ จากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยพะเยา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาและผู้ที่อยู่เบื้องหลังความสำเร็จทุกท่าน ที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยมาโดยตลอด ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์เล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจศึกษาและนำความรู้ที่ได้ไปต่อยอดเป็นความรู้ในอนาคต

ศศิมาภรณ์ ดอยลอม

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญภาพ ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 2

ขอบเขตของโครงการวิจัย 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก 3

ผลิตภัณฑ์ปลาส้ม 4

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) 8

ต้นเชื้อบริสุทธ์แบคทีเรีย (starter culture) 23

โครงสร้างชุมชนของแบคทีเรีย (Bacteria community) 24

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 25

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 28

วัสดุและอุปกรณ์ 28

วิธีการดำเนินการวิจัย 31

บทที่ 4 ผลการวิจัย 41
การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 41
การศึกษาคุณสมบัติการเป็นหัวเชื้อโพรไบโอติก 41
การระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก 43
การเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ลงในปลาส้ม 45
การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาในตัวอย่างปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ 47
คุณภาพทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ปลาส้ม 49
การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารของปลาส้ม 51
การศึกษาโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรีย 56
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 69
บรรณานุกรม 77
ภาคผนวก 86
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ 87
ภาคผนวก ข การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก 89
ภาคผนวก ค ปลาส้ม 91
ภาคผนวก ง การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 92
ภาคผนวก จ ข้อมูลดิบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ BPS2, BPS4, BPS5, BPS6 และ BPS7 93
ภาคผนวก ฉ ข้อมูล Primer 98
ภาคผนวก ช เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ศึกษาไอโซเลทต่าง ๆ กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล ncbi 99
ประวัติผู้วิจัย 101

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ข้อกำหนดสารปนเปื้อนในตัวอย่างปลาส้มตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน.....7

ตาราง 2 ข้อกำหนดจุลินทรีย์ในตัวอย่างปลาส้มตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน.....8

ตาราง 3 แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในระหว่างการหมักปลาส้มตั้งแต่วันที่ 0–5 ของการหมัก..... 16

ตาราง 4 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่แตกต่างกันจากทั่วโลก 18

ตาราง 5 แบคทีเรียทดสอบ 31

ตาราง 6 รายละเอียดการแบ่งชุดการทดลองการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ลงในปลาส้ม 35

ตาราง 7 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาในตัวอย่างปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติก..... 36

ตาราง 8 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลท ด้วยวิธี Disc diffusion 42

ตาราง 9 ความกว้างของโซนการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลท ด้วยวิธี Agar well diffusion (มิลลิเมตร) 43

ตาราง 10 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ระหว่างการหมักปลาส้ม.....45

ตาราง 11 ปริมาณกรดแลคติกจากปลาส้ม (เปอร์เซ็นต์).....46

ตาราง 12 คะแนนการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ปลาส้ม 52

ตาราง 13 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารจากปลาส้ม 54

ตาราง 14 ค่า L* a* b* ของตัวอย่างปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติก 55

ตาราง 15 ชนิดและจำนวนของแบคทีเรียในระดับอนุกรมวิธานต่าง ๆ ที่พบในตัวอย่างปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย กรดแลคติกแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่างการหมักในระยะเวลาต่าง ๆ 66

ตาราง 16 เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลทต่าง ๆ กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล ncbi..... 99

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1 ปลาส้ม.....5

ภาพ 2 วิถีกระบวนการหมักแบบ Homofermantative.....11

ภาพ 3 วิถีกระบวนการหมักแบบ Heterofermentative 12

ภาพ 4 การสลายเม็ดเลือดแดง 32

ภาพ 5 ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยวิธี Metagenomic 40

ภาพ 6 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ศึกษา (Pediococcus pentosaceus BPS2, Pediococcus acidilactic BPS4, Pediococcus acidilactic BPS5, Lactiplantibacillus plantarum BPS6 และ Lactiplantibacillus plantarum BPS7) กับ reference strains แบบ Maximum likelihood.....44

ภาพ 7 จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างปลาส้ม 48

ภาพ 8 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดจากตัวอย่างปลาส้ม 48

ภาพ 9 ชนิดและจำนวนของแบคทีเรียในระดับอนุกรมวิธานต่าง ๆ ที่พบในตัวอย่างปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่างการหมักในระยะเวลาต่าง ๆ PA : P. acidilactici, LP : L. plantarum, LA : P. acidilactici + L. plantarum, CT : Control, D0 : Day 0, D3 : Day 3, D5 : Day 5 A) Phylum B) Class C) Order D) Family E) Genus F) Species 59

ภาพ 10 การคัดแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS ที่เติม Bromocresol green 89

ภาพ 11 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง 89

ภาพ 12 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร..... 90

ภาพ 13 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ..... 90

ภาพ 14 ปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติกโดย หมักวันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 91

ภาพ 15 การทดสอบทางประสาทสัมผัส..... 91

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลาส้ม เป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่เป็นการนำปลามาผ่านกรรมวิธีการหมักด้วยเกลือ ข้าวสวยหรือข้าวเหนียวนึ่ง และกระเทียม จนมีรสเปรี้ยว ปลาที่นิยมนำมาผลิตปลาส้มเป็นปลาน้ำจืด ได้แก่ ปลาจีน ปลานวลจันทร์ ปลานิล ปลาตะเพียน ปลายี่สก เป็นต้น ในประเทศไทยมีการผลิตปลาส้มและนิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายทั้งในภาคใต้ ภาคกลาง และภาคเหนือ โดยจังหวัดพะเยา ปลาส้มจัดได้ว่าเป็นสินค้าหลักในโครงการหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ของจังหวัด ซึ่งขั้นตอนการหมักปลาส้มส่วนใหญ่จะใช้ภูมิปัญญาท้องถิ่นโดยอาศัยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ การหมักด้วยวิธีดังกล่าวทำให้การควบคุมคุณภาพของปลาส้มให้มีความคงที่ได้ยาก นอกจากนั้นยังมีจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนอยู่ในวัตถุดิบเหลือรอดหลังจากการหมัก ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาด้านความปลอดภัยต่อผู้บริโภค แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria) เป็นแบคทีเรียที่สำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตในส่วนผสมของอาหารให้เป็นสารประกอบต่าง ๆ ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการหมักแล้วมี pH ลดลง เกิดกรด รสเปรี้ยว เนื้อสัมผัส และกลิ่นรสที่ดีในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก แบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกแบคทีเรีย (ชุลีพร ชำนาญค้า และคณะ, 2560) เมื่อบริโภคเสริมเข้าไปจะทำให้เกิดผลดีต่อสุขภาพผู้บริโภค ช่วยปรับสมดุลของสภาพแวดล้อมในระบบทางเดินอาหาร ป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคจับที่ผิวเยื่อบุลำไส้ โดยการสร้างเกราะป้องกันบริเวณเยื่อบุลำไส้ จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงได้มีการนำโพรไบโอติกมาใช้ในการบรรเทาอาการท้องเสีย รักษาโรคลำไส้อักเสบ แก้ปัญหาท้องผูก และเสริมสร้างภูมิต้านทาน (AlKalbani, et al., 2019) ในปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญต่อสุขภาพและความปลอดภัยมากขึ้น ดังนั้นการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกในกระบวนการผลิตปลาส้มจะสามารถช่วยส่งเสริมกระบวนการหมัก ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่อาจปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ โดยแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกนั้นสามารถทนต่อสภาวะในกระบวนการหมัก ทนต่อความเป็นกรดในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดี (ผุสดี ตังวัชรินทร์ และคณะ, 2559)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็น โพรไบโอติก จากผลิตภัณฑ์ปลาส้มเพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อโพรไบโอติก (probiotic starter cultures) สำหรับผลิตปลาส้มให้มีคุณภาพดีและปลอดภัยยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกและตรวจสอบสายพันธุ์ของต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกจากผลิตภัณฑ์ปลาส้มที่จำหน่ายในตลาดสดจังหวัดพะเยา
2. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพของปลาส้มหลังจากที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก
3. ศึกษาโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียในปลาส้มหลังจากที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติก

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ปลาส้ม โดยการเก็บตัวอย่างปลาส้มจากตลาดสดจังหวัดพะเยา ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก ศึกษาคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น ได้แก่ ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ทดสอบความสามารถในการทนกรด ความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี ทดสอบประสิทธิภาพความไวต่อยาปฏิชีวนะ และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร แล้วทำการระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก จากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทราบชนิดมาทำเป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์โดยการเติมเข้าไปในปลาส้มเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพ วิเคราะห์องค์ประกอบของอาหารโดยรวม ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ปลาส้ม และศึกษาโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรีย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตปลาส้มในระดับครัวเรือนและระดับอุตสาหกรรม
2. ผลสำเร็จที่ได้จากการงานวิจัยสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านอาหารหมักประเภทอื่น ๆ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

การหมัก (fermentation) หมายถึง การเดือด ที่เกิดจากการมีฟองก๊าซผุดขึ้นมาบนหน้าอาหารระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ทำให้มองดูเหมือนลักษณะการเดือด บทนิยามของคำว่าการหมักยังรวมไปถึงปฏิกิริยาออกซิเดชัน–รีดักชัน (oxidation–reduction) ที่เกิดขึ้นในระหว่างการใช้สารประกอบอินทรีย์เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักขึ้น (มณีศรี. 2551)

อาหารหมักมีจุดกำเนิดจากความต้องการเก็บถนอมอาหารที่มีมากเกินการบริโภคให้อยู่ในสภาพดีเป็นเวลานาน และสามารถบริโภคได้โดยไม่เป็นอันตราย (ประสงค์สม ปุณยอุปพัทธ์ และสุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์, 2560) ซึ่งในแต่ละท้องที่ก็มีวิธีการทำที่คล้ายและแตกต่างกันออกไป แต่โดยส่วนใหญ่เป็นการทำภายในครอบครัว ถ่ายทอดจากรุ่นสู่รุ่นสืบต่อกันมาเป็นระยะเวลายาวนานโดยวิธีบอกเล่าและสอนตามขั้นตอนต่าง ๆ ตามวิธีดั้งเดิม ปัจจุบันอาหารหมักได้รับการพัฒนามาเป็นอุตสาหกรรม สามารถทำรายได้หลักหลายล้านบาทต่อปี (Panthavee, Saithong and Worawuthiyanan, 2007)

อาหารหมัก เป็นวิธีการถนอมอาหารโดยอาศัยจุลินทรีย์ที่ส่งผลดีต่ออาหาร คือ มีรสชาติ เนื้อสัมผัส กลิ่น รสที่ดีขึ้น ซึ่งจุลินทรีย์เป็นตัวช่วยในการย่อยสลาย หรือเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบส่งผลให้อาหารหมักที่ได้ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพผู้บริโภค นอกจากนี้ยังเพิ่มคุณค่าทางราคาของอาหาร และสามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้เป็นต้น

1. ผลิตภัณฑ์ที่หมักจากปลาแบ่งออกเป็น 3 ประเภท

1.1 Fermented fish เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำปลาทั้งตัว หรือปลาเพียงบางส่วนมาหมัก การหมักอาจใช้เวลา 2–3 วัน หรืออาจมากกว่า 1 ปี โดยไม่มีการเติมเครื่องปรุงแต่ง เช่น ข้าวคั่ว ยีสต์ และมะละกอ อาหารชนิดนี้ได้แก่ ปลาร้า ปลาส้ม ปลาเจ่า

1.2 Fermented fish pasted เป็นผลิตภัณฑ์ที่อาจใช้ปลา หอย หรือกุ้ง ใส่เกลือตากและบดให้ละเอียด หมักไว้ระยะหนึ่ง จนได้กลิ่นรสตามที่ต้องการ อาจมีการเติมเครื่องปรุง

หรือไม่เติมก็ได้ เช่น กะปิ มัมกะเซต (mam-ca-sat) ของกัมพูชา และปลาแดก (padec) ของลาวเป็นต้น

1.3 Fermented fish sauce เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำปลามาหมักด้วยเกลือ จากนั้นปล่อยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเวลาหลายเดือน จนเนื้อปลาย่อยสลายเป็นของเหลวที่มีโปรตีนสูง แยกเอาเฉพาะส่วนใส อาจปรุง หรือไม่ปรุงแต่งรสก็ได้

ผลิตภัณฑ์ปลาส้ม

ปลาส้ม หรือปลาข้าวสุก เป็นการแปรรูปผลผลิตทางการเกษตรโดยนำปลามาผ่านกรรมวิธีการหมักด้วยเกลือ ข้าวสวยหรือข้าวเหนียวนึ่ง และกระเทียม จนมีรสเปรี้ยว (ภาพ 1) การผลิตปลาส้ม เป็นการถนอมอาหารจากภูมิปัญญาพื้นบ้านที่สืบทอดกันมายาวนาน โดยมีถิ่นผลิตดั้งเดิมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย ซึ่งปัจจุบันแพร่กระจายทำในทุกภาค และต่างมีสูตรที่แตกต่างกัน ทั้งการเลือกใช้ชนิดปลา และส่วนผสม จนเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ปลาส้มหลายแบบในแต่ละท้องถิ่น มีชื่อเรียกที่แตกต่างกันออกไป จากการรายงานของ Ruddle and Ishige, (2010) ได้กล่าวถึงผลิตภัณฑ์ปลาหมักของประเทศเพื่อนบ้านอย่างประเทศญี่ปุ่นเรียกว่า Shiokara,Narezushi ประเทศเกาหลี เรียกว่า Jeot, Shikhe ประเทศมาเลเซีย เรียกว่า Pekasam, Cincalok ประเทศเวียดนาม เรียกว่า Ca-mam, Nam-chau และประเทศไทย เรียกว่า ปลาร้า ปลาส้ม เป็นต้น ปลาส้มเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่ได้จากการแปรรูปปลาน้ำจืดหรือในบางท้องถิ่นอาจใช้ปลาทะเล โดยปลาที่นิยมนำมาผลิต ได้แก่ ปลานวลจันทร์ ปลานิล ปลาจีน

1. ปลาส้มแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน ปลาส้ม มาตรฐานเลขที่ มผช. 26/2557 (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2557)

1.1. ปลาส้มตัว เป็นปลาส้มที่ได้จากการนำปลาทั้งตัวมาขอดเกล็ด และควักไส้โดยไม่มีการตัดหรือหั่นเป็นชิ้น

1.2 ปลาส้มชิ้น เป็นปลาส้มที่ทำจากปลาที่หั่นเป็นชิ้น

1.3 ปลาส้มเส้น เป็นปลาส้มที่ทำจากเนื้อปลาล้วนแล้วหั่นเป็นเส้น

ภาพ 1 ปลาส้ม

2. วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตปลาส้ม

2.1 ปลาสด นิยมใช้ปลาน้ำจืดทำปลาส้ม ได้แก่ ปลาตะเพียน ปลานวลจันทร์ ปลาเทโพ ปลาจีน ปลายี่สก เป็นต้น ลักษณะปลาส้มที่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคคือ มีสีขาวอมชมพู เนื้อปลาเหนียว ไม่ยุ่ยง่าย รสชาติอร่อย

2.2 เกลือ วัตถุประสงค์ของการใส่เกลือเพื่อช่วยดึงน้ำออกจากปลาจนถึงจุดที่จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้ ในขณะเดียวกันเกลือจะซึมผ่านเนื้อปลาเข้าไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เพิ่มแรงดันออสโมซิสในเซลล์ทำให้เซลล์แตก ยกเว้นในจุลินทรีย์ที่สามารถทนเค็มได้ สาเหตุที่เกลือสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ เนื่องจากเกลือช่วยลดค่าความชื้นของอาหารจนจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้ ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีน (Proteolytic enzyme) ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์บางชนิด และช่วยลดการละลายของออกซิเจน นอกจากนี้ส่วนประกอบทางเคมีของเกลือ มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการซึมซาบของเกลือเข้าไปในเนื้อปลา ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ การเก็บรักษา และกลิ่นรส และขนาดของเกลือมีผลต่อการซึมซาบ กล่าวคือ ถ้าเกลือมีขนาดใหญ่การซึมซาบจะช้า ทำให้ปลาเน่าเสียได้ง่าย แต่ถ้าใช้เกลือที่ละเอียดมากเกินไปเกลือจะถูกละลายด้วยน้ำจากกล้ามเนื้อปลาทำให้ความชื้นของเนื้อเยื่อบริเวณผิวหมดไป ส่งผลให้โปรตีนเกิดการจับตัวกันเป็นก้อน (อังคณา ชมพูมิ่ง, ตะวัน ฉัตรสูงเนิน และธวัชชัย ชัยธวัชวิถี, 2553)

2.3 ข้าวเหนียวนึ่งหรือข้าวสุก ที่ผ่านการล้างน้ำจนสะอาด เพื่อกำจัดเมือกและทำให้เมล็ดข้าวไม่ติดกัน ข้าวเหนียวนึ่งหรือข้าวสุก เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์เพื่อให้จุลินทรีย์ใช้ในการสร้างกรด และแอลกอฮอล์ทำให้เกิดรสเปรี้ยว ส่วนกลิ่น–รสของแอลกอฮอล์ที่ซึมในน้ำหมักเข้าสู่เนื้อปลา ส่งผลให้เนื้อสัมผัสของปลามีรสชาติที่ดีขึ้น นอกจากนี้น้ำซาวข้าวทำหน้าที่ช่วยดับกลิ่นคาวปลาร่วมด้วย

2.4 กระเทียม นอกจากเป็นเครื่องเทศที่ใช้ในการให้กลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ปลาส้มแล้ว ยังสามารถกระตุ้นการเจริญและสร้างกรดของแบคทีเรียกรดแลคติก และส่วนผสมอื่นที่อาจเติมลงไปเพื่อปรุงแต่งรสชาติให้ดีขึ้นเช่น น้ำตาลหรือผงชูรสเป็นต้น

3. ขั้นตอนและวิธีการผลิตปลาส้ม

เริ่มจากการนำปลาสดเช่น ปลาจีน ปลานิล ปลาตะเพียน ควรใช้ปลาสดมาทำการแปรรูป เนื่องจากปลาจะเน่าเสียง่ายถ้าเก็บไว้ใต้สภาวะอากาศร้อนและหลังจากปลาตายจะเกิดการย่อยสลายตัวเอง ซึ่งเกิดจากเอนไซม์ที่มีอยู่ในกล้ามเนื้อปลาโดยเฉพาะเอนไซม์คาเทปซิน (cathepsins) ย่อยโปรตีนกล้ามเนื้อปลา ทำให้เกิดจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ ซึ่งผลิตเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกลิ่นระหว่างการหมัก) (มาโนชญ์ สุธีรวัฒนานนท์, 2551) มาทำความสะอาดด้วยการล้างน้ำ ขอดเกล็ด ผ่าท้อง และควักไส้ออกโดยคลุกให้เนื้อปลา กระเทียม เกลือ และข้าวเข้ากันดี นำปลาที่ได้ไปหมักในถุงพลาสติกหรือใส่ภาชนะปิดสนิท เช่น ปี๊บโลหะหรือถังพลาสติกเป็นต้น จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ถึง 3 วัน เพื่อให้เกิดการหมักจนได้ปลาส้มที่สามารถบริโภคได้ ระยะเวลาการหมักขึ้นอยู่อุณหภูมิหรือสภาพอากาศของสถานที่ผลิต ในช่วงเดือนมีนาคม ถึง เมษายน ที่มีอากาศร้อนจะใช้เวลาเพียง 2 วัน ส่วนช่วงเดือนธันวาคม ถึง มกราคม ที่มีอุณหภูมิต่ำอาจใช้เวลา 7 วัน จึงจะได้ผลิตภัณฑ์ปลาส้ม (สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2558)

4. ลักษณะของปลาส้มที่ดี ผลิตภัณฑ์ปลาส้มที่ดีตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2557) จะต้องมีลักษณะดังต่อไปนี้

4.1 ภาชนะ ภาชนะบรรจุเดียวกัน ต้องเป็นปลาชนิดเดียวกัน เนื้อปลาแน่น ไม่ยุ่ย

4.2 สี ต้องเป็นสีตามธรรมชาติของปลาส้ม ไม่มีสีคล้ำ

4.3 กลิ่น ต้องมีกลิ่นเป็นไปตามธรรมชาติของปลาส้มแต่ละประเภท มีกลิ่นเปรี้ยวของผลิตภัณฑ์หมัก มีกลิ่นหอมของกระเทียม ไม่มีกลิ่นอับ กลิ่นหืน หรือกลิ่นอื่นที่ไม่พึงประสงค์

4.4 รส ต้องมีรสเปรี้ยวที่เหมาะสมตามธรรมชาติของปลาส้ม

4.5 สิ่งแปลกปลอม ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอม เช่น เส้นผม ชิ้นส่วนหรือสิ่งปฏิกูลของแมลง หนอน หนู และนก ดิน ทราย และกรวด เป็นต้น

4.6 ความเป็นกรด–ด่าง ค่า pH ต้องไม่เกิน 4.6 เมื่อถึงกำหนดวัน เดือน ปี ที่เริ่มบริโภค

4.7 สารปนเปื้อน คือสารที่ปนมากับอาหารโดยไม่ตั้งใจ แต่เป็นผลซึ่งเกิดจากกระบวนการผลิต กรรมวิธีการผลิต โรงงาน หรือสถานที่ผลิต การบรรจุ การดูแลรักษา การขนส่งหรือการเก็บรักษา หรือเกิดเนื่องจากการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อม ยังรวมถึงชิ้นส่วนจากแมลง สัตว์ หรือ สิ่งแปลกปลอมอื่นด้วย เมื่อผู้บริโภคได้รับสารปนเปื้อนอาจอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ ดังนั้นจึงมีข้อกำหนดเพื่อคุ้มครองครองความปลอดภัยของผู้บริโภค โดยข้อกำหนดของสารปนเปื้อนที่พบได้ในผลิตภัณฑ์ปลาส้มระบุดังตาราง 1

ตาราง 1 ข้อกำหนดสารปนเปื้อนในตัวอย่างปลาส้มตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน

สารเคมี	mg/kg
ตะกั่ว	< 1
สารหนู	< 2
ปรอท	< 0.5
แคดเมียม	< 2

ที่มา: สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2557

4.8 วัตถุเจือปนอาหาร ต้องไม่พบโซเดียมหรือโพแทสเซียมไนเทรต โซเดียมหรือโพแทสเซียมไนไทรต์ โซเดียมบอเรต (บอแรกซ์) และสีสังเคราะห์ทุกชนิด แต่อนุญาตให้ใช้ฟอสเฟตในรูปของโมโน ได และ โพลี ของเกลือโซเดียม หรือโพแทสเซียมอย่างใดอย่างหนึ่งหรือรวมกันในผลิตภัณฑ์ (คำนวณเป็น P2O5 จากฟอสฟอรัสทั้งหมด) ไม่เกิน 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

4.9 พยาธิ พยาธิตัวจี๊ด *Gnathostoma spinigerun* และตัวอ่อนพยาธิใบไม้ในตับต้องไม่พบในตัวอย่าง 100 กรัม

4.10 จุลินทรีย์ หมายถึง จุลินทรีย์เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส พยาธิและโปรโตซัว ที่ก่อให้เกิดโรคในคน โดยผ่านทางอาหารหรือน้ำเป็นหลัก ซึ่งอาหารที่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์

ก่อโรค จะทำให้ผู้บริโภคเจ็บป่วย จากขอมูลทางวิชาการระบุวาการที่ทำให้เกิดโรคตองมีปริมาณในระดับหนึ่งถึงทำให้เกิดโรคได ดังนั้นการควบคุมจุลินทรียที่ทำให้เกิดโรคจึงสามารถที่จะกำหนดปริมาณที่ยอมให้พบได้ในอาหารแตละชนิดในระดับที่เหมาะสม โดยข้อกำหนดของจุลินทรีย์ที่พบได้ในผลิตภัณฑ์ปลาส้มระบุดังตาราง 2

ตาราง 2 ข้อกำหนดจุลินทรีย์ในตัวอย่างปลาส้มตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน

จุลินทรีย์	รายละเอียด
Salmonella	ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม
Staphylococcus aureus	ต้องน้อยกว่า 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม
Bacillus cereus	ต้องน้อยกว่า 1×10^3 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม
Clostridium perfringens	ต้องน้อยกว่า 1×10^3 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม
Escherichia coli	ต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม
ยีสต์และรา	ต้องน้อยกวา 1×10^3 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

ที่มา: สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2557

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria)

1. ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคสได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นสารเมตาบอไลท์ปฐมภูมิคือ กรดแลคติก ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) ส่วนใหญ่เจริญในสภาวะไม่มีอากาศและสามารถทนต่อสภาวะมีอากาศได้ (aerotolerant anaerobes) ลักษณะทางสัญฐานวิทยา พบว่า มีทั้งรูปร่างกลมและรูปร่างแท่ง ไม่มี cytochromes และ porphyrins จึงทำให้ไม่มีเอนไซม์คะตาเลส (catalase) และออกซิเดส (oxidase) สามารถเจริญได้ในที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) แต่บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูง 45 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.0 ถึง 4.5 แต่มีบางสายพันธุ์ที่สามารถทน pH ต่ำ 3.2 และสูง 9.0

โดยทั่วไปแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถพบได้ในธรรมชาติที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์ สิ่งแวดล้อมที่เหมาะต่อการเจริญเติบโต เช่น เนื้อสัตว์ นม ผลไม้ ผัก อีกทั้งพบได้ในอาหารแปรรูป อาหารหมักดองหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์ผัก ผลไม้ดอง เนื้อหมักต่าง ๆ แบคทีเรียชนิดนี้มีความต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนคือ ต้องมีกรดอะมิโนอย่างน้อยหนึ่งชนิดเป็นแหล่งของไนโตรเจน ต้องการ growth factor วิตามินหลายชนิด เช่น ไบโอติน (biotin) และไรโบฟลาวิน (riboflavin) และสารอนินทรีย์ เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส เป็นต้น นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถทนเกลือได้ 3–20 เปอร์เซ็นต์ (Axelsson, 2004)

แบคทีเรียกรดแลคติกมีความสำคัญกับกระบวนการผลิตอาหารหมักหลายประเภท โดยเฉพาะการผลิตอาหารหมัก นมหมักซึ่งนิยมใช้หัวเชื้อบริสุทธิ์เพื่อหมักในระดับอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถให้ผลิตภัณฑ์ประเภทอื่นจากกระบวนการหมัก ได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซิติก เอทานอล ไดแอซีทิล ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ แบคเทอริโอซิน และพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเชื้อในกลุ่มนี้สามารถสร้าง L (+) lactic acid ซึ่งดูดซึมได้ดีในทางเดินอาหาร และร่างกายสามารถนำไปใช้ได้ทันที บางกลุ่มสามารถสร้าง D(–)lactic acid และ D–L–lactic acid อีกทั้งยังสามารถสร้างแบคเทอริโอซินซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย หรือ antimicrobial ได้ จึงสามารถใช้เซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีชีวิตเป็นโพรไบโอติก (probiotic) ทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ของเจ้าบ้าน (host) สามารถป้องกันการเกิดท้องร่วง นอกจากนี้กรดแลคติกที่ได้จากกระบวนการหมักสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม เครื่องสำอางค์ และยังสามารถนำไปควบแน่นเป็นกรดพอลิแลคติก (polylactic acid) เพื่อใช้เป็นวัตุดิบในการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ

ในประเทศไทยมีงานวิจัยเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติกด้านการนำเชื้อดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม การผลิตโพรไบโอติก และการผลิตพลาสติกชีวภาพ โดยมีการวิจัยเพื่อแยกและคัดเลือกเชื้อ ศึกษาด้านอนุกรมวิธาน การสำรวจและการคัดแยกเชื้อสายพันธุ์ใหม่ของเชื้อกลุ่มนี้จากอาหารหมักพื้นเมืองในประเทศไทย

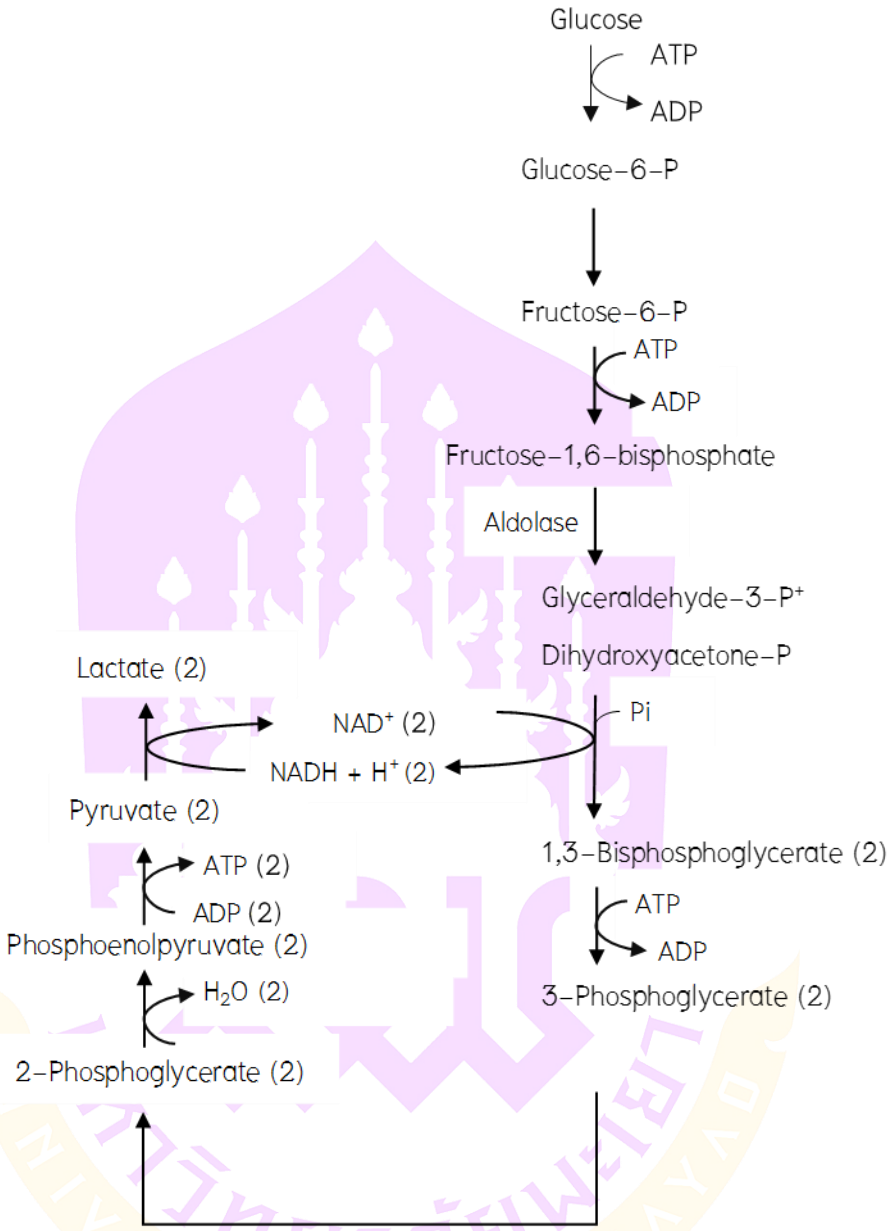
ตัวอย่างการใช้โพรไบโอติกในการช่วยเสริมสร้างสุขภาพและป้องกันโรคให้กับมนุษย์ เช่น การใช้แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacilli* ในการป้องกันละรักษาภาวะท้องเสียในมนุษย์โดยลดระยะเวลาและความรุนแรงของอาการท้องเสียที่เกิดจากอาหารเป็นพิษ (อุทัย เก้าเอี้ยน, 2549)

2. ประเภทของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ ตามลักษณะการใช้น้ำตาล ดังนี้

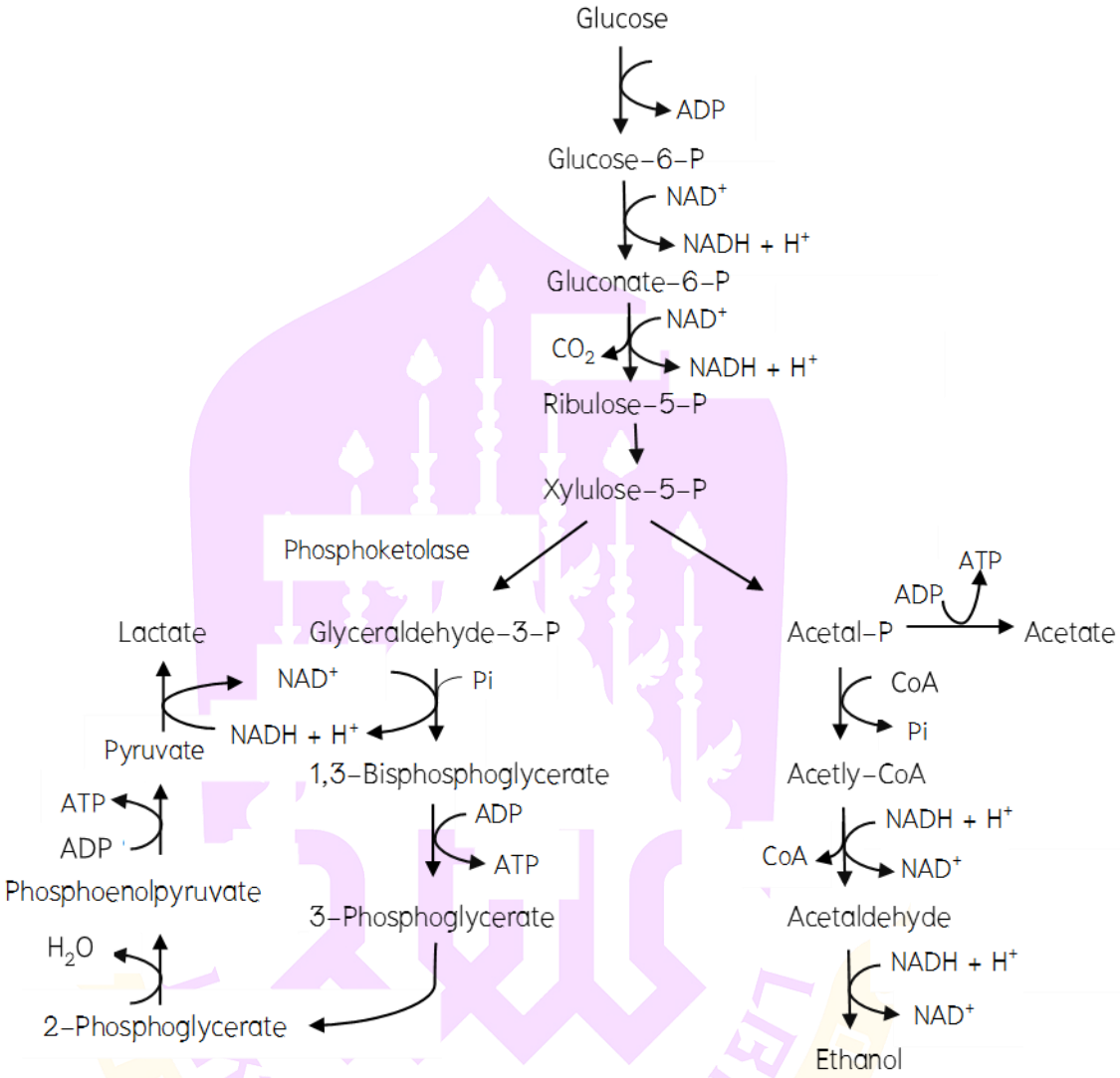
2.1 Homofermentative lactic acid bacteria คือแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ตัว ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ กรดแลคติก ประมาณ 85.95 เปอร์เซ็นต์ โดยผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส Emden–Myerhof–Parnas (EMB) (ภาพ 2) แบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้แก่ *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Tetranococcus* , *Aerococcus* เป็นต้น (Sharma, 2014)

2.2 Heterofermentative lactic acid bacteria คือแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่มีเอนไซม์ aldolase จึงไม่มีเอนไซม์ย่อย fructose 1,6 diphosphate ไปเป็น glyceroladehyde–3–phosephate ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ กรดแลคติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอีก 50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ กรดอะซิติก แอทิลแอลกอฮอล์ กรดฟอร์มิก อะซิเตท กลีเซอลรอล และคาร์บอนไดออกไซด์ (ภาพ 3) โดยอัตราส่วนของเอทานอลและกรดอะซิติกขึ้นอยู่กับ redox potential ของระบบแบคทีเรียในกลุ่มนี้ เช่น *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus* และบางกลุ่มของ *Lactiplantibacillus* ได้แก่ *L. bulgaricus* และ *L. casei* เป็นต้น (König and Fröhlich, 2009)



ภาพ 2 วิถีกระบวนการหมักแบบ Homofermantative

ที่มา: Sharma, 2014



ภาพ 3 วิถีกระบวนการหมักแบบ Heterofermentative

ที่มา: Sharma, 2014

3. การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

สำหรับการจัดแบคทีเรียกรดแลคติกในปัจจุบันนี้ได้นำเทคนิคทางพันธุกรรมต่าง ๆ เช่น electrophoresis priperties ของ gene products, DNA: DNA hybridization, เปอร์เซ็นต์ G + C content และ sequence of ribosomal RNA (rRNA) มาช่วยจัดจำแนก (Collins, et al., 1991) ทำให้สามารถจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 12 สกุล ดังต่อไปนี้

3.1 *Lactiplantibacillus* เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่สุด มีรูปร่างหลายแบบเช่น bent rods, coccobacilli, coryne form หรือ thread-like ให้ผลทดสอบแคทตาเลสเป็นลบ (-) เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศหรืออากาศเล็กน้อย สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติและตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกายคนและสัตว์เช่น บริเวณช่องปาก คราบบนผิวฟัน ต่อมน้ำลาย และทางเดินอาหาร ไม่ก่อโรคในพืชและสัตว์ แบคทีเรียกลุ่มนี้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารหลายประเภทโดยเฉพาะในอุตสาหกรรมการผลิตนมหมัก เช่น *L. acidophilus* และ *L. bulgaricus* อาหารหมักประเภทผัก เช่น *L. plantarum*, *L. sakei* และ *L. brevis* ใน sauerkraut รวมถึงการใช้เป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกและพรีไบโอติก (Pre-biotic) (Collins, et al., 1991)

3.2 *Pediococcus* แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดนี้มีลักษณะกลม ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์และไม่สร้างแคปซูล ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย ให้ผลทดสอบแคทตาเลส (catalase test) และออกซิเดส (oxidase test) เป็นลบ (-) มีคุณสมบัติเป็น homofermentative lactic acid bacteria มีลักษณะพิเศษคือสามารถสร้างกรดแลคติคที่มีโครงสร้างโมเลกุลแบบ D และ L ผสมกัน (DL-lactic acid หรือที่เรียกว่า racemic lactic acid) จากน้ำตาลกลูโคส สมาชิกของแบคทีเรียในสกุล *Pediococcus* ประกอบด้วย *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. inopinatus*, *P. damnosus*, *P. parvulus* และ *P. claussenii* สำหรับ Pediococcus species ที่ชอบเกลือ (halophilic species) ได้แก่ *Pediococcus halophilus* ปัจจุบันถูกจัดให้อยู่ในวงศ์ *Tetragenococcus* ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้มักพบในอาหารพวกเนื้อ ไส้กรอกเปรี้ยวและผัก

3.3 *Streptococcus* จัดเป็นแบคทีเรียที่มีเซลล์เป็นรูปไข่หรือกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-2.0 ไมโครเมตร เซลล์อยู่เป็นคู่เรียงต่อกันเป็นสายโซ่ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เป็น facultative anaerobes มีการหมักแบบ homofermentation (Holt, et al., 1994)

3.4 *Lactococcus* จัดเป็นแบคทีเรียที่มีเซลล์ลักษณะกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5–1.0 ไมโครเมตร พบเป็นคู่หรือเป็นสาย ไม่เคลื่อนที่ มีทั้งพวกที่ต้องการอากาศและต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย จัดอยู่ในกลุ่ม homofermentative lactic acid bacteria แบคทีเรียสกุลนี้ประกอบด้วย *Lactococcus lactis*, *Lc. plantarum*, *Lc. piscium*, *Lc. graviae* และ *Lc. raffinolactis* สามารถแยกได้จากผลิตภัณฑ์น้ำนมและเนื้อสัตว์ จัดเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมนมโดยใช้ในการเตรียมนมเปรี้ยว เนย และเนยแข็ง

3.5 *Enterococcus* แบคทีเรียสกุลนี้มีเซลล์เป็นรูปไข่ เป็นเซลล์เดี่ยวหรือจับกันเป็นสายโซ่สั้นๆ เจริญได้ที่ 1 องศาเซลเซียส และ 4 องศาเซลเซียส มีการหมักแบบ homofermentation และผลิต L(+) lactic acid เป็นหลัก สามารถจำแนกออกเป็น 5 species คือ *Enterococcus avium*, *E. cecirum*, *E. gallinarum*, *E. faecalis* และ *E. faecium* (Holt, et al., 1994)

3.6 *Wissella* เซลล์มีรูปร่างกลมและแท่งคล้าย *Leuconostoc* ประกอบด้วย 8 species คือ *W. confusa*, *W. halotolerans*, *W. minor*, *W. paramesenteroides*, *W. viridescens* *W. hellenica*, *W. kandleri* (Dworkin, 2006)

3.7 *Leuconostoc* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกเซลล์รูปร่างกลม พบเซลล์อยู่เป็นคู่หรือเป็นสาย สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศและมีอากาศเพียงเล็กน้อย มีการหมักแบบ heterofermentation แบคทีเรียสกุลนี้ประกอบด้วย 8 species ได้แก่ *L. argentinum*, *L. carnosum*, *L. citreum*, *L. gasicomitatum*, *L. gelidum*, *L. kimchii*, *L. lactis*, *L. mesenteroides* และ *L. pseudomesenteroides* มีค่าเปอร์เซ็นต์ G+C อยู่ระหว่าง 38–44 เปอร์เซ็นต์

3.8 *Oenococcus* ประกอบด้วย 2 species คือ *Oenococcus oeni* ซึ่งเปลี่ยนจาก *Leuconostoc* ที่เดิมพบจากกระบวนการหมักไวน์ (Axelesson, 2004) และ *Oenococcus kitaharae* แยกได้จาก *Oenococcus oeni* เนื่องจากมีข้อมูลพันธุกรรมต่างกัน *Oenococcus oeni* เปลี่ยนจาก *Leuconostoc* สามารถเปลี่ยนกรด L–malic เป็นกรดแลคติก (L+) ทำให้ไวน์มีรสชาติดีขึ้น มีความทนกรดและทนเอทานอลในปริมาณสูงรวมทั้งข้อมูลทางพันธุกรรมจากดีเอ็นเอและลำดับเบสของ 16S rRNA ซึ่งต่างจาก species ในสกุล *Leuconostoc* อย่างชัดเจนจึงทำให้สามารถแยกออกมาและตั้งเป็น *Oenococcus oeni* (Axelsson, 2004)

3.9 *Carnobacterium* เซลล์เป็นแท่งตรงขนาดสั้นถึงปานกลางหรือเป็นแท่งเรียว (slender rod) เรียงตัวเป็นเซลล์เดียวหรือคู่ ไม่พบการเรียงตัวแบบสายโซ่ มีการหมักแบบ heterofermentation ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) ส่วนใหญ่มักพบในเนื้อสัตว์โดยเฉพาะในเนื้อ ปลาและไก่ ประกอบด้วย 8 species ได้แก่ *Carnobacterium divergens*, *C. gallinarum*, C. *funditum*, *C. piscicola*, *C. mobile* และ *C. alterfunditum*, *C. inhibens* และ *C. alterfunditum* มีเปอร์เซ็นต์ G+C ระหว่าง 31.6–37.5 เปอร์เซ็นต์

3.10 *Tetragenococcus* เดิมถูกจัดเป็น *Pediococcus halophilus* แต่ถูกแยกโดย Collins, et al, (1990) มีการหมักแบบ heterofermentation แต่สามารถเจริญในอาหารที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย 2 species คือ *T. halophilus* และ*T. muriaticus* ซึ่งพบได้ในอาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์ที่มีเกลือในปริมาณสูง

3.11 *Aerococcus* ประกอบด้วย 4 species คือ *A. Sanguinicola*, *A. urinaehominis*, *A. urinae* และ *A. viridans* แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถพบได้ในอากาศทั่วไป ในผักชนิดต่าง ๆ ในโรงพยาบาล ในตัวอย่างส่งตรวจของคนไข้ และในสัตว์ทะเล

3.12 *Vagococcus* เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาดประมาณ 0.1–1.2 ไมโครเมตร อยู่เป็นคู่ หรือเรียงตัวเป็นสายสั้น ๆ ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์คือ *V. fluvialis* และ *V. salmoninarum* มีเปอร์เซ็นต์ G+C อยู่ระหว่าง 33–37 เปอร์เซ็นต์

4. จุลินทรีย์ที่พบในระหว่างการหมักปลาส้ม

Saisithi, et al, (1996) ได้รายงานจุลินทรีย์ที่มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการหมักปลาส้มฟัก คือ *Lactobacilli* (*Levilactobacillus brevis*, *L. plantarum*, *L. fermentum*), *Pediococci* (*Pediococcus pentosaceus*) และ *Staphylococci* ที่ไม่สร้าง Coagulase

Müller, et al. (1999) ศึกษาการคัดแยกจุลินทรีย์จากวัตถุดิบ และกระบวนการผลิตปลาส้มฟัก ระบุชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานและคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้จากปลา คือ Lactococcus lactis และ Leuconostoc citreum จากกระเทียมและใบตองคือ Weisella confuse จากข้าวสุก คือ Lactococcus paracasei นอกจากนี้ยังพบ Lactiplantibacillus plantarum, L. pentosus และ Pediococcus pentosaceus ในวัตถุดิบและแบคทีเรียกรดแลคติกระหว่างการหมักตั้งแต่วันที่ 0–5 (ตาราง 3)

ตาราง 3 แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในระหว่างการหมักปลาส้มตั้งแต่วันที่ 0–5 ของการหมัก

วันที่หมัก	แบคทีเรียกรดแลคติก
0	*L. brevis, L. lactis lactis, L. citreum, L. curvatus, L. pentosus, L. plantarum, W. Confuse*
1	*L. brevis, L. lactis lactis, L. casei, L. curvatus, L. mesenteroides, L. pentosus, L. plantarum, W. Confuse*
2	*L. brevis, L. casei, L. citreum, L. curvatus, L. mesenteroides, L. pentosus, L. plantarum*
3	*L. brevis, L. pentosus, L. plantarum*
4	*L. brevis, L. casei, L. pentosus, L. plantarum*
5	*L. brevis, L. casei, L. curvatus, L. pentosus, L. plantarum*

ที่มา: Müller, et al. 1999

อังคณา รัตนพันธ์ (2549) ได้ทำการจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกในปลาส้มจากปลานวลจันทร์ทะเลที่ใช้เกลือ 6 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักปลา ทำการคัดแยกโดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมโบรโมครีซอลเพอร์เพิล (Bromocresol purple) 0.0004 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคาร์บอเน็ต (Calcium carbonate) 0.005 เปอร์เซ็นต์ คัดเลือกโคโลนีที่สามารถเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ (Indicator) จากสีม่วงเป็นสีเหลือง และเกิดบริเวณใสของของแคลเซียมคาร์บอเน็ต สามารถคัดแยกได้ 20 ไอโซเลท (*Lactiplantibacillus* จำนวน 19 ไอโซเลท และ *Carnobacterium* จำนวน 1 ไอโซเลท) และศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อ โดยดูการติดสีแกรม สัณฐานวิทยาของเซลล์ และการสร้างเอนไซม์แคตาเลส

นาถสุดา วิศวงค์ (2552) ศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลาส้ม ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้คือ *Pediococcus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Lactiplantibacillus* และ *Staphylococcus*

อังคณา ชมพูมิ่ง และคณะ (2553) ได้ทำการคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์จากปลาส้ม 12 ตัวอย่างในจังหวัดพะเยาและแพร่ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพและสภาวะที่เหมาะต่อการผลิตปลาส้ม จากการศึกษาสามารถแยกจุลินทรีย์ได้ 57 ไอโซเลท โดยทำการทดสอบความสามารถในการทนเกลือคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ การสร้างกรด และการสร้างแก๊ส เมื่อจำแนกสายพันธุ์พบว่าเป็นกลุ่ม *Lactiplantibacillus* spp. จำนวน 8 ไอโซเลท กลุ่ม *Streptococcus* spp. จำนวน 2 ไอโซเลท และกลุ่ม *Corynobacterium* spp. จำนวน 1 ไอโซเลท ซึ่งกลุ่ม *Lactiplantibacillus* spp. มีความสามารถในการสร้างกรดได้สูงถึง 1.986 เปอร์เซ็นต์ จึงใช้เชื้อกลุ่ม *Lactiplantibacillus* spp. เป็นกล้าเชื้อในการหมักปลาส้ม พบว่าการเติมเชื้อที่ความเข้มข้น 10^6 CFU/ml ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการหมัก และบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน ทำให้ได้ปลาส้มที่มีรสชาติที่ผู้บริโภคนิยมมากที่สุด

Zang, et al. (2019) ได้รวบรวมข้อมูลผลิตภัณฑ์ปลาหมักและจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์ปลาหมักจากทั่วโลก (ตาราง 4)

ตาราง 4 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่แตกต่างกันจากทั่วโลก

ชื่อ	วัตถุดิบ	ปริมาณเกลือ	ระยะเวลาการหมัก	จุลินทรีย์	ประเทศ
Garum	*Tunnus thynnus*, *Scomber scombrus*	25%	9 เดือน	None reported	โรมัน
Hakarl	Greenland Shark (*Somniosus microcephalus*), เกลือ	0	3–6 สัปดาห์	*Moraxella, Acinetobacter, Lactiplantibacillus* sp.	ไอซ์แลนด์
Surstromming	Baltic herring, เกลือ	17%	3–4 สัปดาห์	*Halanaerobium*	สวีเดน
Rakfisk	Salmonid freshwater fish, เกลือ	>5%	9–10 สัปดาห์	*Lactobacilli*	นอร์เวย์
Lanhouin	Cassava fish (*Pseudotolithus* sp.), Spanish mackerel (*Scomberomorus tritor*), เกลือ	15–35%	3–8 วัน	*Bacillus, Staphylococcus, Corynebacterium, Pseudomonas, Micrococcus, Streptococcus, Achromobacter, Alcaligenes*	เบอร์ลิน โตโก การ์นา
Feseekh	*Alestes baremose*, Hydrocynus sp., เกลือ	20–30%	60 วัน	None reported	อียิปต์

ตาราง 4 (ต่อ)

ชื่อ	วัตถุดิบ	ปริมาณเกลือ	ระยะเวลาการหมัก	จุลินทรีย์	ประเทศ
Suan yu	Fresh-water fish (*Cyprinus carpio*), ข้าวคั่ว, เกลือ น้ำตาล	3%	30-60 วัน	*Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc*, *L. plantarum*, *Paralimentarius*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula anomala*	จีน
ปลาส้ม	*Puntius sophore*, เกลือ, น้ำตาลปาล์ม, ข้าวคั่ว	6-11%	8-12 วัน	*Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Weissella*, *L. planetarium*, *Lactococcus garvieae*, *Zygosaccharomyces rouxii*	ไทย
Shidal	Punti fish (*Puntius sophore*), phasa fish	0	3-5 เดือน	*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*	อินเดีย
Narezushi	Crucian carp, horse mackerel, chub mackerel, เกลือ,ข้าวคั่ว	20-30%	2-3 เดือน	*Lactobacillus acidipiscis*, *Lactobacillus versmoldensis*	ญี่ปุ่น

ตาราง 4 (ต่อ)

ชื่อ	วัตถุดิบ	ปริมาณเกลือ	ระยะเวลาการหมัก	จุลินทรีย์	ประเทศ
Jeotgal	Shrimp, shellfish, fish, salt	5–30%	2 เดือน หรือ 1 ปี	*Achromobacter, Bacillus, Brevibacterium, Flavobacterium, Halobacterium, Leuconostoc, Micrococcus, Pseudomonas, Staphylococcus, Sarcina,*	เกาหลี
Pekasam	lampam java, black tilapia (*Oreochromis mossambicus*), ข้าว, เกลือ	>10%	2–3 สัปดาห์ หรือ 12 เดือน	None reported	มาเลเซีย
Ngari	*Puntius sophore*	0	4–6 เดือน	*Lactococcus cremoris, L. plantarum, Bacillus subtilis, Candida,*	อินเดีย

ที่มา: ดัดแปลงจาก Zang, et al., 2019

5. ความสำคัญของแบคทีเรียกรดแลคติกในอุตสาหกรรม

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่พบมากในอาหารประเภท อาหารหมัก เช่น ผักดอง ผลไม้ดอง แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ผลิตภัณฑ์นม เช่น เนยแข็ง นมเปรี้ยวหรือ โยเกิร์ต และยังพบได้ในร่างกายคน และสัตว์ เช่น ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหารและอวัยวะสืบพันธุ์ ในระดับอุตสาหกรรมมีการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นหัวเชื้อตั้งต้นเพื่อเติมลงไปในอาหาร มีผลต่อกลิ่น รส และเนื้อสัมผัสของอาหาร โดยแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้กรดแลคติกและผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ซึ่งจากคุณสมบัติดังกล่าวจึงได้นำมาใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหาร ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติทนร้อน ได้แก่ mesophilic และ thermophilic lactic acid bacteria นิยมนำมาใช้อย่างมากในการหมักนมและอุตสาหกรรมนม เช่น *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* และ *L. delbrueckii* เป็นต้น ส่วนในอุตสาหกรรมอาหารหมักดอง ผลไม้ดอง สามารถพบแบคทีเรียกรดแลคติก *L. brevis*, *L. plantarum*, *Leuconostoc* spp. และ *Streptococcus* spp. นอกจากนั้นยังพบ *Lactobacillus delbrueckii*, *P. halophilus* และ *P. soyae* ส่วนผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เช่น แหนมและไส้กรอกเปรี้ยว พบแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum*, *L. brevis*, *P acidilactici*, *P, cerevisae*, *P. halophillus*, *P. pentosaceus* และ *Micrococcus varians* ซึ่งปัจจุบันถูกนำมาผลิตเป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์ที่ใช้ในการหมักแหนม (ประสงค์สม ปุณยอุปพัทธ์ และสุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์, 2560) ผลิตภัณฑ์จากปลา เช่น ปลาร้า ปลาทูเค็ม ปลาเจ่า ปลาส้ม ไตปลา พบ *L. plantarum*, *L. brevis*, *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp. และ *Streptococcus* spp.

แบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค และจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ เนื่องจากกรดแลคติกที่แบคทีเรียผลิตขึ้น ทำให้ค่า pH ไม่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์ก่อโรค หรือจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในอาหาร อีกทั้งยังมีการสร้างสารระเหยที่มีกลิ่นเฉพาะตัวเช่น สารไดอะซิติล (diacetyl) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีผลต่อคุณลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์อาหาร นอกจากนี้ยังมีสาระสำคัญที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นอีกชนิดหนึ่งคือ แบคทีริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้อย่างจำเพาะ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีความพยายามใช้แบคทีริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร แบคทีริโอซินที่ได้ถูกนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหาร และเป็นที่ยอมรับแล้วว่าบริโภคปลอดภัยได้แก่ ไนซิน (nisin) ที่สร้างมาจาก *Lactobacillus lactis* ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทผักบรรจุกระป๋อง เนื้อ เนย นม และโยเกิร์ต (Cleveland, et al. 2001; Ruiz, et al. 2010) พบว่า ไนซินสามารถควบคุมและป้องกันการเจริญของ *Listeria monocytogenes*

Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn (2008) ทำการคัดแยกเชื้อ *L. lactis subsp. lactis* TFF 221 ที่มีไนซินยีน (nisin gene) ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารจากกุ้งจ่อมประเทศไทย ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบพบว่า สามารถสร้าง nisin Z

Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn (2010) ได้ศึกษาการออกฤทธิ์ร่วมกันของ nisin และ p-cymene ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella enterica serova Typhi* ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคไข้ไทฟอยด์จากไส้กรอกเปรี้ยวพบว่า nisin และ p-cymene มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. typhi* โดยไม่ส่งผลกระทบต่อกลิ่นรสของอาหาร

ในปัจจุบันนี้ผู้คนให้ความสนใจเกี่ยวกับจุลินทรีย์สุขภาพกันอย่างมาก ผลิตภัณฑ์บางอย่างได้มีการใช้จุลินทรีย์สุขภาพในการผลิต อาทิเช่น นมเปรี้ยว เนยแข็ง ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้เป็นการผลิตมาจากแบคทีเรียกรดแลคติก ต่อมาได้มีการนำเอาแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดรวมกัน เพื่อเสริมประสิทธิภาพการทำงานให้ดียิ่งขึ้น ซึ่งจัดได้ว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเป็นโพรไบโอติกชนิดหนึ่ง ซึ่งก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมากต่อผู้บริโภค

5.1 ประโยชน์ของโพรไบโอติก

5.1.1 เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้แก่อาหารที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบ เช่น วิตามิน โปรตีน กรดอะมิโนที่จำเป็น และกรดไขมันที่จำเป็น

5.1.2 ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร เนื่องจากกรดอินทรีย์หรือ สารประกอบต่าง ๆ เช่น ไดอะซิติล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอทานอล เป็นต้น สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรงอาหารเป็นพิษ ซึ่งส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัย มีอายุการเก็บรักษานานขึ้น

5.1.3 ช่วยลดปริมาณคอเลสเตอรอล (cholesterol) ฟอสฟอลิปิด (phospolipid) และไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ในกระแสเลือด การบริโภคนมหมักจะช่วยในการยับยั้งการเกิดคอเลสเตอรอลในร่างกายได้ดั้งนั้นการบริโภคนมหมักที่มีเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มบิฟิโดแบคทีเรียอาศัยอยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยสลายและยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลผ่านผนังลำไส้ ทำให้คอเลสเตอรอลในเลือดลดลง นอกจากนี้การบริโภคนมคีเฟอร์ยังสามารถส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย ทำให้ระบบย่อยอาหารดีขึ้น โดยเฉพาะการย่อยแลคโตส (Hertzler and Clancy, 2003)

5.1.4 ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแก่ร่างกาย มีการศึกษาพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีความไวต่อ Microphage lymcocyte ทำให้เพิ่มระดับของ immunoglobulin (IgA) และผลิต Gamma interferon ทำให้มีความต้านทานต่อโรคอีกทั้งยังมีคุณสมบัติเป็น Antitumor

5.1.5 ปรับสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ ในระบบทางเดินอาหารจุลินทรีย์เจ้าถิ่นจะมีปริมาณมากกว่าแบคทีเรียก่อโรค จึงทำให้ไม่เกิดอาการท้องเสีย ลำไส้อักเสบ แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นโปรไบโอติกที่มีส่วนช่วยรักษาสภาพสมดุลของร่างกาย โดยจะช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคและการแย่งอาหารของเชื้อ

ต้นเชื้อบริสุทธ์แบคทีเรีย (starter culture)

ต้นเชื้อ หัวเชื้อ หรือ กล้าเชื้อ หมายถึง เชื้อบริสุทธ์ของจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิต ซึ่งผ่านการคัดเลือกและตรวจสอบแล้ว จำนวนหนึ่งชนิดหรือมากกว่าหนึ่งชนิด ใช้เติมลงไปในสูตรการผลิตอย่างน้อย 10^6 CFU/g เพื่อใช้เป็นตัวเริ่มต้นในกระบวนการหมัก ช่วยเพิ่มคุณภาพ กลิ่น รสชาติและลักษณะของผลิตภัณฑ์ ลักษณะของกล้าเชื้อที่ใช้ได้แก่ ลักษณะของสารแขวนลอย ในรูปของผงเชื้อที่ผ่านการทำไลโอฟิไลซ์ อาจมีการใช้โดยตรงหรือถ่ายเชื้อก่อนใช้ ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ที่หมักโดยใช้หัวเชื้อได้แก่ โยเกิร์ต ไส้กรอกหมัก ชีส เบียร์ เป็นต้น (Frank, 1992) โดยคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อต้องรับประกันได้ว่าทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพดี ซึ่งประกอบด้วยเป็นเชื้อที่มีการจัดจำแนกโดยใช้พื้นฐานทางสัณฐานวิทยามีกิจกรรมทางสรีรวิทยาในกาสร้างผลิตภัณฑ์ที่มีความคงตัวทราบจำนวนเริ่มต้นของการใช้มีความบริสุทธิ์ มีความปลอดภัยในการบริโภค

ประโยชน์ของการใช้ต้นเชื้อบริสุทธิ์คือ เพื่อเป็นการพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารหมักเป็นการทำให้เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์ ควบคุมการผลิตของผลิตภัณฑ์ให้มีประสิทธิภาพ เพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคอาหารประเภทอาหารหมักต่อผู้บริโภค ควบคุมให้กระบวนการหมักด้วยเทคโนโลยีต้นเชื้อบริสุทธิ์ในผลิตภัณฑ์อาหารมีคุณภาพที่สม่ำเสมอ

การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีต้นเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตอาหารหมักมีบทบาทที่สำคัญในการพัฒนาอุตสาหกรรม ซึ่งการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์ในทางอุตสาหกรรมแบ่งออกเป็น 4 ประเภท

1. Single strain starter คือการใช้เชื้อตั้งต้นที่ทราบแน่นอนเพียง 1 สายพันธุ์และ 1 species เท่านั้น

2. Multiple strain starter คือการใช้เชื้อบริสุทธิ์ตั้งต้นที่ทราบแน่นอนเพียง 1 สายพันธุ์แต่ใช้สายพันธุ์ที่แตกต่างมาใช้ร่วมกัน

3. Mutiple mixed strain starter คือการใช้เชื้อตั้งต้นที่ทราบแน่นอน ต่าง species และต่างสายพันธุ์ร่วมกัน

4. Raw mixed strain starter คือการใช้เชื้อตั้งต้นที่ทราบข้อมูลบางส่วนหรือไม่ทราบทั้งหมด ทั้ง species และสายพันธุ์มาใช้

โครงสร้างชุมชนของแบคทีเรีย (Bacteria community)

เป็นการศึกษาโครงสรางชุมชนจุลินทรีย์โดยศึกษา 2 พารามิเตอร์หลักคือ ชนิดของจุลินทรียและความหนาแนนหรือปริมาณของจุลินทรีย์ที่พบ เมื่อเทคนิคดานลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการเพาะเลี้ยงเชื้อไม่สามารถศึกษาชุมชนจุลินทรีย์ที่ซับซ้อนในตัวอย่างจากธรรมชาติได้ การศึกษาความหลายหลากของแบคทีเรียด้วยเทคนิค Metagenomic sequencing (Metagenome) จึงถูกพัฒนาขึ้น ซึ่งเป็นการศึกษาสารพันธุกรรมทั้งหมดของชุมชนจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมหนึ่ง ๆ เพื่อหาความสัมพันธ์ของกลุ่มประชากร และวิเคราะห์ถึงองค์ประกอบในความหลากหลายของระบบนิเวศ การศึกษาจุลินทรีย์โดยวิธี Metagenomics สามารถแบ่งตามวัตถุประสงค์ในการศึกษาหลักเป็น 2 ด้านคือ Function–based metagenomics เพื่อค้นหาสิ่งใหม่ ๆ ที่เป็นประโยชน์ซึ่งจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมนั้น ๆ ผลิตได้เช่น ยาปฏิชีวนะ เอนไซม์ หรือสารใหม่ และ Sequence–based Metagenomics ซึ่งเป็นการศึกษาเพื่อระบุชนิดของจุลินทรีย์ในกลุ่มประชากรที่ศึกษานั้น โดยการใช้ยีน 16S rRNA เป็นหลัก

Function–based metagenomics มีวัตถุประสงค์การศึกษาเพื่อค้นหาสิ่งที่จุลินทรีย์ในสังคมนั้น ๆ ผลิตได้เช่น เอนไซม์ ยาปฏิชีวนะหรือผลิตภัณฑ์ใหม่ที่ไม่สามารถแยกได้มาก่อนจากจุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ ซึ่งอาจทำโดยการสกัดโปรตีนหรือเมทาบอไลท์เพื่อนำไปศึกษาหรืออาศัยการสร้าง library จาก DNA ที่สกัดได้ จากนั้นนำไปคัดเลือกหาสารหรือโปรตีนใหม่ ๆ ที่แสดงออกโดยแบคทีเรียที่มีชิ้นดีเอ็นเอนั้น ๆ อยู่

Sequence –based metagenomics เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการศึกษาจุลินทรีย์โดยมีวัตถุประสงค์การศึกษาเพื่อระบุว่ากลุ่มประชากรที่ศึกษานั้นเป็นจุลินทรีย์ชนิดใดบ้างโดยการใช้ยีน 16S rRNA ในการวิเคราะห์โดยการออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้จำแนก species ของจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์ ซึ่งจะขึ้นอยู่กับความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสของยีนที่สร้าง 16S (Chotima Potisap and Rasana Wongratanacheewin, 2553)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปวีณา ดีกิจ และอทิพันธ์ เสียมไหม (2559) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในระหว่างการผลิตบูดูซึ่งเป็นอาหารหมักของภาคใต้ที่ทำจากปลาขนาดเล็กผสมเกลือแล้วหมักทิ้งไว้ โดยทำการศึกษาตลอดระยะเวลาการหมักเป็นเวลา 12 เดือน พบทั้งหมด 42 ไอโซเลท โดยแบคทีเรียที่มีบทบาทในช่วง 6 เดือนแรกเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* จำนวน 28 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในการหมักบูดูตลอดระยะเวลา 12 เดือน และกลุ่มอื่น ๆ ส่วนใหญ่ตรวจพบในช่วง 6 เดือนแรกของการหมัก ได้แก่ กลุ่ม *Staphylococcus* จำนวน 8 สายพันธุ์ *Ocenabacillus* จำนวน 2 สายพันธุ์ *Enterobactor* จำนวน 1 สายพันธุ์ และกลุ่ม *Acinetobacter* จำนวน 1 สายพันธุ์

Hwanhlem, et al. (2011) คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากปลาส้ม บนอาหาร MRS agar plate ที่เติมแคลเซียมคาร์โบเนต ($CaCO_3$) ได้ทั้งหมด 133 ไอโซเลท จากนั้นคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ที่มีความสามารถสูงที่สุดในการยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella sp.* จำนวน 4 เชื้อ เพื่อนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักปลาส้ม โดยเปรียบเทียบการหมักปลาส้มแบบวิธีธรรมชาติและการหมักแบบใช้ปลาส้ม (เก่า) เป็นกล้าเชื้อ (back-slopping) จากการศึกษาพบว่า คุณภาพของปลาส้ม สี กลิ่น เนื้อสัมผัส และการยอมรับของปลาส้มที่หมักด้วยกล้าเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติกไม่ต่างจากปลาส้มที่หมักแบบวิธีธรรมชาติและหมักแบบใช้ปลาส้ม (เก่า) เป็นกล้าเชื้อ

Müller, et al. (2002) ทำการศึกษาการหมักปลาส้มที่มีความเข้มข้นเกลือต่างกัน 2 ระดับ คือ การเติมความเกลือที่เข้มข้นต่ำประกอบด้วย 6 เปอร์เซ็นต์ และ 7 เปอร์เซ็นต์ และการเติมเกลือที่ความเข้มข้นสูงประกอบด้วย 9 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็วจาก pH 6 เป็น 4.5 ของการเติมเกลือที่ความเข้มข้นต่ำ ในทางตรงกันข้ามการเติมเกลือที่ความเข้มข้นสูงค่า pH ลดลงอย่างช้า ๆ หรือแทบจะไม่ลดลง และเมื่อนำไปวิเคราะห์หาแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธี Phenotypic tests, ITS-PCR, การหมักคาร์โบไฮเดรต และหาลำดับด้วย 16S rRNA พบว่าคือ *P. pentosaceus*, *L.s alimentarius/farciminis*, *W. confusa*, *L. plantarum* และ *Lactococcus garviae* นอกจากนี้ยังตรวจพบยีสต์ *Zygosaccharomyces rouxii* จากการเติมเกลือที่มีความเข้มข้นสูง

Nevry, et al. (2011) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและแบคทีเรียกรดแลคติกจาก Adjuevan ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่ทำจากปลาไอวอรี่ โดยทำการสังเกตเปรียบเทียบระหว่างปลาสดและปลาหมัก พบว่ามีความชื้น 69. และ 71.25 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 12.16 และ 12.36 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 21.21 และ 26.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติก

ที่แยกและจำแนกได้คือ *Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus* sp. และ *Streptococcus* sp.จากการศึกษาทำให้ทราบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบมีส่วนร่วมในการประมวลผลทางเทคโนโลยีและช่วยรักษาคุณภาพของ adjuevan

Saithong, et al. (2010) ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากปลาส้มได้ 2 สายพันธุ์คือ *L. plantarum* IFRPD P15 และ *L. reuteri* IFPRD P17 จากนั้นจึงนำมาใช้เป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติก จากการศึกษาพบว่า ต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* IFRPD P15 สามารถผลิตกรดได้สูงขึ้นหลังจากการหมักที่ 24 ชั่วโมง ทำให้ปลาส้มมีค่า pH ลดลง ส่วน *L. reuteri* IFPRD P17 พบว่า มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค และเมื่อนำทั้ง 2 สายพันธุ์มาผสมกัน (mixed cultures) พบว่า มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดีกว่าการใช้ต้นเชื้อบริสุทธิ์เพียงสายพันธุ์เดียว

Sanpa, S., Sanpa, S. and Suttajit, M. (2019) ได้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก 8 ตัวอย่างจากผู้ผลิตที่ต่างกันในจังหวัดพะเยา โดยทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ De man Rogosa Sharpe (MRS) ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุให้อาหารเน่าเสีย (food born pathogens) ได้แก่ *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Shigella* sp. และ *Vibrio* sp. และทดสอบความสามารถในการผลิตโปรตีนที่เป็นแบคเทอริโอซิน จากการศึกษาพบ *L. paraplantarum* และ *P. pentosaceus* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อมากที่สุด จึงนำมาใช้เป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิตปลาส้ม จากการศึกษาพบว่า ค่า pH ลดลงและมีปริมาณกรดแลคติกสูงในระหว่างการหมัก นอกจากนี้ยังสามารถลดระยะเวลาการหมักสั้นลงจาก 72 ถึง 96 ชั่วโมงเหลือ 48 ชั่วโมง

Tanasupawat and Komagata (1995) รายงานถึงบทบาทของแบคทีเรียกรดแลคติคในอาหารหมักที่อาศัยจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ในวัตถุดิบประเภทปลา เนื้อสัตว์ และพืชผัก พบว่า แบคทีเรียกรดแลคมีความสามารถในการผลิตกรดจึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้เกิดรสเปรี้ยวและเกิดผลิตภัณฑ์หมัก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง homofermentative strains ของ *Lactobacillus pentosus*, *L. plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบเป็นกลุ่มเด่นในอาหารหมักที่มีปริมาณเกลือต่ำ ในขณะที่พบสายพันธุ์ของ *P. halophilus* ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงและยังพบ *L. sake*, *Lactobacillus* spp., *P. acidilactici* และ *P. urinaeequi* อีกด้วย สำหรับ heterofermentative strains ที่พบได้แก่ *L. brevis*, *L. confusus*, *L. fermentum*, *L. vaccinostercus*, *Lactobacillus* spp. และ *Leuconostoc* spp.และในบางโอกาสพบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกลุ่มอื่นในสกุล *Staphylococcus*, *Enterococcus* และ *Halobacterium*

Yuliana, et al. (2018) ศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากรูซิป (rusip) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมักของประเทศอินโดนีเซียด้วยวิธีวิเคราะห์เบื้องต้นซึ่งเป็นวิธีที่สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการและศึกษาเชื้อที่เจริญในแต่ละช่วง จากการศึกษาพบแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 29 ไอโซเลท ประกอบด้วยกลุ่มของ *Leuconostoc* จำนวน 10 ไอโซเลท *Streptococcus* จำนวน 12 ไอโซเลท และกลุ่มของ *Lactococcus* จำนวน 7 ไอโซเลท โดยสามารถพบกลุ่มของ *Streptococcus* ในระยะแรกของการหมัก *Lactococcus* ในระยะกลางของการหมักและสามารถพบกลุ่มของ *Leuconostoc* ได้ตั้งแต่ระยะแรกจนถึงระยะสุดท้ายของหารหมัก

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว

1.1 กรวยกรอง (Funnel)
1.2 กระจกสไลด์
1.3 กระบอกตวง (Cylinder)
1.4 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)
1.5 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
1.6 ช้อนตักสารเคมี (Spatula)
1.7 แท่งแก้วคนสาร (Stirrer Rod)
1.8 บิวเรต (Burette)
1.9 บีกเกอร์ (Beaker)
1.10 ปิเปต (Pipette)
1.11 หลอดทดลอง

2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

2.1 กระดาษเช็ดเลนส์
2.2 กล้องจุลทรรศน์
2.3 ขวดฉีดน้ำ (Wash bottom)
2.4 ขาตั้งและแคมป์ (Stand & Clamp)
2.5 คิวเวทท์ (Cuvette)
2.6 เครื่องเขย่า (Shakers)
2.7 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance, 2 points)
2.8 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance, 4 points)
2.9 เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Auto pipette)
2.10 เครื่องตีบดผสมตัวอย่าง (Stomatcher)
2.11 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
2.12 เครื่องผสมสาร (Vortex)
2.13 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด (pH meter)

2.14 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

2.15 เครื่องวัดค่าสี (Chroma meter)

2.16 ดรอปเปอร์ (Dropper)

2.17 ตะเกียงแอลกอฮอล์

2.18 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Rack)

2.19 ตู้แช่แข็ง –20 องศาเซลเซียส (20oC Deep Freezer and Freezing)

2.20 ตู้ดูดควัน (Fume Hood)

2.21 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar Flow)

2.22 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

2.23 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow)

2.24 ตู้เย็น (Refrigerator)

2.25 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)

2.26 ถุง Stomatcher

2.27 ถุงพลาสติก (polyethylene)

2.28 ถุงมือ

2.29 แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic Stirring)

2.30 ปากคีบสแตนเลส (Forceps)

2.31 พาราฟิล์ม

2.32 ไมโครเวฟ (Microwave)

2.33 ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ

2.34 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

2.35 หลอด Centrifuge 15 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตร

2.36 ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)

2.37 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

2.38 Microcentrifuge tube

2.39 Petri Dish

2.40 Pipette Tip

2.41 Syring Filter

3. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.1 เปปซิน (Pepsin)

3.2 ผงวุ้น (Agar)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar base infusion agar (BD BBL™, France)

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ De Man, Rogosa and Sharpe agar (Himedia™, India)

3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin methylene blue (Himedia™, India)

3.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar (Himedia™, India)

3.7 อาหารเลี้ยงเชื้อ Manital salt agar (Himedia™, India)

3.8 อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller hinton broth (Himedia™, India)

3.9 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (Merck, Germany)

3.10 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (Himedia™, India)

3.11 อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract peptone dextrose broth (Himedia™, India)

3.12 แอลกอฮอล์ 70% และ 95%

3.13 Bile salt

3.14 Crystal violet

3.15 Hydrogenperoxide

3.15 Iodine

3.16 Phenolphalein

3.17 Safranin

3.18 Sodium choride

3.19 Sodium hydroxide

4. ยาปฏิชีวนะ

4.1 Amoxycillin (OXOID, UK

4.2 Ampicillin (OXOID, UK)

4.3 Cefotaxim (OXOID, UK)

4.4 Chloramphinicol (OXOID, UK)

4.5 Norfoxacin (OXOID, UK)

4.6 Penicillin G (OXOID, UK)

4.7 Vancomycin (OXOID, UK)

5. แบคทีเรียทดสอบ แบคทีเรียที่นำมาทดลองมี 5 สายพันธุ์ดังตาราง 5

ตาราง 5 แบคทีเรียทดสอบ

ชื่อแบคทีเรีย	รหัสเชื้อ
Escherichia coli	DMST4212
Bacillus cereus	DMST5040
Shigella flexneri	DMST4423
Listeria monocytogenes	DMST17303
Salmonella Typhi	DMST22842

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ปลาส้ม

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ปลาส้ม โดยการเก็บรวบรวมตัวอย่างจากตลาดสดจังหวัดพะเยาในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเมษายน พ.ศ.2563 ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกตามวิธีการของผุสดี ตังวัชรินทร์ และคณะ (2559) (Murray et al., 1994; Axelsson, 1993) โดยชั่งตัวอย่างปลาส้ม 25 กรัม ใส่ลงในสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 225 มิลลิลิตร streak plate บนอาหาร de man Rogosa and Sharp agar (MRS), Himedia, India ที่มี bromocresol green 0.004 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเขียวเป็นสีเหลือง นำไป restreak บนอาหาร MRS agar เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ตรวจสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการย้อมสีแกรมตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการสร้างเอนไซม์คะตาเลส โดยเลือกเชื้อที่ติดสีแกรมบวกและไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส จากนั้นเก็บรักษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ในอาหาร MRS broth ที่เติม glycerol ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไอโซเลทที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกไปศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกต่อไป

2. การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก

2.1 ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมา streak ลงบนจานอาหาร Blood agar ที่ผสม human blood บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนอาหารว่าเป็นกลุ่มใด กลุ่ม Alpha-hemolysis เกิดวงใสสีเขียวรอบโคโลนี กลุ่ม Beta-hemolysis มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ เกิดวงใสสีเหลืองรอบโคโลนี หรือกลุ่ม Gamma-hemolysis โคโลนีของเชื้อไม่มีเปลี่ยนแปลง (ภณิดา เกื้อสุวรรณ และคณะ, 2557) (ภาพ 4)

ภาพ 4 การสลายเม็ดเลือดแดง

หมายเหตุ: ก) กลุ่ม Alpha-hemolysis เกิดวงใสสีเขียวรอบโคโลนี ข) กลุ่ม Beta-hemolysis มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ เกิดวงใสสีเหลืองรอบโคโลนี และ ค) กลุ่ม Gamma-hemolysis โคโลนีของเชื้อไม่มีเปลี่ยนแปลง

ที่มา: Tankeshwa, 2022

2.2 ทดสอบความสามารถในการหมัก

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหาร MRS broth ที่มีหลอดดักก๊าซ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดก๊าซและวัดค่า pH โดยถ้าหลอดที่ไม่มีก๊าซเกิดขึ้นจะเป็น Homofermentative ส่วนหลอดที่มีก๊าซเกิดขึ้นเป็น Heterofermentative (ภณิดา เกื้อสุวรรณ และคณะ, 2557)

2.3 ทดสอบความสามารถในการทนกรด

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหาร MRS broth 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสออก เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไป 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับความขุ่นให้ได้ค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.9 (OD_{600} = 0.9) ซึ่งเทียบได้กับเชื้อจำนวน $1.5x10^9$ CFU/ml นำเชื้อที่ได้เติมลงในสารละลายบัฟเฟอร์ Phosphate–buffer saline (PBS) ที่มี pepsin (0.3 เปอร์เซ็นต์, w/v) ที่ปรับให้มีค่า pH เท่ากับ 2.0 และ 3.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมา spread นับจำนวนเชื้อที่เหลือรอดบนอาหาร MRS agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง (ภณิดา เกื้อสุวรรณ และคณะ, 2557)

2.4 ทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหาร MRS broth 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสออก เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไป 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับความขุ่นให้ได้ 0.9 (OD_{600} = 0.9) นำเชื้อที่ได้เติมในอาหาร MRS broth ที่มีเกลือน้ำดี (Bile salt) เข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ โดยมี น้ำกลั่นที่ไม่เติม Bile salt powder เป็นชุดควบคุม ทำการเก็บเชื้อที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมา spread บนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญของเชื้อบนผิวหน้าอาหาร ซึ่งเกิดกิจกรรม Bile salt hydrolase (BSH) ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ (ภณิดา เกื้อสุวรรณ และคณะ, 2557)

2.5 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

โดยวิธี Disc diffusion นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่เจริญใน MRS broth อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นเชื้อเท่ากับ 10^6 CFU/ml มา swab ลงบนอาหาร MRS agar จากนั้นวางแผ่นยาปฏิชีวนะ (Antibiotic discs) Oxoid, UK ได้แก่ Vancomycin, Chloramphanicol, Cefotaxime, Norfoxacin, Ampicillin, Penicillin G และAmoxycillin ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง วัดพื้นที่ยับยั้งยาปฏิชีวนะแต่ละตัวแบ่งเป็น 3 ระดับ ไว (susceptible – S) ปานกลาง (intermediate – I) และต้านทาน (resistant – R) อิงแผนผังมาตรฐาน อนึ่งยาปฏิชีวนะแต่ละตัวมีแผนผังมาตรฐานแตกต่างกัน (พนิตนาฏ อู่พุฒินันท์ และวราภรณ์ กุศลารักษ์ 2563; Kaktcham, 2012; CLSI, 2016)

2.6 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร

ใช้วิธี Agar well diffusion โดยใช้ไม้พันสาลีจุ่มเชื้อแบคทีเรียก่อโรคระบบทางเดินอาหารใน Nutrient agar (NA) ที่ปรับความขุ่น 10^6 CFU/ml เกลี่ยบน Muller Hinton agar (MHA) แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่ใช้ในการทดลองได้แก่ *Escherichia coli* DMST4212, *Bacillus cereus* DMST5040, *Shigella flexneri* DMST4423, *Listeria monocytogenes* DMST17303 และ *Salmonella* Typhi DMST22842 จากนั้นเจาะหลุมบน MHA นำส่วนใสจากการปั่นเหวี่ยงของแบคทีเรียกรดแลคติกหยอดใส่หลุมบน MHA หลุมละ 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตพื้นที่ใสตรวจผลการยับยั้งด้วยการวัดขนาดวงใสการยับยั้ง (clear zone) และรายงานผลเป็นประสิทธิภาพการยับยั้ง (ภณิดา เกื้อสุวรรณ และคณะ, 2557)

3. การระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกที่คัดเลือกได้ไปสกัดดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer 27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3' และ 1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3' (Gibthai, Thailand) จากนั้นทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็น โดยใช้ primer 785F 5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'907R 5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3' (Gibthai, Thailand) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ GenBank โดยโปรแกรม BLAST analysis และทำแผนภูมิต้นไม้ด้วยโปรแกรม CIPRES บนเว็บไซต์ www.phylo.org โดยใช้เครื่องมือ RAxML-HPC BlackBox

4. การเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ลงในปลาส้ม

ทำการศึกษาการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตปลาส้มของแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 2 ไอโซเลท ประกอบด้วยคือ *Pediococcus acidilactici* ไอโซเลท BPS4 และ *Lactiplantibacillus plantarum* ไอโซเลท BPS6 ลงในปลาส้ม โดยวิธีการเตรียมเชื้อเริ่มจากนำ stock ที่เก็บไว้ในตู้ –20 องศาเซลเซียส ทำการ refresh ในอาหาร MRS Broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับความขุ่นให้ได้ค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.8 (OD 600 = 0.8) หรือเทียบเท่า McFarland Standard เบอร์ 0.5 ซึ่งได้เชื้อจำนวน $1.5x10^8$ CFU/ml จากนั้นนำเชื้อที่ได้เติมลงในปลาส้มชิ้น ปริมาณ 10^8 CFU/g โดยเติมปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยแบ่งการทดลองเป็น 4 ชุดการทดลอง (ตาราง 6)

ตาราง 6 รายละเอียดการแบ่งชุดการทดลองการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ลงในปลาส้ม

ชุดการทดลอง	ต้นเชื้อที่เติมลงในปลาส้ม
1	*P. acidilactici*
2	*L. plantarum*
3	*P. acidilactici* + *L. plantarum*
4	ชุดควบคุม

4.1. การศึกษา Chemical analysis นำตัวอย่างปลาส้ม ตัวอย่างละ 10 กรัม ใส่ลงใน stomacher bag เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นด้วยเครื่อง stomacher 225 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำไปวัดค่า pH และตรวจเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกด้วยวิธีไตเตรต โดยใช้ 0.1M NaOH มี Phenolphthalein เป็นอินดิเคเตอร์ (AOAC, 2000) นำค่าไตเตรทที่ได้ไปคำนวนหาเปอร์เซ็นกรดแลคติก ตามสมการ

เปอร์เซ็นต์กรดแลคติกเท่ากับ

$$\frac{\text{น้ำหนักโมเลกุลของกรดแลคติก} \times \text{ปริมาตร NaOH ที่ใช้} \times \text{ความเข้มข้นของ NaOH} \times 100}{1000 \times \text{ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้}}$$

4.2 การศึกษา Microbial analysis นำตัวอย่างปลาส้ม ตัวอย่างละ 25 กรัม ใส่ลงใน stomacher bag เติม NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นด้วยเครื่อง stomacher 225 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำไปทำการเจือจาง 10 เท่าลำดับส่วน (10 fold dilution) และนำไปตรวจสอบหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียตามตาราง 7 (Rantsiou, et al., 2005; Shen, et al., 2017)

ตาราง 7 แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาในตัวอย่างปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรีย	อาหาร	อุณหภูมิบ่ม (°C)	เวลาบ่ม (hr)
Lactic acid bacteria	de Man Rogose Sharpe agar	37	48
Total bacteria	Plate Count Agar	35	48
Staphylococcus aureus	Manitol salt agar	35	48
Escherichia coli	Eosin Methylene blue	35	24
Salmonella Typhi	MacConkey agar	35	24

5. การทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคต่อตัวอย่างปลาส้ม

นำตัวอย่างปลาส้มจากแต่ละชุดการทดลองที่หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน มาทำให้สุก โดยการทอดและให้ผู้ทดสอบชิมอย่างน้อย 30 คน โดยให้คะแนนแบบ 9-point hedonic scale (1=ไม่ชอบมากที่สุด, 2=ไม่ชอบมาก, 3=ไม่ชอบปานกลาง, 4=ไม่ชอบเล็กน้อย, 5=เฉยๆ, 6=ชอบเล็กน้อย,7=ชอบปานกลาง, 8=ชอบมาก, 9=ชอบมากที่สุด) โดยให้ประเมินความชอบเกี่ยวกับคุณลักษณะของ รสชาติ กลิ่น สี และเนื้อสัมผัส โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกไม่สมบูรณ์ Completely Randomized Block Design (RCBD) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's New Multiple-Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

6. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหาร (Proximate analysis)

เก็บตัวอย่างปลาส้ม ในวันที่ 3 ที่ได้จากการหมักในการทดลองที่ 4 มาตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหาร โดยวิธีการของ AOAC โดยทำการศึกษาวิเคราะห์หาองค์ประกอบต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ (AOAC, 2005)

6.1 ปริมาณความชื้น นำครูซิเบิลเข้าตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2–3 นาที จากนั้นนำไปใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น นำมาชั่งน้ำหนัก ชั่งตัวอย่างใส่ครูซิเบิลให้ได้น้ำหนัก 1–2 กรัม แล้วนำเข้าอบที่ Hot air oven ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก ทำการคำนวนหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น ตามสมการ

การคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{(a-b)}{W} \times 100$$

เมื่อ a = น้ำหนักของอาหารก่อนอบแห้ง

b = น้ำหนักของอาหารหลังอบแห้ง

W = น้ำหนักของอาหารก่อนอบแห้ง

หรือ เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง (DM) = 100 – เปอร์เซ็นต์ความชื้น

6.2 ปริมาณเถ้า ชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักจำนวน 5 กรัม ใส่ในครูซิเบิลที่ผ่านการเผาและทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว นำตัวอย่างไปเผาโดยใช้ hot plate ในตู้ดักควันจนกระทั่งตัวอย่างไม่มีควัน จากนั้นนำตัวอย่างไปเผาต่อในเตาเผาเถ้า ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง หรือ จนกระทั่งได้เถ้าสีขาว ตั้งทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักเถ้าที่ได้คำนวณหาปริมาณเถ้า ตามสมการ

$$\text{การคำนวณ} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้าหลังเผา (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

6.3 ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl method ชั่งตัวอย่างโดยบดเป็นชิ้นเล็ก ๆ 0.5 ถึง 1.0 กรัม ลงในหลอดย่อยจากนั้นเติม K_2SO_4 10 กรัม และ $CuSO{\cdot}5H_2O$ 0.5 กรัม และใส่ glass bead 2–3 เม็ด จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 10 – 15 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอด นำไปใส่บนเตาย่อยที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง 15 นาทีย่อยจนกระทั่งได้สารละลายใส รอจนตัวอย่างเย็น นำฟลาสก์ที่บรรจุกรดบอริก 4 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 30 มิลลิลิตร และหลอดตัวอย่างที่ย่อยและเย็นแล้วไปเข้าเครื่องปั่นหาไนโตรเจน นำฟลาสก์ที่มีกรดบอริก 4 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการกลั่นในข้อ 3.4 ไปไทเทรตกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เติมอินดิเคเตอร์ 2–3 หยด จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนจึงนำไปคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนและปริมาณโปรตีนตามสมการ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)} = \frac{14 \times (V1-V2) \times \text{Normality of HCl (mol/L)} \times 100}{\text{Dry weigth of sample (mg)}}$$

โดยที่ V1 = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไทเทรตตัวอย่าง

V2 = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไทเทรตน้ำกลั่น (Blank)

Dry weight of sample = น้ำหนักตัวอย่างโดยน้ำหนักแห้ง โดยหักส่วนของน้ำหนักของน้ำทราบได้จากการวิเคราะห์ความชื้น

ปริมาณโปรตีน (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง) = % N x F

โดยที่ F = Factor ของการคำนวณโปรตีน 6.25

6.4 ปริมาณไขมัน ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งประมาณ 5 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 ใส่ตัวอย่างในทิมเบิล (thimble) ปิดด้วยสำลีที่สกัดเอาไขมันออกแล้ว (defatted cotton wood) จากนั้นใส่ทิมเบิลลงในชุดแยกสกัด (extraction unit) ของเครื่องมือวิเคราะห์ เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ ประมาณ 250 มล. ลงในขวดก้นแบน หรือ soxhlet flast ต่อเข้ากับชุดสกัดใช้เวลาในการสกัดไขมันนาน 6–8 ชั่วโมง ระเหยเอาปิโตรเลียมอีเทอร์ในขวดออกให้หมด นำไขมันที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 100±2 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักของน้ำมันที่ได้จากการสกัด คำนวณหาปริมาณไขมัน ตามสมการการคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักของน้ำมันที่สกัดได้ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

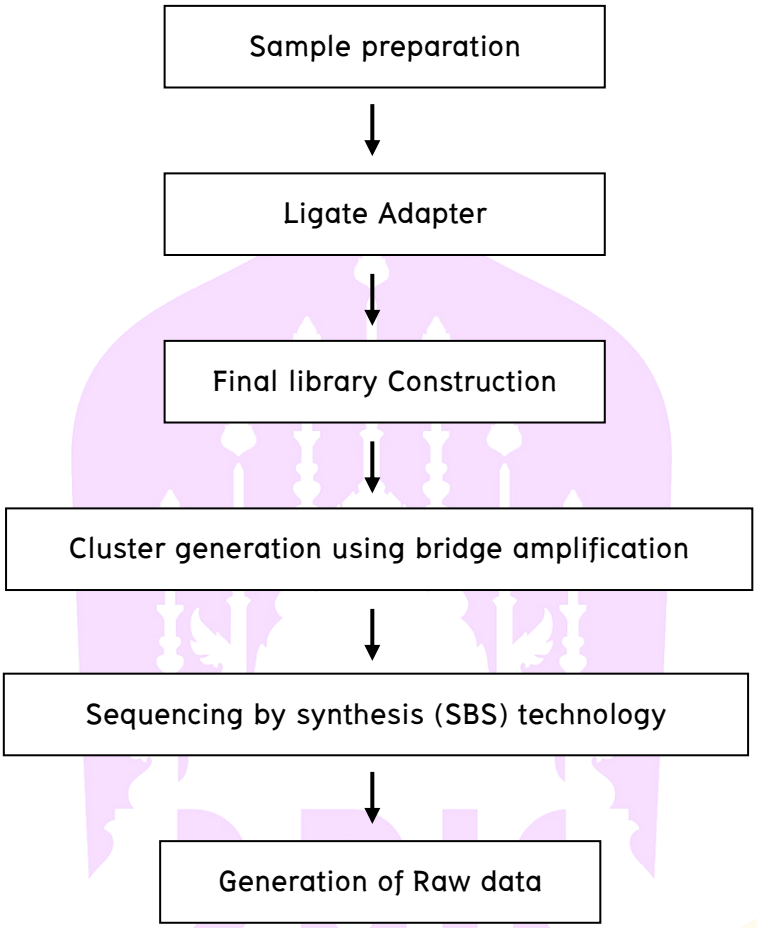
6.5 ปริมาณไฟเบอร์ ทำการศึกษาโดยชั่งตัวอย่างที่ปราศจากความชื้นและสกัดไขมันออกแล้ว (เมื่ออบแห้งได้น้ำหนักประมาณ 1 กรัม) ใส่ลงในครูซิเบิล จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Hot extraction unit เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.128 โมลาร์ ปริมาณ 150 มิลลิลิตร. ลงในครูซิเบิล เติม octanol จำนวน 2–3 หยด เพื่อป้องกันการเกิดฟองเมื่อความร้อนสูง จากนั้นลดความร้อนลงและต้มเป็นเวลา 30 นาที ทำการกรอง จากนั้นเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.223 โมลาร์ ปริมาณ 150 มิลลิลิตร. ทำการกรองและล้างด้วยน้ำร้อนอีก 3 ครั้ง แล้วกรองจนแห้ง ล้างสารตัวอย่างที่อยู่ในครูซิเบิลด้วยอะซีโตนในเครื่อง cold extraction unit ทำการอบ ครูซิเบิลที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในโถอบแห้งให้เย็นและชั่งน้ำหนัก (W_1) จากนั้น เผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นและชั่งน้ำหนัก (W_2) การคำนวณเปอร์เซ็นต์ปริมาณเส้นใยอาหาร

$$\frac{\text{น้ำหนักแห้งของกาก } (W_1) - \text{น้ำหนักของเถ้า } (W_2)}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

6.6 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต การหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตโดยวิธีการคำนวนจะต้องหาองค์ประกอบทางเคมีอย่างอื่นเป็นร้อยละก่อน ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า แล้วนำค่าทั้งหมดดังกล่าวมารวมกัน ผลต่างระหว่าง 100 กับค่ารวมของความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า จะเป็นค่าของคาร์โบไฮเดรต ตามสมการ ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ) = 100 – (ความชื้น + โปรตีน + ไขมัน + เยื่อใย + เถ้า)

7. ค่าสี L*a*b* โดยวัดเป็นค่า L* a* และ b* โดยใช้เครื่องโครมามิเตอร์ (Chroma meter) จิ้มที่ปลาส้มให้ทั่วตัวอย่าง 5 จุด ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ จดบันทึกค่า L* a* และ b* ที่ได้ ซึ่งค่า L* คือค่าความสว่างมีค่าระหว่าง 0 – 100 หรือสีดำถึงสีขาว ค่า a*คือค่า (+) สีแดง หรือ (–) สีเขียว และค่า b* คือ ค่า (+) สีเหลือง หรือ (–) สีน้ำเงิน

8. Metagenomic คือการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่แยกและวิเคราะห์จากสิ่งมีชีวิตทั้งหมด (โดยทั่วไปคือจุลินทรีย์) ในกลุ่มตัวอย่าง โดยวิธีการทางเมต้าจีโนมิกส์ Next Generation Sequencing ด้วยเครื่อง illumina โดยใช้ชุดคิท Herculase II Fusion DNA Polymerase Nextera XT Index V2 Kit (Macrogen, Korea) และทำการส่งตรวจกับบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังภาพ



ภาพ 5 ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยวิธี Metagenomic

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ปลาส้ม 8 ตัวอย่าง ด้วยการคัดแยกบนอาหาร De man Rogosa Sharpe (MRS) การย้อมสีแกรม ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส พบแบคทีเรียที่เป็นแบคทีเรียแลคติคทั้งหมด 45 ไอโซเลท โดยเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม 18 ไอโซเลท และรูปร่างท่อน 27 ไอโซเลท ไม่มีกิจกรรมเอนไซม์คะตาเลส

การศึกษาคุณสมบัติการเป็นหัวเชื้อโพรไบโอติก

1. การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity)

จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ 45 ไอโซเลท พบว่ามี 10 ไอโซเลท ที่มีกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจัดอยู่ในกลุ่ม Alpha-hemolysis (α) 35 ไอโซเลท ไม่มีกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจัดอยู่ในกลุ่ม Gamma-hemolysis (γ) และไม่พบกลุ่ม Beta-hemolysis ซึ่งแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติด้านความปลอดภัยต่อร่างกายมนุษย์

2. ความสามารถในการหมัก

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงทั้ง 35 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการหมัก โดยสังเกตการเกิดก๊าซ และทำการวัดค่า pH จากการทดลองพบมี 16 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตก๊าซได้ เป็นการหมักแบบ Heterofermentative มีค่า pH อยู่ระหว่าง 3.8 ถึง 4.3 และ 19 ไอโซเลท ไม่สามารถผลิตก๊าซได้เป็นการหมักแบบ Homofermentative มีค่า pH อยู่ระหว่าง 3.6 ถึง 5.2

3. ความสามารถในการทนกรดและเกลือน้ำดี

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการหมักแบบ Homofermentative 19 ไอโซเลท ที่คัดเลือกได้มาทดสอบความสามารถในการทนกรด พบว่ามี 5 ไอโซเลท ได้แก่ BPS2, BPS4, BPS5, BPS6 และ BPS7 สามารถรอดชีวิตและมีจำนวนมากกว่า 10^5 CFU/ml ในสภาวะกรดที่

pH2 และ pH3 และสามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง

4. ความไวต่อยาปฏิชีวนะ

นำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลทที่ทนต่อกรดและเกลือน้ำดีมาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะพบว่าทั้ง 5 ไอโซเลท มีความไว (Susceptible) ต่อยา Chloramphanicol, Cefotaxime, Ampicillin, Penicillin G และ Amoxycilling แต่ทน (Resistance) ต่อยา Vancomycin และ Norfoxacin (ตาราง 8)

ตาราง 8 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลท ด้วยวิธี Disc diffusion

Antibiotic	VA	C	CTX	NOR	AMP	P	AML
Conc. of antibiotic	30 µg	30 µg	30 µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg
Isolate							
BPS2	R	S	S	R	S	S	S
BPS4	R	S	S	R	S	S	S
BPS5	R	S	S	R	S	S	S
BPS6	R	S	S	R	S	S	S
BPS7	R	S	S	R	S	S	S

หมายเหตุ: VA–Vancomycin, C–Cefotaxime, CTX–Chloramphanicol, NOR–Norfoxacin, AMP–Amoxycillin, P–Penicillin G และ AMP–Ampicillin (Kaktcham, 2012: CLSI, 2016) Inhibition Zone Diameters are means from triplicate determinations; Diameters of the discs are inclusive (6mm); S...Sensitive; I...Intermediate; R...Resistant.

5. ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร

แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลท ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ได้แก่ *E. coli* DMST4212, *B. cereus* DMST5040, *S. flexneri* DMST4423, *L. monocytogenes* DMST17303 และ *Salmonella* Typhi DMST22842 (ตาราง 9)

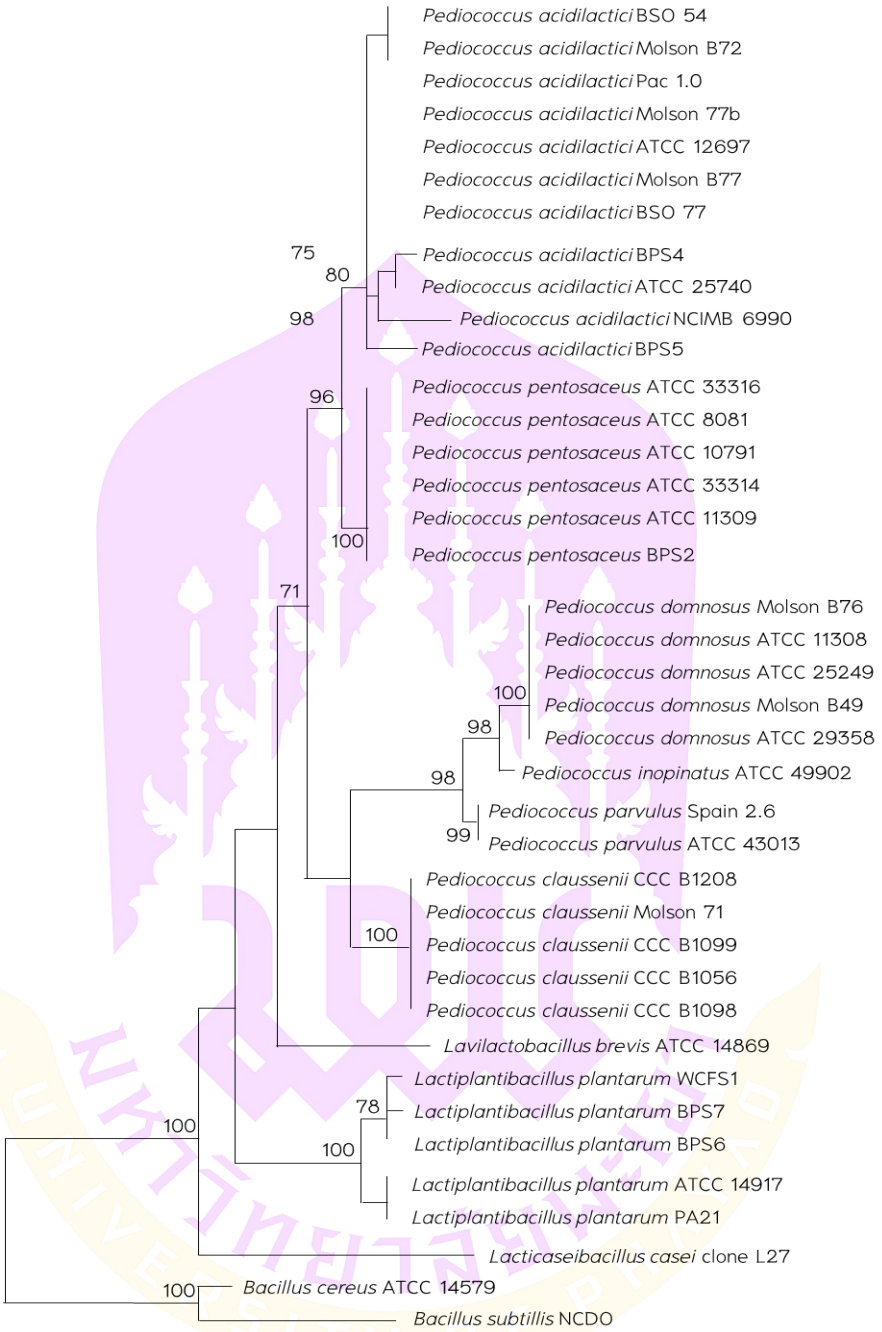
ตาราง 9 ความกว้างของโซนการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลท ด้วยวิธี Agar well diffusion (มิลลิเมตร)

	ความกว้างของโซนยับยั้ง (มิลลิเมตร)				
Isolate	*E.coli*	*B.cereus*	*S.flexneri*	*L.monocytogenes*	*Salmonella* Typhi
BPS2	–	–	–	–	–
BPS4	–	–	–	–	–
BPS5	–	–	–	–	–
BPS6	–	–	–	–	–
BPS7	–	–	–	–	–

หมายเหตุ: – คือ ไม่มีการยับยั้ง

การระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก

จำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน 16S rRNA โดยใช้ primer 27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3' และ 1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3' จากนั้นนำไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า BPS2 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Pediococcus pentosaceus* strain ATCC 33316, ATCC 8081, ATCC 10791, ATCC 33314 และ ATCC 11309 ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ BPS4 และ BPS5 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *P. acidilactici* strain BSO54, Molson B72, Pac 1.0, Molson 77, ATCC12697, Molson B77, BSO 77, ATCC 25740 และ NCIMB 6990 ที่ 98 เปอร์เซ็นต์ และ BPS6, BPS7 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Lactiplantibacillus plantarum* strain WCFS1, ATCC14917 และ PA21 ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยแสดงในแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพ 6)



ภาพ 6 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ศึกษา (*Pediococcus pentosaceus* BPS2, *Pediococcus acidilactic* BPS4, *Pediococcus acidilactic* BPS5, *Lactiplantibacillus plantarum* BPS6 และ *Lactiplantibacillus plantarum* BPS7) กับ reference strains แบบ Maximum likelihood

การเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ลงในปลาส้ม

จากการศึกษาการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทำการเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 2 ไอโซเลทที่มีคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกที่ดีที่สุด ได้แก่ *P. acidilactici* ไอโซเลท BPS4 และ *L. plantarum* ไอโซเลท BPS6 ลงในปลาส้ม ปริมาณ 10^8 CFU/g หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 ชุด ดังนี้ ชุดการทดลองที่ 1 เติมแบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อเดี่ยว *P. acidilactici* (BPS4), *L. plantarum* (BPS6) ชุดการทดลองที่ 2 เติมแบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อผสม *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* (BPS4+BPS6) และชุดการทดลองที่ 3 ชุดควบคุมซึ่งไม่ได้เติมแบคทีเรียกรดแลคติก

1. การหาค่า pH ระหว่างการหมักปลาส้ม

การเปลี่ยนแปลงค่า pH ระหว่างกระบวนการหมักปลาส้มพบว่าก่อนกระบวนการหมักวันที่ 0 ปลาส้มมีค่า pH อยู่ที่ 5.70–5.75 หลังจากหมักผ่านไป 2 วัน ค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็วที่ 4.55–4.69 และมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องในวันที่ 3, 4 และ 5 ซึ่งมีค่า pH อยู่ระหว่าง 4.41–4.54, 4.28–4.41 และ 4.24–4.32 ตามลำดับ โดยในวันที่ 4 และ 5 ค่า pH เริ่มมีความคงที่ เมื่อพิจารณาค่า pH ที่ได้พบว่า ปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *P. acidilactici* ให้ค่า pH ต่ำที่สุด ในขณะที่ปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *L. plantarum* และเชื้อผสม *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* พบว่า ค่า pH ที่ได้ไม่แตกต่างกัน และปลาส้มไม่มีการเติมต้นเชื้อให้ค่า pH สูงที่สุด (ตาราง 10)

ตาราง 10 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ระหว่างการหมักปลาส้ม

Day	pH			
	P. acidilactici	*L. plantarum*	*P. acidilactici* + *L. plantarum*	Control
0	5.73±0.01^{bc}	5.75±0.01^{c}	5.70±0.01^{a}	5.72±0.01^{ab}
1	4.86±0.00^{a}	5.03±0.01^{c}	4.98±0.00^{b}	5.08±0.01^{d}
2	4.55±0.01^{a}	4.69±0.01^{c}	4.65±0.01^{b}	4.67±0.01^{d}
3	4.43±0.01^{a}	4.54±0.01^{c}	4.41±0.00^{a}	4.47±0.00^{b}
4	4.28±0.01^{a}	4.34±0.01^{b}	4.33±0.00^{b}	4.41±0.01^{c}
5	4.24±0.00^{a}	4.29±0.01^{b}	4.27±0.01^{b}	4.32±0.01^{c}

2. การตรวจสอบปริมาณกรดแลคติกระหว่างการหมักปลาส้ม

จากการตรวจวัดปริมาณของกรดแลคติกพบว่าปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก โดยวันที่ 0 มีปริมาณกรดแลคติก 0.08–0.11 (v/v) จากนั้นจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่การหมักในวันที่ 1, 2, และ 3 มีปริมาณกรดแลคติกอยู่ระหว่าง 0.11–0.16 (v/v), 0.19–0.25 (v/v) และ 0.24–0.32 (v/v) ตามลำดับ เมื่อเข้าสู่การหมักในวันที่ 4 และ 5 ปริมาณกรดแลคติกจะเริ่มคงที่โดยปริมาณกรดแลคติกที่พบมีค่าอยู่ระหว่าง 0.29–0.34 (v/v) เมื่อพิจารณาปริมาณกรดแลคติกที่ได้ พบว่าปลาส้มแต่ละชุดการทดลองมีปริมาณกรดแลคติกไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในตาราง 11

ตาราง 11 ปริมาณกรดแลคติกจากปลาส้ม (เปอร์เซ็นต์)

Day	Percentage of Lactic acid			
	P. acidilactici	*L. plantarum*	*P. acidilactici* + *L. plantarum*	Control
0	0.11 ± 0.01^{ab}	0.10 ± 0.01^{ab}	0.12 ± 0.01^{b}	0.08 ± 0.01^{a}
1	0.16 ± 0.01^{b}	0.14 ± 0.01^{ab}	0.15 ± 0.01^{b}	0.11 ± 0.00^{a}
2	0.22 ± 0.01^{ab}	0.21 ± 0.01^{a}	0.25 ± 0.01^{b}	0.19 ± 0.01^{a}
3	0.28 ± 0.02^{ab}	0.27 ± 0.01^{a}	0.32 ± 0.01^{b}	0.24 ± 0.02^{a}
4	0.32 ± 0.01^{ab}	0.30 ± 0.01^{a}	0.34 ± 0.00^{b}	0.29 ± 0.01^{a}
5	0.34 ± 0.01^{b}	0.33 ± 0.01^{ab}	0.36 ± 0.01^{b}	0.31 ± 0.00^{a}

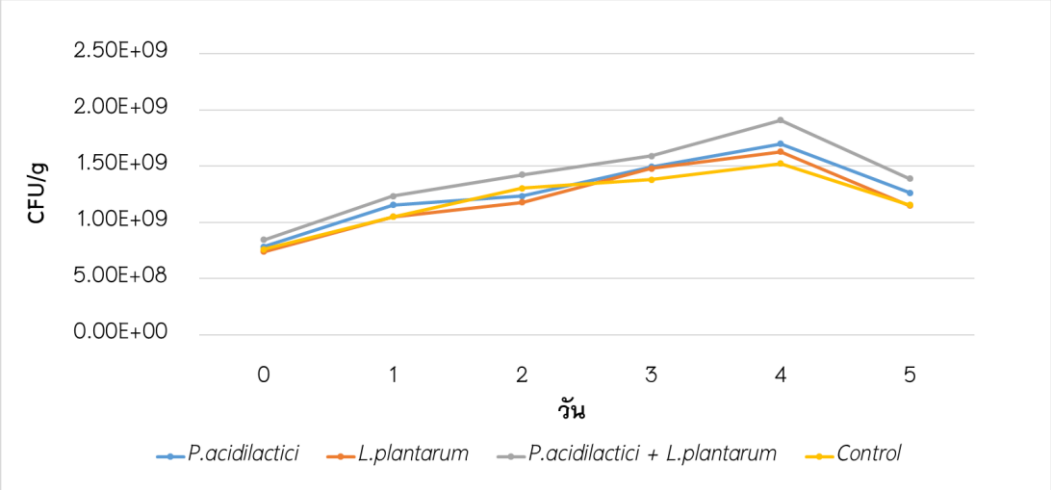
การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาในตัวอย่างปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์

เก็บตัวอย่างปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดเดี่ยวและผสมในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ของการหมัก นำแต่ละตัวอย่างไปศึกษา Microbial analysis โดยแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ Lactic acid bacteria, Total bacteria, *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* Typhi โดยใช้ selective medium

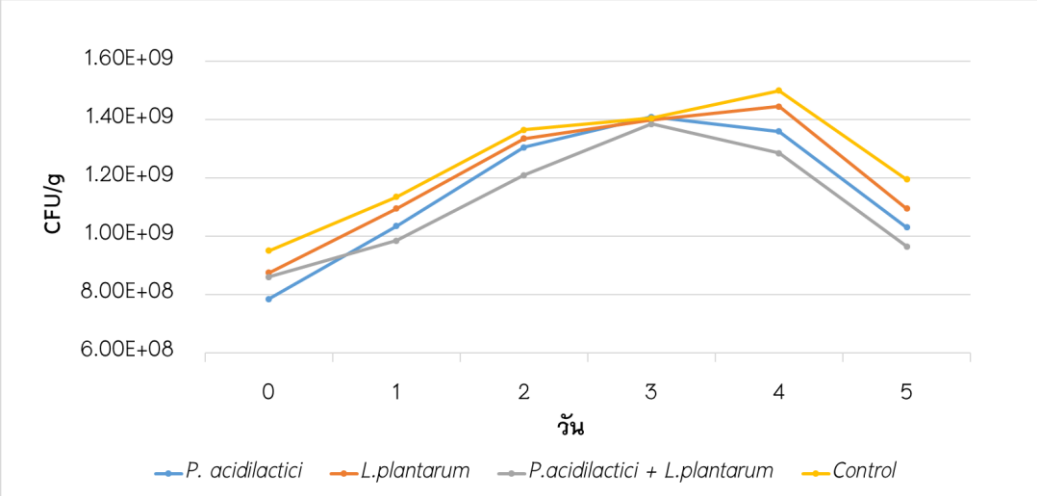
จากการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดเดี่ยวและผสม พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากวันที่ 0 ถึงวันที่ 4 และลดลงในวันที่ 5 (ภาพ 9) ในวันที่ 4 ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มมากที่สุดนั้น พบว่าชุดการทดลองที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสม *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมากที่สุด เท่ากับ 1.91×10^9 CFU/g รองลงมา คือ การเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบเดี่ยว *P. acidilactici* และ *L. plantarum* มีค่าเท่ากับ 1.70×10^9 CFU/g 1.63×10^9 CFU/g ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่ไม่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกน้อยที่สุดคือ 1.53×10^9 CFU/g

จากการตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างปลาส้มพบว่า จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องหลังจากหมักผ่านไป 1 วัน และในวันที่ 4 พบว่า มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มมากที่สุด โดยชุดการทดลองที่ไม่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ พบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมากที่สุด เท่ากับ 1.5×10^9 CFU/g รองลงมาคือ สายพันธุ์ *L. plantarum* และ *P. acidilactici* มีค่าเท่ากับ 1.4×10^9 CFU/g และ 1.36×10^9 CFU/g ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสม *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* พบว่ามีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยที่สุดเท่ากับ 1.29×10^9 CFU/g และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักในวันที่ 5 พบว่า จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลง (ภาพ 10)

จากการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียก่อโรค *Escherichia coli*, พบเชื้อ *E. coli* ก่อนกระบวนการหมักในวันที่ 0 ในทุกตัวอย่างทดสอบ โดย *P. acidilactici*, *L. plantarum*, *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* และ ชุดควบคุม พบจำนวนเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 3.58×10^4 CFU/g, 3.28×10^4 CFU/g, 3.55×10^4 CFU/g และ 5.10×10^5 CFU/g ตามลำดับ หลังจากผ่านการหมักไป 1 วัน พบว่าชุดการทดลองที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบ 1 สายพันธุ์และแบบผสมไม่พบเชื้อ *E. coli* ส่วนชุดการทดลองที่ไม่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์พบ 3.65×10^4 CFU/g และหลังจากผ่านการหมักไป 2 วัน พบว่า ทุกชุดทดสอบไม่พบเชื้อ *E. coli* จนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก เมื่อตรวจสอบเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* Typhi. พบว่าไม่พบในตัวอย่างปลาส้ม



ภาพ 7 จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างปลาส้ม



ภาพ 8 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดจากตัวอย่างปลาส้ม

คุณภาพทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ปลาส้ม

ตรวจสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ปลาส้มของชุดการทดลองที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติกและชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย โดยนำมาทำให้สุกด้วยการชุปแป้งทอดและตรวจสอบคุณภาพโดยให้ผู้ตรวจสอบชิมจำนวน 30 คน คือ นิสิต อาจารย์ บุคลากร แม่บ้าน และพนักงานรักษาความปลอดภัยของคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา เกณฑ์การให้คะแนนแบบ 9-point hedonic scale, 1=ไม่ชอบมากที่สุด, 2=ไม่ชอบมาก, 3=ไม่ชอบปานกลาง, 4=ไม่ชอบเล็กน้อย, 5=เฉย ๆ , 6=ชอบเล็กน้อย, 7=ชอบปานกลาง, 8=ชอบมาก และ 9=ชอบมากที่สุด โดยประเมินความชอบเกี่ยวกับคุณลักษณะของสี กลิ่น รสชาติ รสเปรี้ยว เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม

จากการประเมินคะแนนความพึงพอใจของผู้บริโภคด้านสีของตัวอย่างปลาส้มพบว่าคะแนนของทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยผู้บริโภคให้คะแนนชุดการทดลองปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสม *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* มากที่สุดเท่ากับ 7.72 คะแนน รองลงมาคือชุดการทดลองปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *P. acidilactici*, ชุดควบคุม และ *L. plantarum* เท่ากับ 7.52, 7.20 และ 7.08 ตามลำดับ

จากการประเมินความพึงพอใจของผู้บริโภคด้านกลิ่นของตัวอย่างปลาส้มพบว่าผู้บริโภคพึงพอใจกลิ่นของชุดการทดลองที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสม *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* และที่เติมเชื้อ *P. acidilactici* มากที่สุด โดยได้รับคะแนนความพึงพอใจเท่ากันคือ 7.40 รองลงมาคือชุดการทดลองที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *L. plantarum* มีคะแนนเท่ากับ 7.24 และคะแนนความพึงพอใจด้านกลิ่นน้อยที่สุดคือ ชุดควบคุม มีคะแนนเท่ากับ 6.84 โดยทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากการประเมินความพึงพอใจของผู้บริโภคด้านรสชาติของตัวอย่างปลาส้มพบว่าผู้บริโภคพึงพอใจรสชาติของชุดการทดลองที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *P. acidilactici* มากที่สุด มีคะแนนเท่ากับ 7.40 รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *L. plantarum* มีคะแนนเท่ากับ 7.08 และชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสม *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* และชุดควบคุมได้รับคะแนนความพึงพอใจด้านรสชาติเท่ากัน คือ 6.84 ทั้งนี้ ทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากการประเมินความพึงพอใจของผู้บริโภคด้านรสเปรี้ยวของตัวอย่างปลาส้มพบว่า ผู้บริโภคพึงพอใจรสเปรี้ยวของชุดการทดลองที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *L. plantarum* และชุดควบคุมมากที่สุด โดยได้รับคะแนนความพึงพอใจเท่ากันคือ 7.00 รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *P. acidilactici* และที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสม *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* มีคะแนนเท่ากับ 6.64 และ 6.56 ตามลำดับ โดยทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากการประเมินความพึงพอใจของผู้บริโภคด้านเนื้อสัมผัสของตัวอย่างปลาส้มพบว่า ผู้บริโภคพึงพอใจเนื้อสัมผัสของชุดควบคุมมากที่สุด มีคะแนนเท่ากับ 7.24 รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *P. acidilactici*, *L. plantarum* และ ที่เติมเชื้อผสม *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* มีคะแนนเท่ากับ 7.20, 7.00 และ 6.92 ตามลำดับ โดยทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากการประเมินความพึงพอใจของผู้บริโภคด้านความชอบโดยรวมของตัวอย่างปลาส้มพบว่า ผู้บริโภคพึงพอใจชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสม *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* มากที่สุด มีคะแนนเท่ากับ 7.56 รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *P. acidilactici*, ชุดควบคุม และ ชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *L. plantarum* มีคะแนนเท่ากับ 7.48, 7.32 และ 7.24 ตามลำดับ โดยทั้ง 4 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 11)

จากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคที่มีต่อตัวอย่างปลาส้มในการทดลองครั้งนี้ พบว่าปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสม *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* ผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบในแต่ละคุณลักษณะสูงที่สุด 3 ค่า ได้แก่ สี กลิ่น และความชอบโดยรวม ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสมมีความชอบสูงที่สุดและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในอนาคต

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารของปลาส้ม

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลาส้มโดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1 เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *P. acidilactici* ชุดการทดลองที่ 2 เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *L. plantarum* ชุดการทดลองที่ 3 เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสมระหว่าง *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* และชุดการทดลองที่ 4 ชุดควบคุม ไม่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ (ตาราง 12)

จากการตรวจสอบความชื้นพบว่าปลาส้มที่หมักโดยไม่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์มีค่าความชื้นมากที่สุดคือ 64.60±0.33 รองลงมาคือ ปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *L. plantarum* และ *P. acidilactici* โดยมีค่าความชื้นคือ 62.55±0.43 และ 60.44±0.28 ตามลำดับ ในขณะที่ปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสมระหว่าง *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* มีค่าความชื้นน้อยที่สุดคือ 59.57±0.28

จากการตรวจสอบเถ้าพบว่าปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *P. acidilactici* มีค่าเถ้ามากที่สุดคือ 4.44±0.40 รองลงมาคือ ปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *L. plantarum*, ปลาส้มชุดควบคุม และปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสม *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* โดยมีค่าเถ้าคือ 3.83±0.34, 3.68±0.31 และ 3.46±0.15 ตามลำดับ

จากการตรวจสอบโปรตีนพบว่าปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสมระหว่าง *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* มีค่าโปรตีนมากที่สุดคือ 19.23±0.10 รองลงมาคือปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *L. plantarum* และ *P. acidilactici* พบว่ามีค่าโปรตีน 16.51±0.04 และ 16.32±0.23 ตามลำดับ ในขณะที่ปลาส้มที่ไม่เติมต้นเชื้อมีค่าโปรตีนน้อยที่สุดคือ 12.81±0.21

จากการตรวจสอบไขมันพบว่าปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสมระหว่าง *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* มีค่าไขมันมากที่สุดคือ 13.29±0.17 รองลงมาคือปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *P. acidilactici* และชุดควบคุม พบว่ามีค่าไขมันคือ 8.59±0.24 และ 7.80±0.05 ตามลำดับ ในขณะที่ปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *L. plantarum* มีค่าไขมันน้อยที่สุดคือ 5.26±0.04

จากการตรวจสอบเยื่อใยพบว่าปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสมระหว่าง *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* มีค่าเยื่อใยมากที่สุดคือ 1.37±0.01 รองลงมาคือปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *L. plantarum* และ *P. acidilactici* พบว่ามีค่าเยื่อใยคือ 1.19±0.09 และ 0.90±0.03 ตามลำดับ ในขณะที่ปลาส้มที่ไม่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์มีค่าเยื่อใยน้อยที่สุดคือ 0.89±0.01

จากการตรวจสอบคาร์โบไฮเดรตพบว่าปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *L. plantarum* มีคาร์โบไฮเดรตมากที่สุดคือ 10.66±0.38 รองลงมาคือปลาส้มที่ไม่เติมต้นเชื้อ และ *P. acidilactici* พบว่ามีคาร์โบไฮเดรตคือ 10.22±0.41 และ 9.31±0.79 ตามลำดับ ในขณะที่ปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสมระหว่าง *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* มีคาร์โบไฮเดรตน้อยที่สุดคือ 3.09±0.18

องค์ประกอบทางเคมีของปลาส้มในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสมระหว่าง *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* ให้ผลดีที่สุด กล่าวคือ มีค่า โปรตีน ไขมัน และเยื่อใยมากที่สุด อีกทั้งยังมีค่าความชื้น เถ้า และคาร์โบไฮเดรตต่ำที่สุด

ตาราง 12 คะแนนการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ปลาส้ม

คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส	คะแนนความชอบ			
	P. acidilactici	*L. plantarum*	*P. acidilactici* + *L. plantarum*	Control
สี	7.52±1.19[a]	7.08±1.53[a]	7.72±1.10[a]	7.20±1.47[a]
กลิ่น	7.40±1.23[a]	7.24±1.40[a]	7.40±1.08[a]	6.84±1.40[a]
รสชาติ	7.40±1.19[a]	7.08±1.55[a]	6.84±1.91[a]	6.84±1.21[a]
รสเปรี้ยว	6.64±1.32[a]	7.00±1.73[a]	6.56±1.87[a]	7.00±1.15[a]
เนื้อสัมผัส	7.20±1.08[a]	7.00±1.70[a]	6.92±1.80[a]	7.24±1.16[a]
ความชอบโดยรวม	7.48±0.96[a]	7.24±1.42[a]	7.56±1.33[a]	7.32±0.75[a]

ค่าสีวัดด้วยเครื่อง Chromameter ของตัวอย่างปลาส้มทั้ง 4 ชุดการทดลอง พบว่ามีค่า L* a* b* ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตลอดระยะเวลาการหมักในวันที่ 0 ถึงวันที่ 3 โดยปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *P. acidilactici*, *L. plantarum*, *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* และชุดควบคุม มีค่า L* อยู่ในช่วงระหว่าง 54.48–63.06, 57.60–59.40, 58.37–61.78 55.27–61.03 ตามลำดับ จากนั้นเมื่อเข้าสู่การหมักในวันที่ 3 และ 4 พบว่าค่า L* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยปลาส้มที่เติมต้นเชื้อแบบผสม *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* ให้ค่าความสว่างสูงที่สุดอยู่ระหว่าง 64.52–66.30 ในขณะที่ปลาส้มที่เติมเชื้อ *P. acidilactici*, *L. plantarum* และชุดควบคุม มีค่าอยู่ระหว่าง 61.34–64.28, 62.46–62.71 และ 61.30–62.99 ตามลำดับ ค่า a* พบว่าปลาส้มทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันในวันที่ 0 ถึงวันที่ 5 โดยมีค่าความเป็นสีแดงมากกว่าสีเขียวและ ค่า b* พบว่าตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 4 ปลาส้มทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเข้าสู่วันสุดท้ายของการหมักพบว่า ปลาส้มที่เติมเชื้อ *L. plantarum* มีค่า b* หรือค่าความเป็นสีเหลืองมากที่สุด คือ 7.95 ในขณะที่ปลาส้มที่เติมเชื้อ *P. acidilactici*, *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* และชุดความคุมมีค่า b*ไม่แตกต่างกัน (ตาราง12)

ตาราง 13 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารจากปลาส้ม

ตัวอย่าง	ความชื้น (%)	เถ้า (%)	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เยื่อใย (%)	คาร์โบไฮเดรต (%)
P. Acidilactici	60.44±0.28	4.44±0.40	16.32±0.23	8.59±0.24	0.90±0.03	9.31±0.79
L. plantarum	62.55±0.43	3.83±0.34	16.51±0.04	5.26±0.04	1.19±0.09	10.66±0.38
P. acidilactici + *L. plantarum*	59.57±0.28	3.46±0.15	19.23±0.10	13.29±0.17	1.37±0.01	3.09±0.18
Control	64.60±0.33	3.68±0.31	12.81±0.21	7.80±0.05	0.89±0.01	10.22±0.41

ตาราง 14 ค่า L* a* b* ของตัวอย่างปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติก

Day	L*				a*				b*			
	P. acidilactici	*L. plantarum*	*P. acidilactici* + *L. plantarum*	*Control*	*P. acidilactici*	*L. plantarum*	*P. acidilactici* + *L. plantarum*	*Control*	*P. acidilactici*	*L. plantarum*	*P. acidilactici* + *L. plantarum*	*Control*
0	54.48^{a}	57.60^{a}	58.37^{a}	55.27^{a}	0.11^{a}	0.38^{a}	0.21^{a}	1.14^{a}	2.94^{a}	2.86^{a}	1.60^{a}	0.78^{a}
1	63.06^{a}	59.40^{a}	61.78^{a}	61.03^{a}	0.56^{a}	0.76^{a}	1.21^{a}	0.85^{a}	1.96^{a}	0.73^{a}	1.66^{a}	1.61^{a}
2	60.94^{a}	57.66^{a}	59.04^{a}	60.53^{a}	0.91^{a}	-0.49^{a}	1.35^{a}	0.53^{a}	4.76^{a}	2.51^{a}	6.07^{a}	4.02^{a}
3	64.28^{ab}	62.46^{a}	66.30^{b}	61.30^{ab}	0.93^{a}	2.78^{a}	1.81^{a}	3.05^{a}	4.23^{a}	6.58^{a}	3.58^{a}	5.52^{a}
4	61.34^{a}	62.71^{ab}	64.52^{b}	63.59^{ab}	4.37^{a}	2.39^{a}	2.58^{a}	2.60^{a}	5.96^{a}	5.83^{a}	6.30^{a}	6.03^{a}
5	62.02^{a}	63.97^{a}	64.36^{a}	62.99^{a}	5.04^{a}	4.12^{a}	2.44^{a}	3.52^{a}	5.18^{ab}	7.95^{c}	7.04^{bc}	4.61^{a}

การศึกษาโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรีย

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียมีทั้งหมด 12 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบเชื้อเดี่ยว (2 ตัวอย่าง) และเชื้อผสม (1 ตัวอย่าง) และชุดควบคุม (1 ตัวอย่าง) รวมทั้งหมด 4 ตัวอย่าง โดยแบ่งออกเป็นเชื้อเดี่ยว 1, PA : *Pediococcus acidilactici*, เชื้อเดี่ยว 2, LP : *Lactiplantibacillus plantarum*, เชื้อผสม 1, LA : *P. acidilactici* + *L. plantarum* และชุดควบคุม 1, CT : Control ซึ่งทำการหมักแต่ละตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างกัน 3 ช่วงเวลา คือ 0 3 และ 5 วัน (D0 : Day 0, D3 : Day 3, D5 : Day 5) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ และนำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ได้ไปศึกษาโครงสร้างชุมชนแบคทีเรียโดยใช้วิธี Next generation sequence analysis ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Illumina Sequencing Target Region (Primer Set) ใช้ไพรเมอร์ของ 16s rRNA ที่บริเวณ V3V4 (Bakt_341F–805R) และทำการอ่านผลจาก Bar Type ผลการวิเคราะห์ในภาพรวมทั้ง 12 ตัวอย่าง (ภาพ 9)

เมื่อจัดจำแนกในระดับ Phylum สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 5 Phylum โดย Phylum Firmicutes ถูกพบมากที่สุดคือ 99.6 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 9.A) จัดอยู่ใน Class Bacilli 99.6 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 9.B)

เมื่อจัดจำแนกตาม Order สามารถจัดจำแนกได้ทั้งหมด 8 Order ซึ่งมี 2 Order ที่พบว่ามีความหลายหลายมากกว่า Order อื่น ๆ คือ Order Lactobacillales พบ 97.7 เปอร์เซ็นต์ และ Order Bacillales พบ 1.9 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 9.C) เมื่อแยกตามระยะเวลาการหมัก พบว่าในวันที่ 0 มี Order Bacillales มากที่สุดในทั้ง 4 ตัวอย่าง และลดน้อยลงในวันที่ 3 และ 5

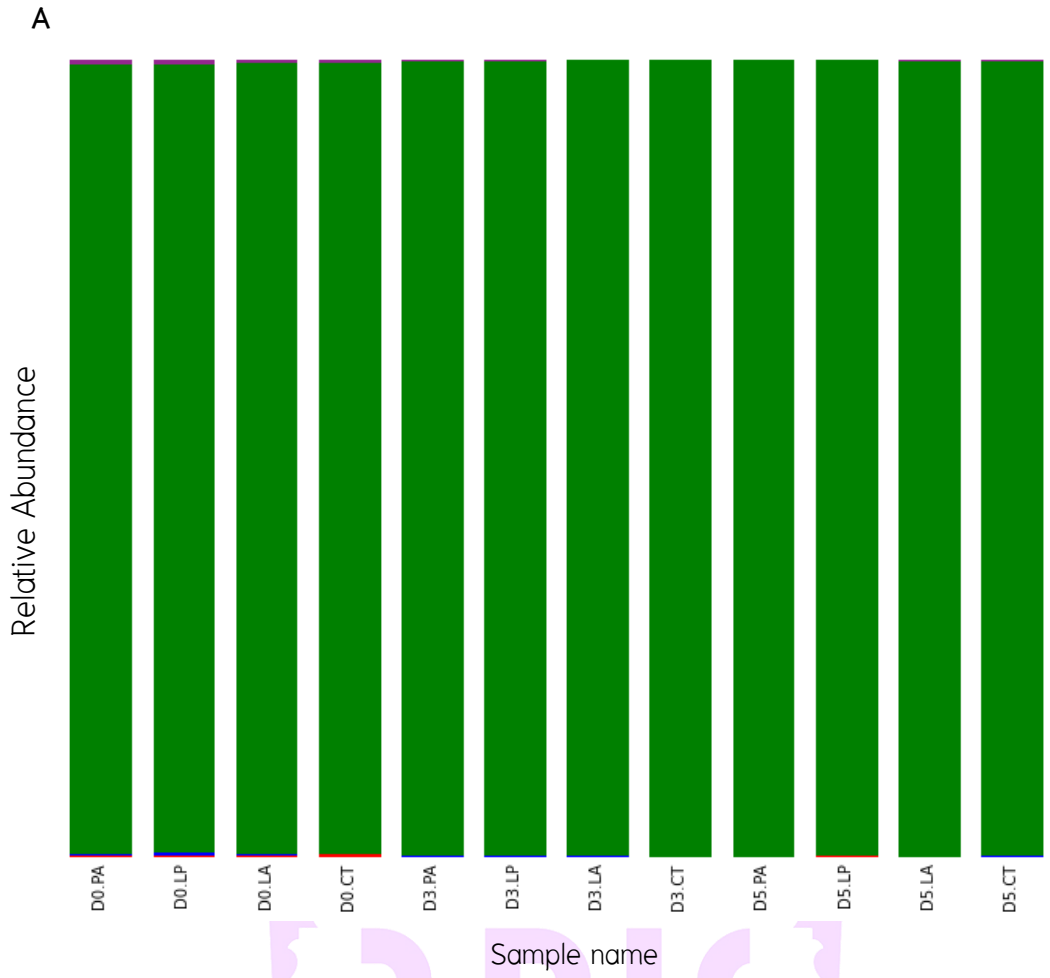
เมื่อจัดจำแนกตาม Family สามารถจัดจำแนกได้ทั้งหมด 14 Family โดยที่ Family Lactobacillaceae ถูกพบมากที่สุดคือ 86.8 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ Streptococcaceae และ Staphylococcaceae ถูกพบเพียง 10 และ 1.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพ 9.D) เมื่อแยกตามระยะเวลาการหมัก พบว่าในวันที่ 0 มีความหลากหลายของ Family Lactobacillaceae มากที่สุด ส่วนในวันที่ 3 และ 5 ยังคงพบว่า Family Lactobacillaceae และ Streptococcaceae ยังถูกพบมากที่สุด

เมื่อจัดจำแนกตาม Genus พบว่ามีทั้งหมด 34 Genus โดย 7 Genus ที่พบว่ามีความโดดเด่นมากกว่า Genus อื่น คือ Genus *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactiplantibacillus*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Lacticaseibacillus* และ *Companilactobacillus* ซึ่งพบเป็นจำนวน 25.3, 25, 14.7, 9.7, 9.2, 4.6, 3.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพ 9.E) เมื่อแยกตามระยะเวลาการหมัก ในระดับ Genus จะมีความแตกต่างกันมากกว่าในระดับ Family โดยในวันที่ 0 พบว่า *Leuconostoc* และ *Lactococcus* มีความโดดเด่นอย่างเห็นได้ชัด แต่เมื่อเริ่มเข้าสู่กระบวนการหมักในวันที่ 3 และ 5 พบว่า *Pediococcus*, *Lactiplantibacillus* และ *Weissella* มีความโดดเด่นในขณะที่ *Leuconostoc* และ *Lactococcus* มีจำนวนลดลง และเมื่อแยกตามชนิดของต้นเชื้อบริสุทธิ์ พบว่า ในวันที่ 0 จะมีความหลายของแบคทีเรียในระดับ Genus ที่ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่เมื่อหมักในวันที่ 3 และวันที่ 5 ชุดการทดลองที่มีการเติม *P. acidilactici* หรือ *L. plantarum* มี Genus *Pediococcus* และ *Lactiplantibacillus* ในสัดส่วนมากขึ้น โดยมีสัดส่วนของ *Pediococcus* ที่มากที่สุดเมื่อมีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *P. acidilactici* ทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม (ภาพ 9.E D3.PA, D3.LA, D5.PA และ D5.LA) และมี *Lactiplantibacillus* ในสัดส่วนที่มากที่สุดเมื่อมีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *L. plantarum* ในขณะที่ชุดควบคุม (ภาพ 9.E D3.LP, D3.CT, D5.LP และ D5.CT) นอกจากนี้เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่สามารถพบทั้ง *Pediococcus* และ *Lactiplantibacillus* ในปริมาณที่สูงมากในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ในการหมักวันที่ 3 และ 5 (ภาพ 9.E D3.CT และD5.CT)

เมื่อจัดจำแนกตาม species พบทั้งหมด 49 species ซึ่งมี 7 species ที่มีความโดดเด่น คือ *Leuconostoc lactis*, *Pediococcus acidilactici* *Lactiplantibacillus plantarum*, *Weissella confuse*, *Lactococcus cremoris*, *Lacticaseibacillus zeae* , *Companilactobacillus musae* ซึ่งพบเป็นจำนวน 25.3, 25, 14.7, 9.7, 5.2, 3.7 และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพ 9.F) โดยที่ *Leuconostoc lactis* และ *Lactococcus cremoris* และ *Weissella confuse* พบมากที่สุดในช่วงเริ่มก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก (ในวันที่ 0) จากนั้นเมื่อหมักในวันที่ 3 และ 5 พบว่า *Pediococcus acidilactici*, *Lactiplantibacillus plantarum* มีความโดดเด่นอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่ *Leuconostoc lactis* และ *Lactococcus cremoris* ซึ่งมีความโดดเด่นในวันที่ 0 มีจำนวนลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่า *Weissella confuse* มีจำนวนเพิ่มขึ้นในเกือบทุกชุดการทดลอง ยกเว้นชุดที่มีการเติม *L. plantarum* มีจำนวน *Weissella confuse* ใกล้เคียงกับวันที่ 0 (ภาพ 9.F D3.PA และD5.PA) เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของ *P. acidilactici*

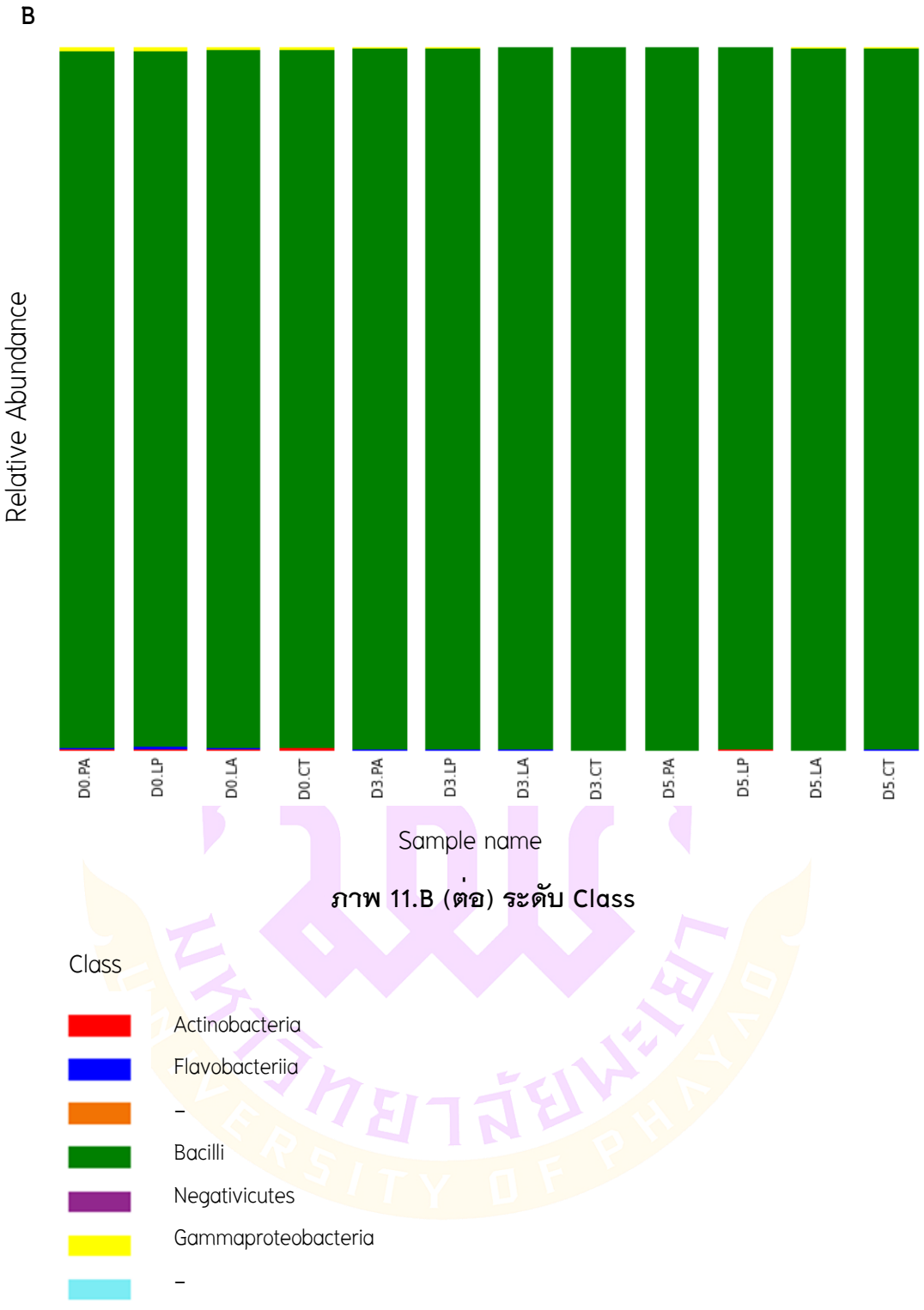
และ *L. plantarum* ในชุดการทดลองที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์บริสุทธ์แบบผสม พบว่า *P. acidilactici* มีจำนวนมากกว่า *L. plantarum* ในการหมักวันที่ 3 และ 5 (ภาพ 9.F D3.LA และD5.LA) นอกจากนี้เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่สามารถพบทั้ง *P. acidilactici* และ *L. plantarum* ในปริมาณที่สูงมากในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ในการหมักวันที่ 3 และ 5 (ภาพ 9.F D3.CT และD5.CT)

ชนิดของแบคทีเรียในระดับอนุกรมวิธานต่าง ๆ ในภาพรวม ที่พบในตัวอย่างปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่างการหมักในระยะเวลาต่าง ๆ แสดงในตาราง 15



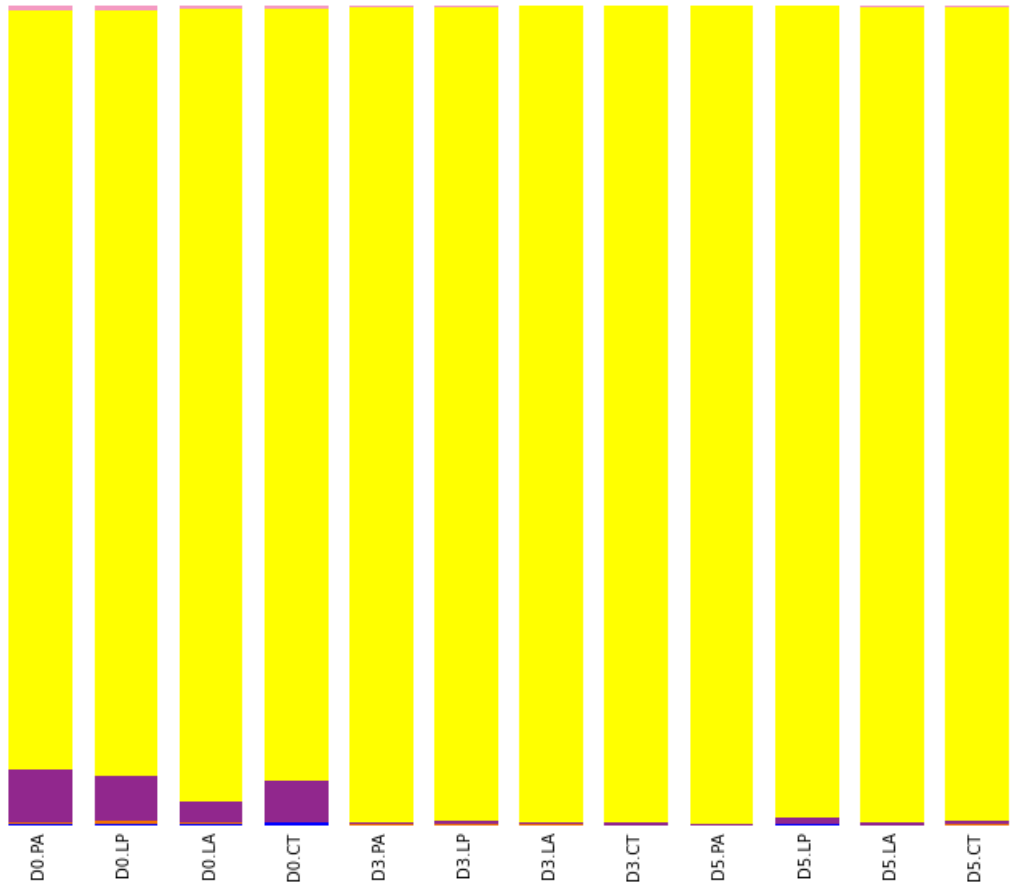
ภาพ 9 ชนิดและจำนวนของแบคทีเรียในระดับอนุกรมวิธานต่าง ๆ ที่พบในตัวอย่างปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่างการหมักในระยะเวลาต่าง ๆ PA : P. acidilactici, LP : L. plantarum, LA : P. acidilactici + L. plantarum, CT : Control, D0 : Day 0, D3 : Day 3, D5 : Day 5 A) Phylum B) Class C) Order D) Family E) Genus F) Species

B

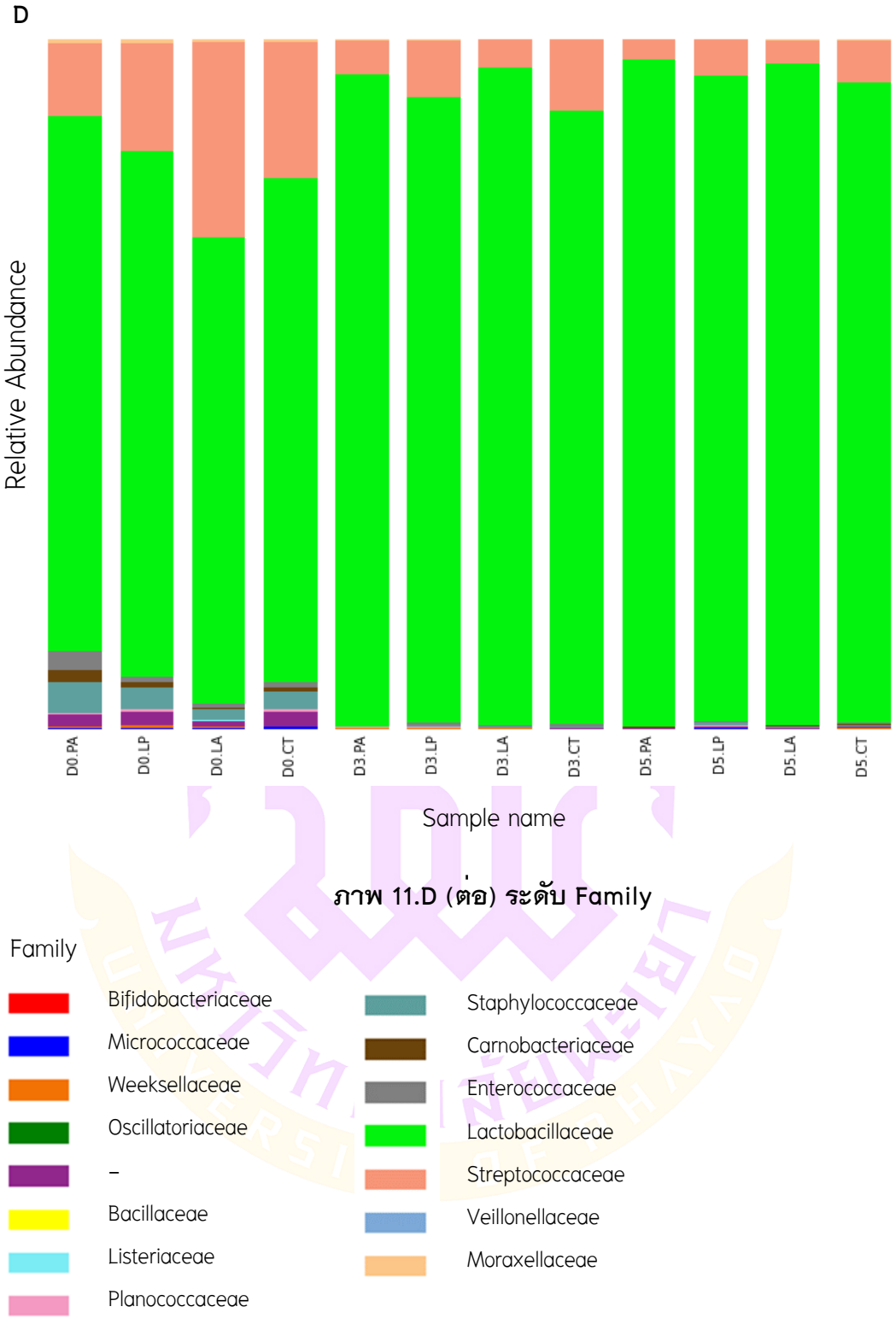


ภาพ 11.B (ต่อ) ระดับ Class

C

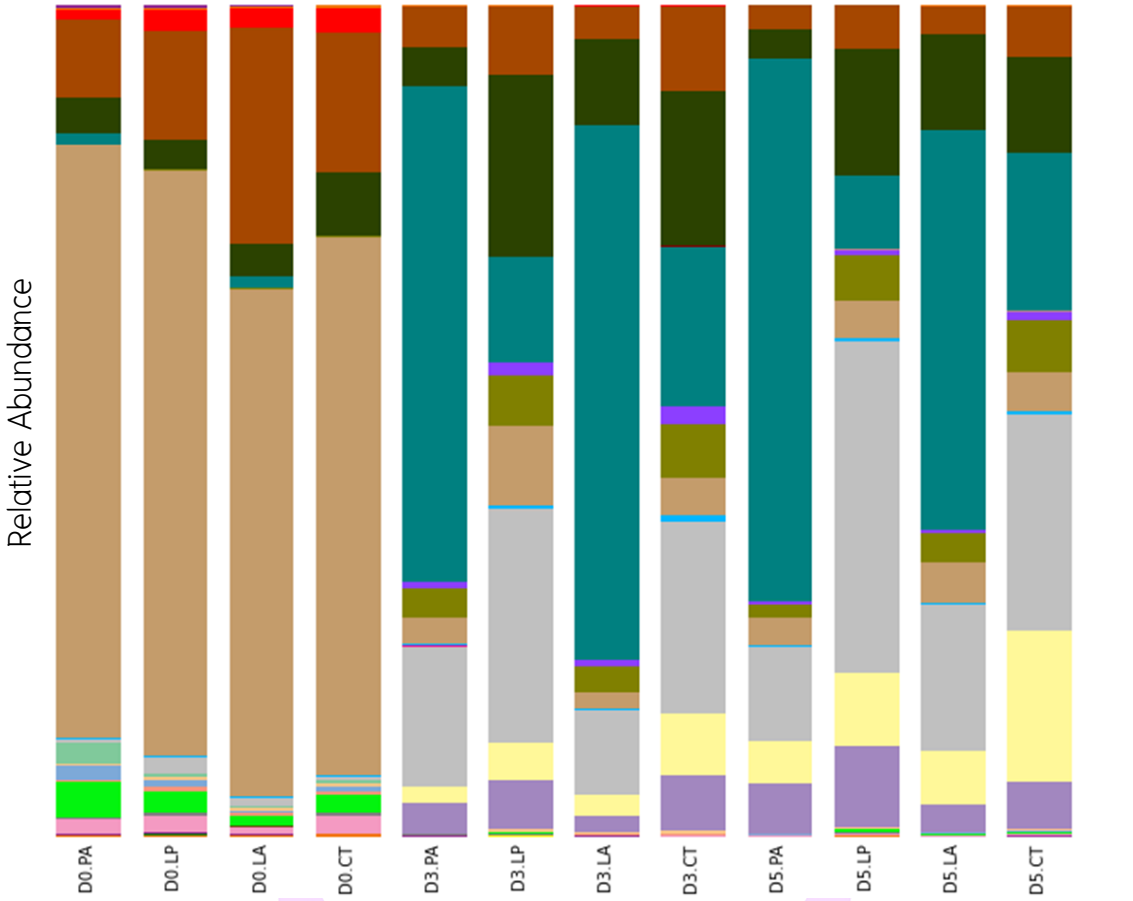


ภาพ 11.C (ต่อ) ระดับ Order



ภาพ 11.D (ต่อ) ระดับ Family

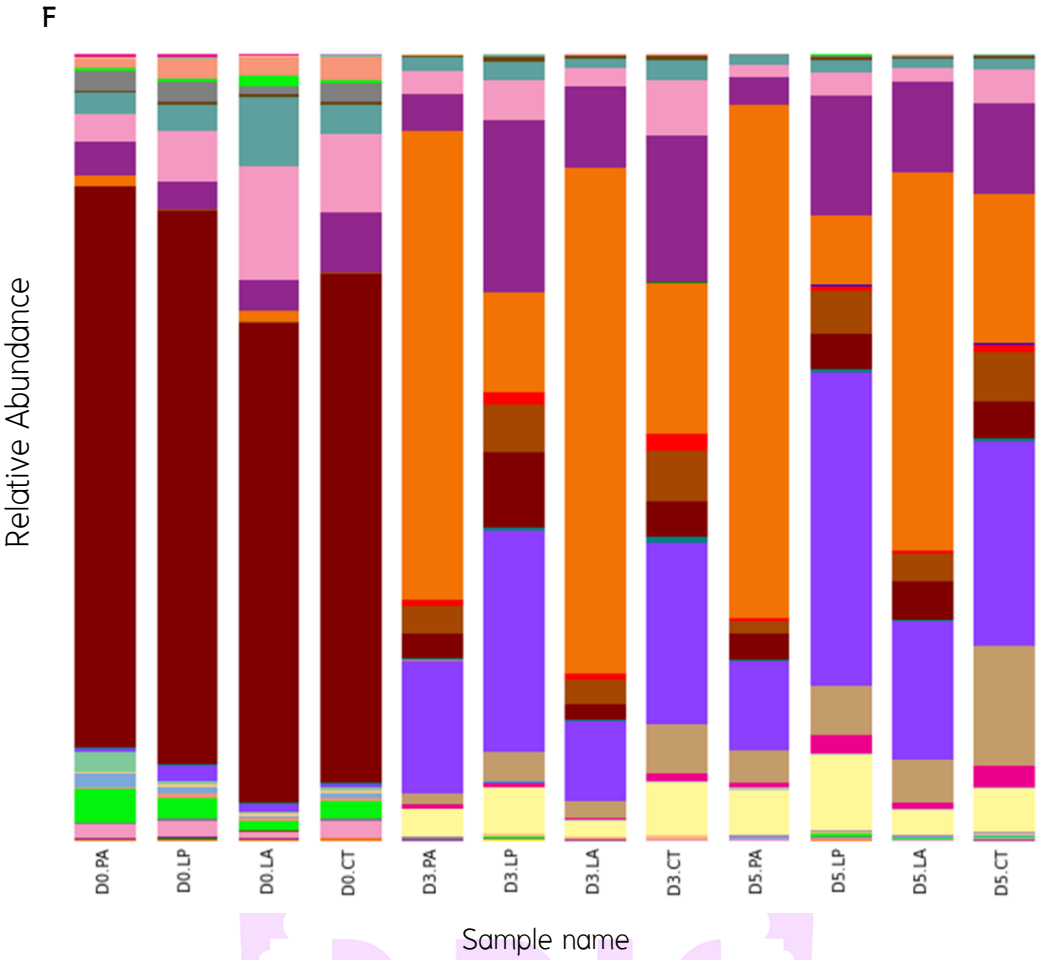
E



ภาพ 11.E (ต่อ) ระดับ Genus

Genus

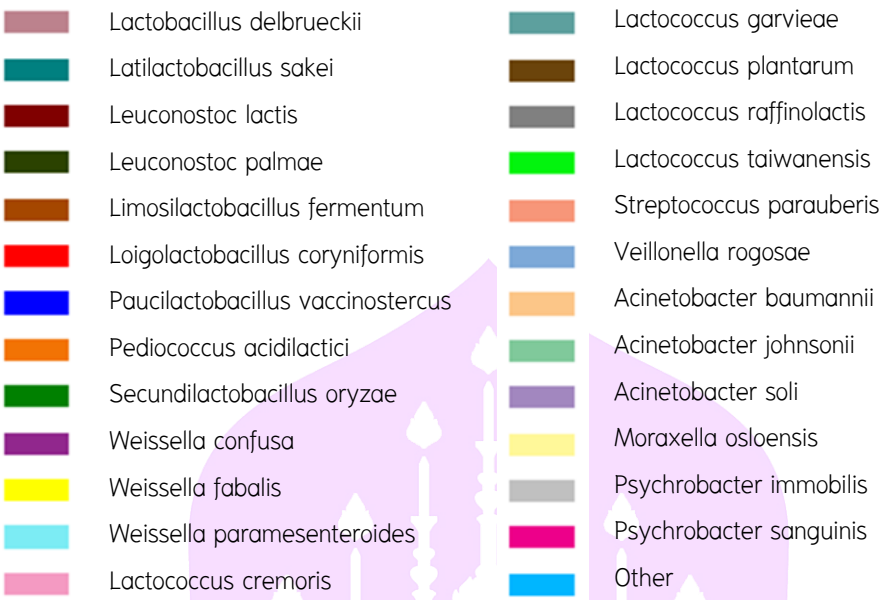
- *Bifidobacterium*
- *Kocuria*
- *Rothia*
- *Chryseobacterium*
- *Kaistella*
- *Soonwooa*
- *Aerosakkonema*
- *Exiguobacterium*
- *Bacillus*
- *Brochothrix*
- *Kurthia*
- *Macrococcus*
- *Staphylococcus*
- *Carnobacterium*
- *Enterococcus*
- *Vagococcus*
- *Companilactobacillus*
- *Lacticaseibacillus*
- *Lactiplantibacillus*
- *Lactobacillus*
- *Latilactobacillus*
- *Leuconostoc*
- *Limosilactobacillus*
- *Loigolactobacillus*
- *Paucilactobacillus*
- *Pediococcus*
- *Secundilactobacillus*
- *Weissella*
- *Lactococcus*
- *Streptococcus*
- *Veillonella*
- *Acinetobacter*
- *Moraxella*
- *Psychrobacter*
- -



ภาพ 11.F (ต่อ) ระดับ Species

Species

- *Bifidobacterium subtile*
- *Kocuria tytonis*
- *Rothia endophytica*
- *Chryseobacterium cucumeris*
- *Kaistella haifensis*
- *Soonwooa buanensis*
- *Aerosakkonema funiforme*
- *Exiguobacterium indicum*
- *Bacillus velezensis*
- *Brochothrix thermosphacta*
- *Kurthia gibsonii*
- *Macrococcus canis*
- *Staphylococcus gallinarum*
- *Carnobacterium gallinarum*
- *Enterococcus faecium*
- *Vagococcus fessus*
- *Companilactobacillus bobalius*
- *Companilactobacillus musae*
- *Lacticaseibacillus brantae*
- *Lacticaseibacillus pantheris*
- *Lacticaseibacillus rhamnosus*
- *Lacticaseibacillus zeae*
- *Lactiplantibacillus herbarum*
- *Lactobacillus plantarum*


Lactobacillus delbrueckii
Latilactobacillus sakei
Leuconostoc lactis
Leuconostoc palmae
Limosilactobacillus fermentum
Loigolactobacillus coryniformis
Paucilactobacillus vaccinostercus
Pediococcus acidilactici
Secundilactobacillus oryzae
Weissella confusa
Weissella fabalis
Weissella paramesenteroides
Lactococcus cremoris
Lactococcus garvieae
Lactococcus plantarum
Lactococcus raffinolactis
Lactococcus taiwanensis
Streptococcus parauberis
Veillonella rogosae
Acinetobacter baumannii
Acinetobacter johnsonii
Acinetobacter soli
Moraxella osloensis
Psychrobacter immobilis
Psychrobacter sanguinis
Other

ตาราง 15 ชนิดและจำนวนของแบคทีเรียในระดับอนุกรมวิธานต่าง ๆ ที่พบในตัวอย่างปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติกแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมระหว่างการหมักในระยะเวลาต่าง ๆ

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
Actinobacteria	Actinomycetia	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	*Bifidobacterium*	*Bifidobacterium subtile*
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Micrococcales	Micrococcaceae	*Kocuria*	*Kocuria tytonis*
Cyanobacteria	Bacilli	Flavobacteriales	Weeksellaceae	*Rothia*	*Rothia endophytica*
Firmicutes	Negativicutes	Oscillatoriales	Oscillatoriaceae	*Chryseobacterium*	*Chryseobacterium cucumeris*
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Bacillales	Bacillaceae	*Kaistella*	*Kaistella haifensis*
		Lactobacillales	Listeriaceae	*Soonwooa*	*Soonwooa buanensis*
		Veillonellales	Planococcaceae	*Aerosakkonema*	*Aerosakkonema funiforme*
		Moraxellales	Staphylococcaceae	*Exiguobacterium*	*Exiguobacterium indicum*
			Carnobacteriaceae	*Bacillus*	*Bacillus velezensis*
			Enterococcaceae	*Brochothrix*	*Brochothrix thermosphacta*
			Lactobacillaceae	*Kurthia*	*Kurthia gibsonii*
			Streptococcaceae	*Macrococcus*	*Macrococcus canis*
			Veillonellaceae	*Staphylococcus*	*Staphylococcus gallinarum*

ตาราง 15 (ต่อ)

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
			Moraxellaceae	*Carnobacterium*	*Carnobacterium gallinarum*
				Companilactobacillus	*Companilactobacillus bobalius*
				Lacticaseibacillus	*Companilactobacillus musae*
				Lactobacillus	*Lacticaseibacillus brantae*
				Lactobacillus	*Lacticaseibacillus pantheris*
				Latilactobacillus	*Lacticaseibacillus rhamnosus*
				Leuconostoc	*Lacticaseibacillus zeae*
				Limosilactobacillus	*Lactobacillus herbarum*
				Loigolactobacillus	*Lactiplantibacillus plantarum*
				Paucilactobacillus	*Lactobacillus delbrueckii*
				Pediococcus	*Latilactobacillus sakei*
				Secundilactobacillus	*Leuconostoc lactis*
				Weissella	*Leuconostoc palmae*
				Lactococcus	*Limosilactobacillus fermentum*
				Streptococcus	*Loigolactobacillus coryniformis*

ตาราง 15 (ต่อ)

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
				Veillonella	*Paucilactobacillus vaccinostercus*
				Psychrobacter	*Weissella confuse*
					Weissella fabalis
					Weissella paramesenteroides
					Lactococcus cremoris
					Lactococcus garvieae
					Lactococcus plantarum
					Lactococcus raffinolactis
					Lactococcus taiwanensis
					Streptococcus parauberis
					Veillonella rogosae
					cinetobacter baumannii
					Acinetobacter johnsonii
					Acinetobacter soli
					Moraxella osloensis
					Psychrobacter immobilis
					Psychrobacter sanguinis

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาส้มที่วางจำหน่ายในตลาดสดจังหวัดพะเยา จำนวน 8 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 45 ไอโซเลท ทำการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธีการย้อมสีแกรม และทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส มีรูปร่างกลมจำนวน 18 ไอโซเลท และรูปร่างท่อนจำนวน 27 ไอโซเลท เมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกพบแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก 5 ไอโซเลท ได้แก่ BPS2, BPS4, BPS5, BPS6 และ BPS7 โดยทั้ง 5 ไอโซเลท ไม่พบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ไม่สามารถผลิตก๊าซได้เป็นการหมักแบบ Homofermentative ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kumar, et al. (2017) ที่ได้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผักดอง พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และเช่นเดียวกับภณิดา เกื้อสุวรรณ (2557) ที่ได้ทดสอบความปลอดภัยของแบคทีเรียกรดแลคติกก่อนนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อ พบว่าไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งคุณสมบัติทั่วไปของแบคทีเรียกรดแลคติกที่จะนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกนั้นจะต้องไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง โดยความปลอดภัยเมื่อจะนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกไม่ว่าจะเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตหรือส่วนของจุลินทรีย์ ซึ่งอาจเป็นได้ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ หรือเชื้อรามาใช้กับมนุษย์จะต้องมีข้อควรคำนึงในเรื่องของความปลอดภัยหรือผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นนอกเหนือจากการใช้ประโยชน์จากโพรไบโอติก ดังนั้นการจะนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกมาใช้จะต้องมีการศึกษาถึงคุณสมบัติ ผลต่อสุขภาพ และความปลอดภัย หรือได้รับการรับรองจากสถาบันที่มีความน่าเชื่อถือ โดยองค์กรอนามัยโลกได้ให้การรับรองว่าจุลินทรีย์ใดเป็นชนิดที่มีความปลอดภัย (Genarally Regarded as Safe : GRAS) ซึ่งได้มีการศึกษาและนำมาใช้ในสิ่งมีชีวิต มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์รองรับความปลอดภัย (ไชยวัฒน์ ไชยสุต, 2556) โดยทั่วไปการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกมาใช้มีแนวทางหลักคือสามารถอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้ สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารได้ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคและมีปริมาณสูงเพียงพอที่จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ (ประมาณ 10^7–10^9 CFU/ml ของผลิตภัณฑ์) (Dunne, et al., 2001)

จากการทดสอบความสามารถในการทนกรดและเกลือน้ำดีพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีความเป็นกรดต่ำที่ pH2 และ pH3 และเจริญได้ในภาวะที่มีเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีประมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความสามารถของแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะดังกล่าว บ่งบอกถึงความสามารถในการเจริญรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ การเลือกโพรไบโอติกที่มีศักยภาพแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ต้องมีความสามารถในการอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดและความเข้มข้นของน้ำดีสูง โดยหนึ่งในลักษณะสำคัญของโพรไบโอติกคือความมีชีวิตและการอยู่รอดในสภาวะที่เป็นกรด (Boke, et al., 2010) ต้องผ่านสภาวะกดดันของกระเพาะอาหารซึ่งใช้เวลาระหว่างการย่อยอาหารในท้องคือ 3 ชั่วโมง (Cakir, et al., 2003; Kumar and Murugalatha (2012) ได้แนะนำความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในลำไส้เฉลี่ยเท่ากับ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าเป็นค่าวิกฤตและสูงพอที่จะคัดกรองสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดีได้

จากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลท มีความไวต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มที่ทำลายการสังเคราะห์การสร้างผนังเซลล์ชนิด Ampicilin และ Cefotaxime กลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนชนิด chloramphenicol กลุ่ม Penicillin ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือยาฉีดชนิด Penicilin G ยากินชนิด Amoxycillin ผลลัพธ์เหล่านี้บ่งชี้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ถูกยับยั้งการเจริญด้วยยาปฏิชีวนะกลุ่ม beta-lactams โดยออกฤทธิ์ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของแบคทีเรียแกรมบวก เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Sanders, et al. (2010) ได้กล่าวไว้ว่ายาปฏิชีวนะบางชนิดสามารถยับยั้งและทำลายองค์ประกอบของแบคทีเรียกรดแลคติก นอกจากนี้ในการศึกษาพบว่าเชื้อดื้อต่อยากลุ่ม Glycopeptide ชนิด Vancomycin และกลุ่มยับยั้ง การจำลองดีเอ็นเอชนิด Norfloxacin Nelson (1999) ได้รายงานไว้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม *Lactiplantibacillus, Pediococcus* และ *Leuconostoc* มีความต้านทานต่อยา Vancomycin สูง (Li, et al., 2015) แบคทีเรียกรดแลคติกมีความต้านทานต่อ Norfloxacin ในขณะที่จารุณี เกสรพิกุล และ สุรวัฒน์ ชะลอสันติสกุล (2562) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้มีความไวต่อยา Norfloxacin ทั้งนี้ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกันอาจส่งผลให้แบคทีเรียมีความดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่แตกต่างกัน เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกไปตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อพบว่าทั้ง 5 ไอโซเลท ไม่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารทั้ง 5 สายพันธุ์ ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยของพนิตนาฎ อู่พุฒินันท์ และวราภรณ์ กุศลารักษ์ (2563) ที่ได้ศึกษา

คุณสมบัติของโพรไบโอติกแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

จากการระบุสายพันธุ์พบว่า BPS2 คือ *Pediococcus pentosaceus*, BPS4 และ BPS5 คือ *Pediococcus acidilactici* ในขณะที่ BPS6 และ BPS7 คือ *Lactiplantibacillus plantarum* งานวิจัยในครั้งนี้ได้เลือกแบคทีเรียกรดแลคติก *P. acidilactici* BPS4 และ *L. plantarum* BPS6 สำหรับใช้เป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์ โดยที่ *P. acidilactici* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการผลิตกรดทำให้มีค่า pH ต่ำกว่า 4.6 ตามที่มาตรฐานกำหนดภายใน 2 วัน ส่งผลให้ปลาส้มเข้าสู่กระบวนการหมักได้รวดเร็ว เมื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์ในระดับชุมชนหรืออุตสาหกรรมจะช่วยให้ประหยัดเวลาในขั้นตอนการหมัก อีกทั้งยังช่วยลดต้นทุนในการผลิต นอกจากนี้งานวิจัยของ Abbasiliasi, et al. (2017) ยังบงชี้ว่า *P. acidilactici* Kp10 มีความทนทานต่อฟีนอลและมีความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์เยื่อบุผิวของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อีกทั้งยังมีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของอาหารและยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสียหลายชนิด งานวิจัยของ Gutiérrez, et al. (2018) กล่าวถึงศักยภาพของ *P. pentosaceus* ที่คัดแยกได้จากเนยแข็งว่าสามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่ยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของอาหารได้ Parada, et al. (2007) รายงานว่า *P. pentosaceus* และ *P. acidilactici* ผลิตเพดิโอซิน (Pediocin) ซึ่งสามารถใช้เป็นสารกันบูดทางชีวภาพในอาหารช่วยยืดอายุการเก็บของอาหารและลดการใช้สารเคมีในการถนอมอาหาร งานวิจัยของ Giri, et al. (2018) ที่คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากข้าวหมักเพื่อใช้เป็นต้นเชื้อในการผลิตเครื่องดื่ม พบว่า *L. plantarum* L7 มีความทนต่อกรดและเกลือน้ำดี สามารถผลิตกรดได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังสร้างกรดอินทรีย์ (Organic acid) จำพวกกรดซัคซินิก (Succinic acid) กรดแลคติกและกรดอะซิติก (Acetic acid) และมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Goel, et al. (2020) ที่คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักพบว่า *L. plantarum* DHCU70 และ DKP1 มีความทนต่อกรดและเกลือน้ำดี ผลิตแบคเทอริโอซิน อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นการผลิต β-galactosidase นอกจากนี้ *L. plantarum* มีรูปแบบการทำงานซึ่งอาจช่วยในการแก้ไขปัญหาการดื้อยาและมีการใช้งานอย่างกว้างขวางในด้านการแพทย์ด้วยคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง ต้านการอักเสบ ต้านโรคอ้วนและต้านเบาหวาน (Arasu, et al., 2016) นอกจากนี้ยังมีผลดีหลายประการต่อสุขภาพของลำไส้และสุขภาพสมอง (Liu, et al., 2018)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่า pH พบว่าปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์มีค่า pH ต่ำกว่าปลาส้มชุดควบคุม เมื่อเริ่มเข้าสู่กระบวนการหมัก โดยค่า pH ของปลาส้มที่เติม

ต้นเชื้อบริสุทธิ์ *P. acidilactici* ให้ค่า pH ต่ำที่สุด และพบว่าให้ค่า pH ที่ต่ำกว่า 4.6 ตามที่มาตรฐานกำหนดภายใน 2 วัน ในขณะที่ปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *L. plantarum* และสายพันธุ์ผสมของ *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* ค่า pH ที่ได้ไม่แตกต่างกัน และปลาส้มชุดควบคุมให้ค่า pH สูงที่สุด จะให้ค่า pH ที่ต่ำกว่า 4.6 ในวันที่ 3 ของการหมัก เมื่อพิจารณาร่วมกับการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ของกรดแลคติกพบว่า ค่า pH ที่ลดต่ำลงแปรผกผันกับปริมาณของกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้สาเหตุที่ทำให้ค่า pH ของตัวอย่างปลาส้มลงเนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ กรดแลคติก และกรดอะซิติก ซึ่งมีผลทำให้ pH ลดลงได้อย่างรวดเร็ว ตามรายงานวิจัยของ สิริโชค วงศ์ศรีไพศาลและคณะ (2552) ที่ศึกษาคุณภาพของแหนมปลาที่หมักโดยการใชเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุเดี่ยวและสายพันธุ์ผสมระหว่าง *L. plantarum* กับ *L. fermentum* และ *L. plantarum* กับ *C. sake* พบว่าแหนมปลาที่เติมต้นเชื้อของแบคทีเรียกรดแลคติกมีคา pH ที่ต่ำและปริมาณกรดที่สูงกวาแหนมปลาที่ไม่เติมต้นเชื้อ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Sanpa, et al. (2019) พบว่าการเติมต้นเชื้อ *L. paraplantarum* ST2 และ *P. pentosaceus* ทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสมมีผลทำให้ค่า pH ต่ำและปริมาณกรดแลคติกมากกว่าปลาส้มที่ไม่เติมต้นเชื้อ นอกจากนี้งานวิจัยของชุลีพร ชำราญค้าและคณะ (2560) ยังบ่งชี้ว่าการใช้ต้นเชื้อของแบคทีเรียกรดแลคติกจะช่วยให้ pH ลดลง ทำให้เกิดการหมักได้รวดเร็วมากกว่าการใช้เชื้อจากธรรมชาติ

จากการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่า ปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสมมีปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกมากกว่าปลาส้มที่เติมเชื้อบริสุทธิ์สายพันธ์เดี่ยวและที่ไม่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ เมื่อพิจารณาร่วมกับการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดพบว่าปริมาณกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้นแปรผันผกผันกับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ลดลง จากรายงานการวิจัยของ Saithong, et al. (2010) พบว่าเมื่อเข้าสู่กระบวนการหมักจนสิ้นสุด ปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสมมีปริมาณกรดแลคติกสูงกว่าปลาส้มที่เติมแบบสายพันธุ์เดี่ยวและที่ไม่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ เมื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อ *E. coli* พบว่า ทุกชุดการทดลองพบเชื้อ *E. coli* ก่อนกระบวนการหมักในวันที่ 0 ในทุกตัวอย่างทดสอบ และไม่พบเชื้อ *E. coli* ตั้งแต่เข้าสู่กระบวนการหมักในวันที่ 1 จนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมัก เมื่อตรวจสอบเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* Typhi พบว่าไม่พบในตัวอย่างปลาส้ม ทั้งนี้ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* Typhi ที่ตรวจวิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเป็นตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนปลาส้ม มผช. 26/2557 (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2557

จากการตรวจสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสในตัวอย่างปลาส้ม โดยตรวจสอบจากผลการประเมินความพึงพอใจของกลุ่มผู้บริโภค ซึ่งเห็นได้จากการประเมินด้านสี กลิ่น รสชาติ รสเปรี้ยว เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมพบว่าปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งแบบเดี่ยวและผสมไม่แตกต่างจากปลาส้มชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของชุลีพร ชำนาญค้า และคณะ (2560) ที่ได้ศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นจากแหนมในจังหวัดสกลนคร พบว่าแหนมที่หมักด วยแบคทีเรียกรดแลคติคและแหนมที่หมักดวยเชื้อจากธรรมชาติ ไดคะแนนการยอมรับดานกลิ่น สี เนื้อสัมผัส รสเปรี้ยว และกลิ่นรสไมแตกตางกันอยางมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการตรวจสอบการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารจากปลาส้ม พบว่าปลาส้มทุกชุดการทดลองมีค่าความชื้นและไขมันแตกต่างกัน จากงานวิจัยของ Zeng, et al. (2013) ได้บ่งชี้ว่าองค์ประกอบทางเคมีของ Suan yu มีความชื้น โปรตีน ไขมัน เกลือมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการตรวจสอบปริมาณเถ้า ซึ่งแสดงถึงองค์ประกอบของสารอนินทรีย์ที่หลงเหลืออยู่จากการเผาไหม้ หรือปริมาณแร่ธาตุในอาหาร พบว่าปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *P. acidilactici* มีปริมาณเถ้าสูงที่สุดคือ ร้อยละ 4.44±0.40 ในขณะที่ปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ *L. plantarum* ปลาส้มที่ไม่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ และปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสมระหว่าง *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* มีปริมาณเถ้าไม่แตกต่างกัน โดยมีปริมาณเถ้าคือร้อยละ 3.83±0.34, 3.68±0.31 และ 3.46±0.15 ตามลำดับ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Narzary, et al. (2021) ที่ได้รวบรวมผลิตภัณฑ์ปลาหมักในอาหารเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่า Ngapi จากประเทศพม่า มีปริมาณเถ้าร้อยละ 3.45 Bekasam จากอินโดนีเซีย มีปริมาณเถ้าร้อยละ 5.76 นอกจากนี้ปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ผสมระหว่าง *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* มีปริมาณโปรตีน ไขมัน และเยื่อใยมากกว่าปลาส้มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียวและปลาส้มที่ไม่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yim, et al. (2017) ที่ได้ศึกษาการเปลี่ยนทางเคมีกายภาพในไส้กรอก พบว่าการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสม ทำให้มีปริมาณไขมันมากกว่าชุดควบคุม ทั้งนี้ในการวิเคราะห์ส่วนประกอบโดยประมาณ (proximate analysis) ของตัวอย่างอาหารต้องมีการวิเคราะห์ปริมาณความชื้น เถ้า โปรตีน และไขมัน สำหรับคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดคือส่วนที่เหลือโดยผลต่าง (นิธิยา รัตนาปนนท, 2554) ซึ่งจากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยการศึกษาส่วนประกอบโดยรวมของปลาส้มพบว่าส่วนที่เหลือโดยผลต่างคือคาร์โบไฮเดรตเนื่องจากมีแป้งจากข้าวเหนียวหรือข้าวสวยเป็นส่วนผสมในการผลิตปลาส้ม จากการศึกษาองค์ประกอบทาง

เคมีของปลาในครั้งนี้ พบว่าปลาส้มมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตอยู่ในช่วง 3.09±0.18– 10.66±0.38 ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีของปลาส้มในแต่ละท้องถิ่นจะมีความแตกต่างกันในเรื่องของวัตถุดิบ ส่วนผสม กระบวนการผลิต และชนิดของจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก

จากการตรวจวัดค่าสีพบว่าในวันที่ 0 ถึงวันที่ 3 ปลาส้มทั้ง 4 ชุดการทดลอง มีค่า L* a* b* ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเข้าสู่การหมักในวันที่ 3 และ 4 พบว่าค่า L*(ค่าความสว่าง) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยปลาส้มที่เติมเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* ให้ค่าความสว่างสูงที่สุดอยู่ ในขณะที่ค่า a* (ค่าความเป็นสีแดง) พบว่าปลาส้มทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีค่าความเป็นสีแดงมากกว่าสีเขียว และ ค่า b*(ค่าความเป็นสีเหลือง) พบว่าตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 4 ปลาส้มทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเข้าสู่วันสุดท้ายของการหมักพบว่า ปลาส้มที่เติมเชื้อ *L. plantarum* มีค่า b* มากที่สุด ในขณะที่ปลาส้มที่เติมเชื้อ *P. acidilactici*, เชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* กับ *L. plantarum* และชุดความคุมมีค่า b*ไม่แตกต่างกัน ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนของปลาส้ม (มผช. 26/2557) ได้ระบุไว้ว่าผลิตภัณฑ์ปลาส้มที่ผลิตขึ้นมาจะต้องมีสีตามธรรมชาติของปลาส้มแต่ละประเภท ไม่มีสีคล้ำ หรือสีผิดปกติและไม่พบการเจือสีสังเคราะห์(สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2557) จากการรายงานของพิทยา ใจคำ และรัชนี แก้วจินดา, (2560) ซึ่งศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลาส้มในระหว่างการหมักร่วมกับโพรไบโอติก *Lacticaseibacillus casei* 01 ที่ระดับแตกต่างกัน พบว่าเมื่อหมักปลาส้มครบ 3 วัน ปลาส้มจะมีค่าความสว่าง (L*) และค่าความเป็นสีเหลือง(b*) เพิ่มขึ้น นอกจากนี้การรายงานของปรมาภรณ์ เจ็ดวรรณะ และคณะ (2554) ซึ่งวิเคราะห์คุณภาพของแหนมเนื้อโคโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* P2 และ Sb2 เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนม พบว่า ปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักแหนมมีผลทำให้ค่าความสว่างและค่าความเป็นสีเหลือง ของแหนมมีค่ามากขึ้น จึงทำให้แหนมมีสีซีดซึ่งสอดคล้องกับค่า pH ที่ลดลง และปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นของปลาส้มที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธีเพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS จากนั้นทำการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก สามารถคัดแยกได้ 5 ไอโซเลทที่แตกต่างกัน เมื่อทำการจำแนกโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนตำแหน่ง 16S rRNA สามารถจำแนกออกเป็น 3 species คือ *P. pentosaceus, P. acidilactici* และ *L. plantarum* สอดคล้องกับรายงานของ Gupta, et al. (2021) ทั้งหมด ทั้ง 3 species ที่ทำการคัดแยกได้จากผลิตปลาหมัก (Shidal) เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลที่ได้จากวิธีเพาะเลี้ยงและข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในระดับเมต้าจีโนมิกส์พบว่า วิธีเมต้าจีโนมิกส์สามารถจำแนกแบคทีเรียจากปลาส้มได้ทั้งหมด 5 ไฟลัม ได้แก่ Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Proteobacteria โดยแบคทีเรียใน Phylum Firmicutes มี Taxonomy abundance สูงที่สุด 99.6 เปอร์เซ็นต์ มี species richness สูงที่สุด 35 species โดย *Leuconostoc lactis* พบมากในช่วงแรกของกระบวนการหมัก (25.3 เปอร์เซ็นต์) และลดลงเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก ในขณะที่ *P. acidilactici* และ *L. plantarum* พบมากเมื่อเข้าสู่กระบวนการหมักในวันที่ 3 และเมื่อสิ้นสุดการหมักในวันที่ 5 โดยพบ 25, 14.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Rodpai, et al., 2021 ที่ได้ศึกษาโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียในตัวอย่างปลาร้า โดยทำการเก็บตัวอย่างปลาร้าในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ประกอบด้วย จังหวัดขอนแก่น กาฬสินธุ์ และร้อยเอ็ด พบว่า ตัวอย่างปลาร้า มี Phylum Firmicutes มากที่สุดเช่นกัน เมื่อจำแนกตาม Genus พบว่า *Tetragenococcus*, *Halanaerobium* และ *Lactobacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่เป็นกลุ่ม Halophilic หรือแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีในที่ ๆ มีความเข้มข้นของเกลือสูงพบว่า มีความโดดเด่นมากที่สุด ทั้งนี้เมื่อนำโครงสร้างชุมชนของตัวอย่างปลาร้าที่คัดแยกได้มาเปรียบเทียบกับโครงสร้างชุมชนของปลาส้มที่ได้จากการศึกษานี้จะพบว่าในผลิตภัณฑ์ปลาหมักพบแบคทีเรียใน Phylum Firmicutes Family Lactobacillaceae มากที่สุด เมื่อจัดจำแนกตาม species แล้ว จะสังเกตได้ว่าผลิตภัณฑ์ปลาหมักทั้ง 2 ชนิดได้ species ที่แตกต่างกัน อาจเกิดจากการใช้วัตถุดิบ ความเข้มข้นของเกลือ หรือระยะเวลาการหมักที่แตกต่างกันออกไป

เมื่อตรวจสอบโครงสร้างชุมชนของปลาส้มนอกจาก 7 species ที่มีความโดดเด่น ยังพบ species อื่นที่มีความสำคัญเช่นกัน ได้แก่ *Lactobacillus delbrueckii*, *Latilactobacillus sakei* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ถูกใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมการผลิต มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก อีกทั้งยังมีบทบาทสำคัญในการหมักอาหารและส่งเสริมสุขภาพ (Yu, et al., 2022) *Limosilactobacillus fermentum* ซึ่งเป็นหนึ่งในโพรไบโอติกที่ได้รับการอธิบายว่ามีประโยชน์ต่อกระบวนการต้านการอักเสบและกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Rodríguez-Sojo, et al., 2021)

นอกจากนี้ยังพบโครงสร้างชุมชนของแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ รวมไปถึงแบคทีเรียก่อโรคอย่าง เช่น *Weissella confuse* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส มีความเกี่ยวข้องกับอาการทางคลินิกที่หลากหลายในมนุษย์ กรณีส่วนใหญ่พบเห็นได้ในสภาพแวดล้อมของการติดเชื้อแบบผสมผสาน เกิดขึ้นในคนที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Kamboj, et al., 2015) หรือพบ *Acinetobacter johnsonii* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีโอกาสน้อยในก่อโรคในมนุษย์ และ *A. johnsonii* ส่วนใหญ่ไวต่อยาปฏิชีวนะแทบทุกชนิด (Montaña, et al., 2016) ทั้งนี้ในกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคนั้น จะสามารถพบได้ในวันที่ 0 หรือเมื่อยังไม่เข้าสู่กระบวนการหมัก แต่เมื่อเวลาผ่านไปในวันที่ 3 จนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมักในวันที่ 5 พบว่า แบคทีเรียก่อโรคเหล่านั้นมีจำนวนลดลงหรือแทบไม่พบ อย่างไรก็ตาม วิธีเมต้าจีโนมิกส์มีค่า Q20 98.88 และ Q30 95.51 ซึ่งหมายความว่ายังมีบางส่วนที่ตรวจไม่พบ และมีความแม่นยำที่น่าเชื่อถือในระดับจีนัส ทั้งนี้หากประเมินในระดับจีนัสพบว่าทั้ง 2 วิธีตรวจพบเหมือนกันทั้ง 2 จีนัส คือ *P. acidilactici* และ *L. plantarum*

ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยในครั้งนี้ สามารถนำต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติกใช้เป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมปลาส้มหรืออุตสาหกรรมอาหารหมักอื่น ๆ เพื่อพัฒนาให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพมากยิ่งขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ทำให้ผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บรักษายาวนานและช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์ นอกจากนี้ผลการวิจัยที่ได้ถือเป็นข้อมูลสำคัญที่จะนำไปต่อยอดในการพัฒนาต้นเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้ในอนาคต เช่น อาจมีการศึกษาเกณฑ์ในการคัดเลือกโพรไบโอติกเพิ่มเติม เช่น การเกาะติดผนังลำไส้ สารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค หรือการต้านทานภาวะการก่อมะเร็งเพื่อให้เกิดประโยชน์และความปลอดภัยต่อผู้บริโภคเมื่อนำต้นเชื้อมาใช้ในในทางอุตสาหกรรมหรือเพื่อการค้าได้ในอนาคตต่อไป

บรรณานุกรม

จารุวรรณ มณีศรี. (2551). **เทคโนโลยีอาหารหมัก Fermented food technology (พิมพ์ครั้งที่ 2).**กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โฟร์เพซ.

จารุณี เกสรพิกุล และ สุรวัฒน์ ชะลอสันติสกุล (2562). การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากมูลไก่ประดู่หางดำ. **วารสารแก่นเกษตร**, 47(2), 1066-1070.

ชุลีพร ชำนาญค้า, จิราวรรณ์ เมืองนาค และสิรินาฏ เนติศรี (2560). การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นจากแหนมในจังหวัดสกลนคร. **วารสารมทร.อีสาน (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)**, 10(2), 96-106.

ไชยวัฒน์ ไชยสุต. (2556). **โพรไบโอติก จุลินทรีย์ทางเลือกเพื่อสุขภาพ** (พิมพ์ครั้งที่ 1). นนทบุรี: โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ.

นิธิยา รัตนาปนนท์. (2554). **หลักการวิเคราะห์อาหาร.** กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโ

นาถสุดา วิศวงค์ (2552). **การศึกษาจุลชีววิทยาของอาหารหมักพื้นเมือง ปลาเจ้า ปลาส้ม แล ปลาส้มฟัก.** การศึกษาค้นคว้าด้วยตนเอง วท. ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ

ปรมาภรณ์ เจ็ดวรรณะ คมแข พิลาสมบัติ รุจริน ลิ้มศุภวานิช อดิศร เสวตวิวัฒน์ และจุฑารัตน์ เศรษกุล.(2554). การศึกษาคุณภาพและจุลินทรีย์ของแหนมเนื้อโคโดยใช้เชื้อ *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* P 2 และ Sb 2 เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนม. **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า**, 29(3), 46-54.

ประสงค์สม ปุณยอุปพัทธ์ และสุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์. (2560). **กระบวนการและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตอาหารหมัก** (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปวีณา ดีกิจ และอทิพันธ์ เสียมไหม. (2559). การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในการผลิต ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและเทคนิค PCE-DGGE. ใน **รายงานฉบับสมบูรณ์** (หน้า 67). มหาวิทยาลัยสงขลา.

ผุสดี ตังวัชรินทร์ จิรโรจน์ นิธิสันถวะคุปต์ และกานต์ สุขสุแพทย์ (2559). การคัดแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติความเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก. **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า**, 34(2), 67-76.

พนิตนาฏ อู่พุฒินันท์ และวราภรณ์ กุศลารักษ์ (2563). การศึกษาคุณสมบัติของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์ในกระบวนการหมักปลาส้ม. **วารสารนเรศวรพะเยา**, 13(2), 42–50.

พิทยา ใจคำ และรัชนี แก้วจินดา. (2560). การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลาส้มในระหว่างการหมักร่วมกับโพรไบโอติก *Lactobacillus casei* 01 ที่ระดับแตกต่างกัน. **วารสารวิจัยและพัฒนาวไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**, 12(3).

ไพโรจน์ วิริยจารี, ชรินท์ เตชะพันธุ์, อำพิน กันธิยะ, เรวัตร พงษ์พิสุทธินันท์ และ ศิริลดา ศรีกอก (2549). การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาหมักโดยเทคนิคเชื้อบริสุทธิ์ แนวคิดดัดแปลงจากปลาส้มและปลาแป้งแดง. ใน **รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์** ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ภณิดา เกื้อสุวรรณ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และดวงพร คันธโชติ. (2557). การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผักดอง. ใน **การวิชาการระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 15. มหาวิทยาลัยขอนแก่น**. 667–676.

มาโนชญ์ สุธีรวัฒนานนท์. (2551) ปลาส้มสำเร็จรูปพร้อมรับประทาน. ใน **รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการปลาส้มสำเร็จรูปพร้อมรับประทาน** (หน้า 5). กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

สิริโชค วงศ์ศรีไพศาล, วลัยรัตน์ จันทรปานนท์ และ เพ็ญขวัญ ชมปรีดา. (2552). การศึกษาของแหนมปลาที่ใช้เชื้อบริสุทธิ์ในการผลิต. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการขอมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. **การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47**. (หน้า 540–547).

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. (2557). **มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน ปลาส้ม มาตรฐานเลขที่ มผช. 26/2557**. กระทรวงอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ.

สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. (2558). **การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาส้ม**. กรมวิทยาศาสตร์บริการ, กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

อังคณา ชมพูมิ่ง, ตะวัน ฉัตรสูงเนิน และธวัชชัย ชัยวัชวิถี. (2553). **การปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์ปลาส้ม ด้วยกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพ : กรณีศึกษาพื้นที่จังหวัด**

แพร่และจังหวัดพะเยา. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร. มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.

อังคณา รัตนพันธ. (2549). **การปรับปรุงคุณภาพและการเก็บรักษาปลาหมัก: ปลาสม.** วิทยานิพนธ วท. ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร, กรุงเทพฯ.

อุทัย เก้าเอี้ยน, (2549). โปรไบโอทิคส์. สงขลานครินทร์เวชสาร, 24(4), 315-323.

Abbasiliasi, S., Tan, J. S., Bashokouh, F., Ibrahim, T. A. T., Mustafa, S., Vakhshiteh, F., ... & Ariff, A. B. (2017). In vitro assessment of Pediococcus acidilactici Kp10 for its potential use in the food industry. **BMC microbiology**, 17(1), 1-11.

AlKalbani, N. S., Turner, M. S., & Ayyash, M. M. (2019). Isolation, identification, and potential probiotic characterization of isolated lactic acid bacteria and in vitro investigation of the cytotoxicity, antioxidant, and antidiabetic activities in fermented sausage. **Microbial cell factories**, *18*(1), 1-12.

AOAC International. (2000). **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17th Edition. AOAC International, Gaithersburg. MD, U.S.A.

AOAC (2005). **Official Methods of Analysis** (18th edition) Association of Official Analytical, Chemists International, Maryland, USA.

Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Ilavenil, S., Choi, K. C., & Srigopalram, S. (2016). In vitro importance of probiotic Lactobacillus plantarum related to medical field. **Saudi journal of biological sciences**, 23(1), 6-10.

Axelsson, L. T. (2004). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In Seppo, S. and Wright, V. A. (Eds.), **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker Inc.

Axelsson, L. T. (1993). Acid lactic bacteria: Classification and physiology: 1-63. *Lactic Acid Bacteria. Salminen, S. and von Wrigth, A.(Eds.) Marcel Dekker, Inc. NY.*

Boke, H., Aslim, B. and Alp, G. (2010). The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides (EPSS) produced by yogurt starter bacteria. **Archives of Biology Science**, 62, 323-328.

Cakir, I. 2003. Determination of some probiotic properties on Lactobacilli and Bifidobacteria. Ankara, Turkey: **Ankara University, Ph.D thesis.**

Chotima Potisap and Rasana Wongratanacheewin. (2010). Metagenomics. **Srinagarind Med J,** 25(1), 54–58.

Cleveland, J., Mantiville, T. J., Ness, I. F. and Chiknids, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, 71(1), 1–20.

CLSI. (2016) **Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. 3rd ed**. CLSI guideline M45. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Collins, M. D., Rodrigues, U., Ash, C., Agirre, M., Farrow, J. A. E., Martinez–Murcia, A., Phillips, B. A. M., and Wallbanks, S. (1991). Phylogenetic analysis of the genus Lactobacillus and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase seauencing of 16S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**, 77 (1), 5–12.

Dobson, C. M., Deneer, H., Lee, S., Hemmingsen, S., Glaze, S., & Ziola, B. (2002). Phylogenetic analysis of the genus Pediococcus, including Pediococcus claussenii sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from beer.**International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 52(6), 2003–2010.

Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Scheifer, K. H. and Stackebrande, E. (2006). A Hand book on the biology of bacteria. In Dworkin, M. (ed.), **Springer science+business media**. New York, NY.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G., Shanahan, F and Collins, J. K. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. **The American journal of clinical nutrition**, 73(2), 386–392.

Frank, H. K. 1992. Bacteriocin. Dictionary of Food Microbiology. **Technomic Publishing**, Co Inc., USA. p. 43.

Giri, S. S., Sen, S. S., Saha, S., Sukumaran, V., & Park, S. C. (2018). Use of a potential probiotic, *Lactobacillus plantarum* L7, for the preparation of a rice–based fermented beverage. **Frontiers in microbiology**, 9, 473(1–11).

Goel, A., Halami, P. M., & Tamang, J. P. (2020). Genome analysis of *Lactobacillus plantarum* isolated from some Indian fermented foods for bacteriocin production and probiotic marker genes. **Frontiers in microbiology**, 11, 40(1–12).

Gupta, S., Mohanty, U., & Majumdar, R. K. (2021). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented fish product Shidal of India with reference to their probiotic potential. **Lwt**, 146, 111641.

Gutiérrez–Cortés, C., Suarez, H., Buitrago, G., Nero, L. A., & Todorov, S. D. (2018). Characterization of bacteriocins produced by strains of *Pediococcus pentosaceus* isolated from Minas cheese. **Annuls of Microbiology**, 68(6), 383–398.

Hertzler, S.R. and Clancy, S.M. (2003). Kefir improves lactosedigestion and tolerace in adults with lactose maldigestion. **Journal of academy of nutrition and dietetics**, 103(5), 582–586.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994). **Bergy's manual of determinatve bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins.

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 strain. **Food Control**, 22, 401–407.

Kaktcham, P. M., Zambou, N. F., Tchouanguep, F. M., El–Soda, M., & Choudhary, M. I. (201 Antimicrobial and safety properties of lactobacilli isolated from two Cameroonian traditional fermented foods. **Scientia Pharmaceutica**, 80(1), 189–204.

Kamboj, K., Vasquez, A., & Balada–Llasat, J. M. (2015). Identification and significance of Weissella species infections. **Frontiers in Microbiology**, 6, 1204.

König, H. and Fröhlich, J. (2009). Lactic acid bacteri. In Helmut K. Jürgen F. and Gottfried U. (Eds.), **Biology of Microorganism on Grapes, In Must and in Wine** (pp. 3–46). Heidelberg: Johammes Gutenberg–University

Kopermsub, P. and Yunchalard, S. (2008). Safety control indices for plaa–som, a Thai fermented fish product. **African Journal of Microbiology Research**, 2, 18–25.

Kumar, A. M. and Murugalatha, N. (2012). Isolation of Lactobacillus plantarum from cow milk and screening the presence of sugar alcohol producing gene. **Journal of Food Microbiology and Antimicrobial**, 4(1), 16–22.

Kumar, V., Kumari, A., Angmo, K., & Bhalla, T. C. (2017). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional pickles of Himachal Pradesh, India. **Journal of food science and technology,** 54(7), 1945–1952.

Li, S., Li, Z., Wei, W., Ma, C., Song, X., Li, S., He, W., Tian, J and Huo, X. (2015). Association of mutation patterns in GyrA and ParC genes with quinolone resistance levels in lactic acid bacteria. **The Journal of antibiotics**, 68(2), 81–87.

Liu, Y. W., Liong, M. T., & Tsai, Y. C. (2018). New perspectives of *Lactobacillus plantarum* as probiotic: The gut–heart–brain axis. **Journal of Microbiology**, 56(9), 601–613.

Montaña, S., Schramm, S. T., Traglia, G. M., Chiem, K., Parmeciano Di Noto, G., Almuzara, M., ... & Ramírez, M. S. (2016). The genetic analysis of an Acinetobacter johnsonii clinical strain evidenced the presence of horizontal genetic transfer. **PLoS One**, 11(8), e0161528.

Murray, J. M., Tavassoli, M., Al–Harithy, R., Sheldrick, K. S., Lehmann, A. R., Carr, A. M., & Watts, F. Z. (1994). Structural and functional conservation of the human homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* rad2 gene, which is required for chromosome segregation and recovery from DNA damage. **Molecular and Cellular Biology**, 14(7), 4878–4888.

Müller, C. P., Huss, H. H., Gram, L. (1999). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Thai low–salt fermented fish product and the role of garlic as substrate for fermentation. **Journal of Food Microbiology**. 46(3), 219–229.

Müller, C. P., Madsen, M.,Sophanodora, P.,Gram, L. and Møller, P. L. (2002). Fermentation and microf lora of plaa–som, a Thai fermented fish product prepared with different salt concentrations. **International Journal of Food Microbiology**, 73 , 61– 70.

Narzary, Y., Das, S., Goyal, A. K., Lam, S. S., Sarma, H., & Sharma, D. (2021). Fermented fish products in South and Southeast Asian cuisine: indigenous technology processes, nutrient composition, and cultural significance. **Journal of Ethnic Foods**, 8(1), 1–19.

Nelson, R. R. 1999. Intrinsically vancomycin–resistant gram–positive organisms: clinical relevance and implications for infection control. **Journal of Hospital Infection**, 42 (4), 275–282.

Nevry, R. K., Ouina, T.S.T., Koussemon, M. and Brou, K. (2011). Chemical Composition and Lactic Microflora of *Adjuevan*, A Traditional Ivorian Fermented Fish Condiment. **Pakistan Journal of Nutrition**, 10(4), 332–337.

Panthavee, W., Saithong, P. and Worawuthiyanan, N. (May 23–25, 2007) Identification and Evaluation of Lactic acid bacteria for Pla–som (fermented fish) starter. In **The 2nd International Conference on"Fermentation technology for value added agricultural product"** (P.6). Khon Kaen: Kosa Hotel.

Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian archives of Biology and Technology**, 50, 512–542.

Rantsiou, K., Urso,R., Iacumin, L., Cantoni, C., Cattaneo, P., Comi, G. and Cocolin L. (2005). Culture–dependent and –independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. **Appiled and Enviromental Miceobiology**, 71(4), 1977–1986.

Rattanachaikunsopon, P and Phumkhachorn, P. (2008). Incidence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* subsp. lactis TFF 221 isolated from Thai fermented foods.**Journal of food protection**, 71(10), 2024–2029.

Rattanachaikunsopon, P and Phumkhachorn, P. (2010). Synergistic antimicrobial effect of nisin and p–cymene on *Salmonella enterica serovar Typhi* in vitro and on ready–to–eat food. **Biotechnology and biochemistry,** 74(3), 520–524.

Rodríguez–Sojo, M. J., Ruiz–Malagón, A. J., Rodríguez–Cabezas, M. E., Gálvez, J., & Rodríguez–Nogales, A. (2021). Limosilactobacillus fermentum CECT5716: **Mechanisms and Therapeutic Insights. Nutrients**, 13(3), 1016.

Sharma, R. (2014). **Selective enumeration, isolation and identification of Streptococcus thermophilus from Indian traditional curd to produce starter**

culture along with elevation of nutrient media for its mass commercial production. PhD Thesis

Ruddles, K. and Ishige N. (2010). On the origins, diffusion and cultural context of fermented fish products in Asia. In James Farrer (ed.), **Globalization, food and social identities in the Asia Pacific Region**. (pp 1–17). Tokyo: Sophia University Institute of Comparative Culture .

Ruiz, A.,Williams, S. k., Djeri, N., Hinton, A. Jr., Rodrick, G. E. (2010). Nisin affects the growth of *Listeria monocytogenes* on ready–to–eat turkey ham stored at four degrees Celsius for sixty–three days. **Poultry Science**, 89(2), 353–358.

Saisithi, P., Yongmanitchai, P., Chimanage, P., Wongkhalaung, C., Boonyaratanakornkit, M., and Maleehuan, S. (1996). Improvement of a Thai traditional fermented fish products: Somfak. **Food and Agricultural Organisation of the United Nations**.

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(5), 553–557.

Sanders, M. E., Akkermans, L. M., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J. T., Hörmannsperger, G., & Huys, G. (2010). Safety assessment of probiotics for human use. **Gut microbes**, 1(3), 164–185.

Sanpa, S., Sanpa, S. and Suttajit, M. (2019. Lactic acid bacteria isolates from Pla–som, their antimicrobial activities and fermentation properties in Pla–som. **Journal of Food Health and Bioenvironmental Science**, 12(1), 36–43.

Shen, C. and Zhang, Y. (2017). **Food microbiology laboratory for the food science student**. Springer Nature Switzerland AG. Switzerland.

Sriphannam, C., & Kummasook, A. (2020). Evaluation of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Fish. **Naresuan University Journal: Science and Technology (NUJST)**, 28(1), 105–115.

Tanasupawat, S. and Komagata, K. (1995). Lactic acid bacteria in fermented foods in Thailan **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 11(3), 253–256.

Yim, D. G., Chung, Y. H., & Nam, K. C. (2017). Effects of starter cultures on physicochemical properties of fermented sausages. **The Korean Journal of Food And Nutrition**, 30(5), 1105–1112

Yuliana, N., Koesoemawardani, D., Susilawaty, Kurniati, Y. (2018). Lactic acid bacteria during fish fermentation (rusip). **MOJ Food Process Technol**, 6(2), 211–216.

Yu, L., Chen, Y., Duan, H., Qiao, N., Wang, G., Zhao, J., ... & Chen, W. (2022). Latilactobacillus sakei: a candidate probiotic with a key role in food fermentations and health promotion. Critical Reviews in **Food Science and Nutrition**, 1–18.

Zang, J., Xu, Y., Xia, W., & Regenstein, J. M. (2019). Quality, functionality, and microbiology of fermented fish: a review. Critical Reviews in **Food Science and Nutrition**, 60(7), 1228–1242

Zeng, X., Xia, W., Jiang, Q., & Yang, F. (2013). Effect of autochthonous starter cultures on microbiological and physico–chemical characteristics of Suan yu, a traditional Chinese low salt fermented fish. **Food Control**, 33(2), 344–351.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Plate count agar (Himedia™, India) ชั่งอาหาร 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.4±0.2 เติมผงวุ้นไป 15 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2. De Man, Rogosa and Sharpe agar (Himedia™, India) ชั่งอาหาร 55.15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.4±0.2 เติมผงวุ้นไป 15 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

3. Eosin methylene blue (Himedia™, India) ชั่งอาหาร 22.46 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.4±0.2 เติมผงวุ้นไป 15 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

4 MacConkey agar (Himedia™, India) ชั่งอาหาร 51.53 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.4±0.2 เติมผงวุ้นไป 15 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

5 Yeast extract peptone dextrose broth (Himedia™, India) ชั่งอาหาร 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

6 Manital salt agar (Himedia™, India) ชั่งอาหาร 111.02 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.4±0.2 เติมผงวุ้นไป 15 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

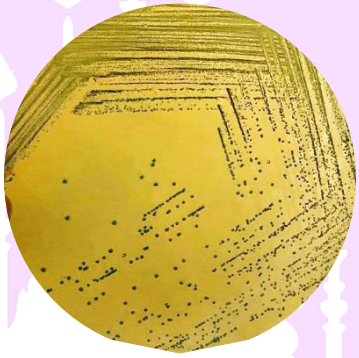
7 Mueller hinton broth (Himedia™, India) ชั่งอาหาร 38 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.4±0.2 เติมผงวุ้นไป 15 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

8 Nutrient broth (Merck, Germany) ชั่งอาหาร 8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 0.5 ลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.4±0.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

9 **Blood agar base infusion agar (BD BBL™, France)** ชั่งอาหาร 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.4±0.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว รอให้อาหารเย็นลงประมาณ 45–50 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติมเลือดลงไป 50 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก

1. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS ที่เติม Bromocresol green โดยชั่งตัวอย่างปลาส้ม 25 กรัม ใส่ลงในสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 225 มิลลิลิตร streak plate บนอาหาร MRS ที่มี bromocresol green 0.004 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเขียวเป็นสีเหลือง



ภาพ 10 การคัดแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS ที่เติม Bromocresol green

2. การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง นำเชื้อมา streak ลงบนจานอาหาร Blood agar ที่ผสม human blood บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนอาหารว่าเป็นกลุ่มใด กลุ่ม Alpha-hemolysis,, Beta-hemolysis หรือ Gamma-hemolysis

ก) Referenceเป็นการย่อยแบบ Beta hemolysis

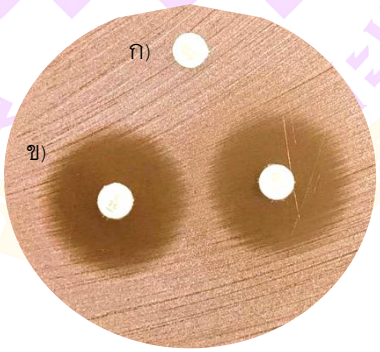
ข) ไอโซเลททดสอบ เป็นการย่อยแบบ Gamma hemolysis

ภาพ 11 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

3. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ใช้วิธี Agar well diffusion โดยใช้ไม้พันสาลีจุ่มเชื้อแบคทีเรียก่อโรคระบบทางเดินอาหารในอาหาร NA เกลี่ยบน MHA จากนั้นเจาะหลุมบน MHA นำส่วนใสจากการปั่นเหวี่ยงของแบคทีเรียกรดแลคติกหยอดใส่หลุมบน MHA หลุมละ 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตพื้นที่ใส

ภาพ 12 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร

4. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยวิธี Disc diffusion นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่เจริญใน MRS broth อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง มา swab ลงบนอาหาร MRS agar จากนั้นวางแผ่นยาปฏิชีวนะ ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการยับยั้งโดยสังเกตวงใส



ก) Resistant (R) ข) Susceptible (S)

ภาพ 13 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ภาคผนวก ค ปลาส้ม

วันที่ 0 วันที่ 1 วันที่ 2

วันที่ 3 วันที่ 4 วันที่ 5

ภาพ 14 ปลาส้มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียกรดแลคติกโดย หมักวันที่ 0 ถึง วันที่ 5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ภาพ 15 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

ภาคผนวก ง การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารมาตรฐาน 0.5 Mcfarland standard ดูดสารละลาย Barium chloride ความเข้มข้น 1.175 เปอร์เซ็นต์ มา 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ Sulfuric acid) 1 เปอร์เซ็นต์ เก็บใส่หลอดฝาเกลียว ใช้อะลูมิเนียมฟอยล์ปิดให้มิด และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยความขุ่นของสารมาตรฐาน 0.5 Mcfarland standard จะมีค่าเท่ากับความขุ่นของเชื้อที่ 1.5x108 CFU/ml

2. สารละลายโซเดียมคลอไลด์ (NaCl) 0.85% ชั่ง NaCl จำนวน 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรครบ 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

3. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 M ชั่ง NaOH จำนวน 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรครบ 1 ลิตร

4. การเตรียม pepsin (0.3%, w/v) เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ Phosphate–buffer saline (PBS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำสารละลายบัฟเฟอร์ไปปรับ pH ให้ได้ 2 และ 3 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เติม Pepsin ร้อยละ 0.3 น้ำหนักต่อปริมาตร โดยกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน

5. การเตรียม Bile salt (0.3%, w/v) เตรียมน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เติม Bile salt ร้อยละ 0.3 น้ำหนักต่อปริมาตร โดยกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน

ภาคผนวก จ ข้อมูลดิบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ BPS2, BPS4, BPS5, BPS6 และ BPS7

BPS2 : *Pediococcus pentosaceus*

TCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTTCCGTTAATTGATTATG
ACGTACTTGTACTGATTGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTA
ACCTGCCCAGAAGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACC
GCATGGTTTTCTTTTAAAAGATGGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAG
TTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACAT
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACG
CAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAA
AGAAGAACGTGGGTAAGAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAG
CGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGA
AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT
ATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGC
ATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGATTACTAAGTGTTGG
AGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTAATCCGCCTGGAGA

BPS4 : *Pediococcus acidilactici*

TCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTTCCGTTAATTGATCAG
GAAGTGCTTGCACTGAATGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG
TAACCTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAA
CCGCCTGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA
GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGATGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACA
TTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGAC
GCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTA
AAGAAGAACGTGGGTGAGAGTAACTGTTCACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA
GCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGG
AAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
TATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAG
CATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGATTACTAAGTGTTG
GAGGGTTTCTGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAGTAAGTAATCCGCCGAGAGA

BPS5 : *Pediococcus acidilactici*

AGGATGAACGCCGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTTCCGTTAATTGATTATGA
CGTGCTTGCACTGAATGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA
ACCTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACC
GCCTGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGT
TGGCGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGATGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATT
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGC
AAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAA
GAAGAACGTGGGTGAGAGTAACTGTTCACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGC
GAGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAA
ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA
TATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCA
TGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGATTACTAAGTGTTGGA
GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTAATCCGCCTAGAGA

BPS6 : *Lactiplantibacillus plantarum*

GGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTG
CATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAG
CGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGCT
TGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAAC
GGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACA
CGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGA
GCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCT
GAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGT
TTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGA
GTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACC
AGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTT
CTAGTGCTGCAGCTAACGCA

BPS7 : *Lactiplantibacillus plantarum*

CGCTGGCGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCAT
GATTTACATCTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGG
ATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAG
ATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCA
CCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC
AAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACG
CCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGT
AACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAA
GTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAG
AAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGC
GAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGC
TGCAGCTAACGCATTAAGCATCCGCCTGGAGACGCCCACCGT

ภาคผนวก ฉ ข้อมูล Primer

PCR Primer Name Primer Sequences

27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3'

1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

Sequencing Primer Name Primer Sequences

785F 5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'

907R 5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'

ภาคผนวก ช เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ศึกษาไอโซเลทต่าง ๆ กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล ncbi

ตาราง 16 เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลทต่าง ๆ กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล ncbi

Query			Subject				Identities
Name	Length	AC	Gene	Length	Start	End	Pct.(%)
BPS2_785F	706	HE616189.1	*Pediococcus pentosaceus* partial 16S rRNA gene, isolate BS14-18	942	255	941	99
BPS2_907R	932	KP119819.1	*Pediococcus pentosaceus* strain 12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1538	924	18	99
BPS3_785F	706	LC311073.1	*Pediococcus acidilactici* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: JCM 20119	1513	831	1510	99
BPS3_907R	935	LC311071.1	*Pediococcus acidilactici* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: JCM 15055	1516	905	3	99
BPS4_785F	703	LC311073.1	*Pediococcus acidilactici* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: JCM 20119	1513	831	1512	99
BPS4_907R	931	KU504251.1	*Pediococcus acidilactici* strain NRCC1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1569	911	15	99
BPS5_785F	706	LC311073.1	*Pediococcus acidilactici* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: JCM 20119	1513	831	1511	99
BPS5_907R	935	AF515229.1	*Pediococcus acidilactici* strain RO17 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1544	913	18	99
BPS6_785F	707	KX838907.1	*Lactobacillus plantarum* strain VITDM15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	711	7	685	99
BPS6_907R	924	KY041688.1	*Lactobacillus plantarum* strain Gt2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	941	941	46	99
BPS7_785F	705	LT853604.1	*Lactobacillus plantarum* partial 16S rRNA gene, strain Lan4	1515	823	1512	99
BPS7_907R	938	KY041686.1	*Lactobacillus plantarum* strain Cys5-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	942	939	19	99

มหาวิทยาลัยพะเยา
UNIVERSITY OF PHAYAO

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ–สกุล	ศศิมาภรณ์ ดอยลอม
วัน เดือน ปี เกิด	9 กุมภาพันธ์ 2538
สถานที่เกิด	เชียงราย
วุฒิการศึกษา	พ.ศ.2560 วท.บ. (จุลชีววิทยา), มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก
ที่อยู่ปัจจุบัน	19 หมู่ 1 ตำบลหนองแรด อำเภอเทิง จังหวัด เชียงราย
ผลงานตีพิมพ์	ศศิมาภรณ์ ดอยลอม พนิตนาฏ อู่พุฒินันท์ รณกร สร้อยนาค และ วนิดา แซ่จึง. (18 ธันวาคม 2564). การคัดเลือกและการระบุเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกในปลาส้ม จากจังหวัดพะเยา. ใน การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 53 (หน้า 28–37). มหาวิทยาลัยราภัฏเชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัย.