การคัดเลือกและใช้แบคทีเรียกรดแลคติกและราเทมเป้หมักวัสดุเศษเหลือจากปลา

Selection and utilization of lactic acid bacteria and tempe mold for fermentation of fish by-product

เกศินี จันทรโสภณ[1] วรพล สุรพัฒน์[2] เสรี จันทรโสภณ[2]

Kesinee Chantharasophon[1] Worapon Surapat[2] Seree Chantharasopon[2]

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี 34000

[1, 2] Department of Microbiology, Faculty of Science, Ubon Ratchathani Rajabhat University, Ubon Ratchathani, 34000

[1] Corresponding author: 045-352000, FAX 045-352070, E-mail:kesineechan@gmail.com

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกจากตัวอย่างปลาส้มและเชื้อราเทมเป้จากตัวอย่างแป้งเชื้อเทมเป้เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อหมักวัสดุเศษเหลือจากปลาแบบปลาส้ม ผลการศึกษาพบว่า คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ได้ 3 ไอโซเลตคือ L1, L2 และ P1 ผลการจัดจำแนกเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลตในระดับจีนัส พบว่ามีสมบัติเป็น *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus* sp., และ *Pediococcus* sp. ตามลำดับ คัดเลือกเชื้อราเทมเป้ที่ไม่ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินจากแป้งเชื้อเทมเป้ พบว่าคัดเลือกได้เชื้อ *Rhizopus oligosporus* VA1 เมื่อใช้กล้าเชื้อที่คัดเลือกได้หมักวัสดุเศษเหลือจากปลาแบบปลาส้มพบว่า เชื้อ *Rhizopus oligosporus* VA1 เป็นกล้าเชื้อที่ทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนในปลาส้มจากวัสดุเศษเหลือของปลาสูงกว่าการใช้แบคทีเรียกรดแลกติกแบบเชื้อผสมของไอโซเลต L1, L2 และ P1 โดยปลาส้มอบแห้งที่ได้มีค่า pH เป็น 5.30±0.01 ค่าปริมาณความชื้น กรด โปรตีนละลาย โปรตีนทั้งหมด และค่า degree of protein hydrolysis เป็นร้อยละ 5.94±1.19, 1.83±0.08, 8.90±0.01, 17.35±0.23 และ 51.31±0.70 ตามลำดับ

คำสำคัญ : วัสดุเศษเหลือจากปลา, ปลาส้ม, แบคทีเรียกรดแลกติก, แป้งเชื้อเทมเป้

Abstract

The objectives of this research were to select lactic acid bacteria from Plaa-som samples and tempe mold from Ragi tempe samples and use as inoculum in fermented fish by-product like Plaa-som. The results revealed that 3 isolates of lactic acid bacteria, L1, L1, and P1 which were isolated from Plaa-som samples showed anti-pathogenic bacterial effect against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. These 3 isolated were classified into genus level and their properties were expressed as *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus* sp., and *Pediococcus* sp., respectively. Isolation of non-aflatoxin producing mold from Ragi tempe samples was studied. It was found that *Rhizopus oligosporus* VA1 was selected. Utilization of the selected microorganisms to produce Plaa-som from fish by-products was performed and the results revealed that the use of *Rhizopus oligosporus* VA1 as inoculum exhibited higher protein digestion of Plaa-som fermentation from fish

by-products than the use of mixed lactic acid bacteria, L1, L2 and P1. The pH value, moisture, acidity, soluble protein, total protein, and degree of protein hydrolysis of this dried product were 5.30±0.01, 5.94±1.19%, 1.83±0.08%, 8.90±0.01%, 17.35±0.23% and 51.31±0.70%, respectively.

Keywords: Fish by products, Plaa-som, Lactic acid bacteria, Ragi tempe

บทนำ

การผลิตปลาส้มในพื้นที่ของภาคอีสานนั้น มีตัวเลขรายงานการผลิตปีละประมาณ 1,170-1,352 ตัน (Chompuming *et al.,* 2009) รูปแบบของปลาส้มที่ผลิตมีแบบปลาส้มตัวทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ ปลาส้มฟัก และปลาส้มชิ้น ซึ่งปัจจุบันนิยมผลิตปลาส้มชิ้นมากขึ้นเนื่องจากสะดวกต่อการบริโภคและขายได้ราคาดีกว่า ส่งผลให้มีวัสดุเศษเหลือจากการผลิตปลาส้มมากขึ้น มีรายงานว่าสารสกัดจากโครง กระดูก หนัง ครีบและเกล็ดปลาเป็นสารอาหารที่มีมูลค่าสูง เช่น ช่วยการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูกและการสะสมแคลเซียม สารสกัดคอลลาเจนและเจลาตินจากหนัง ครีบ และเกล็ดปลานั้นนิยมใช้ในการรักษาผู้ที่มีอาการข้อเสื่อมจากการขาดคอลลาเจน นอกจากนี้ยังมีส่วนของเครื่องในปลาที่ให้น้ำมันปลาและน้ำมันตับปลา สารต้านเชื้อราและสารต้านแบคทีเรียที่ผิวหนัง (Zhang *et al*., 2011; Jodnak, 2013; Kutako *et al.,* 2015; Phuc, 2016) ในการผลิตสารมูลค่าสูงจากเศษเหลือปลามักใช้วิธีการย่อยสลายวัตถุดิบด้วยความร้อน สารเคมี และเอนไซม์ โดยต้องอาศัยการปฏิบัติงานที่แม่นยำและมีขั้นตอนในการควบคุมปฏิกิริยาที่ซับซ้อน หากมีข้อผิดพลาดอาจมีความเสี่ยงต่อการได้สารพิษหรือมีความเสียหายในกระบวนการผลิต

สำหรับการผลิตอาหารหมักแบบพื้นบ้านนั้นใช้เทคโนโลยีอย่างง่ายไม่ซับซ้อน ใช้ภูมิปัญญาแบบดั้งเดิมคืออาศัยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติร่วมกับการจัดสภาวะการหมักที่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ ต่อมามีการเรียนรู้วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อผลิตเป็นกล้าเชื้อผสมและพัฒนาเป็นเชื้อบริสุทธิ์ จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักจะผลิตเอนไซม์ออกมาเปลี่ยนวัตถุดิบให้เป็นสารอาหารที่ดูดซึมไปใช้ได้สูง จากการศึกษาของ Giri *et al.* (2012) ที่ใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* เป็นกล้าเชื้อหมักวัสดุเศษเหลือจากปลา และพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีโปรตีนสายสั้นที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงถึงร้อยละ 80 และการศึกษาของ Wu *et al.* (2017) ที่ใช้แบคทีเรีย 6 สายพันธุ์หมักวัสดุเศษเหลือจากปลาแซลมอล พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีไฮโดรไลเสตเปปไทด์ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงถึงร้อยละ 74.06 แสดงว่ากล้าเชื้อราและกล้าเชื้อแบคทีเรียเป็นกล้าเชื้อที่มีศักยภาพในการใช้หมักวัสดุเศษเหลือจากปลาได้ จากรายงานของ Rubina *et al.* (2018) พบว่าการใช้เชื้อรา *Rhizopus oligosporus* ML-10 หมักเทมเป้ข้าวบาร์เล่ย์นั้น ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนที่ร่างกายนำไปใช้ได้สูงขึ้นถึงร้อยละ 64.3 นอกจากนี้ Prasetyo *et al.* (2018) พบว่าการหมักแป้งมันด้วยเชื้อ *Rhizopus oligosporus* สามารถลดปริมาณไซยาไนด์และเปลี่ยนให้เป็นโปรตีนเพิ่มขึ้นได้ แต่เชื้อราเทมเป้ที่ใช้จะต้องไม่ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการใช้เชื้อ *Rhizopus oligosporus* หมักวัสดุเศษเหลือจากปลา

วัตถุดิบที่เป็นเศษเหลือจากปลานั้นมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคสูง (Srisakultiew *et al*., 2014) จึงต้องหาวิธีที่ลดหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคที่ติดมากับวัตถุดิบ Hongsachart (2016) ได้ศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างปลาส้มในจังหวัดหนองคาย พบว่าไอโซเลท L8-16 และ

L7-1 ให้ผลต่อต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวก สำหรับเชื้อราเทมเป้นั้น Noviana *et al*., (2018) รายงานว่าสารสกัดของเทมเป้กากถั่วเหลืองแบบไฮโดรไลเสตนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และเชื้อ *Steptococcus mutans* ได้ จึงสนใจศึกษาการใช้เชื้อราเทมเป้ที่ไม่ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินเป็นกล้าเชื้อผลิตปลาส้มจากวัสดุเศษเหลือจากปลาเปรียบเทียบกับการใช้แบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 จุลินทรีย์: ดังนี้

2.1.1 เชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี และเชื้อ *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 (ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

2.1.2 เชื้อรา *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001 (ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

2.2 การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกจากปลาส้ม

2.2.1 เก็บตัวอย่างปลาส้ม โดยเป็นปลาส้มที่ผลิตและจำหน่ายในจังหวัดอุบลราชธานีและจังหวัดยโสธรในระหว่างเดือนมกราคม-เมษายน พ.ศ. 2560 จำนวน 10 ตัวอย่าง

2.2.2 การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติก (ดัดแปลงวิธีการของ Chantharasophon *et al.,* 2011; Chantharasophon *et al.,* 2017)

คัดแยกเชื้อจากตัวอย่างปลาส้มด้วยวิธีขีดลากเชื้อแบบไขว้บนอาหารวุ้น *De* Man Rogosa and Sharpe (MRS agar) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน เลือกแบคทีเรียกรดแลกติกซึ่งจะมีโคโลนีขนาดเล็กสีเหลืองโดยเลือกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีต่างกันไปขีดลากเชื้อซ้ำอีก 7-10 ครั้งจนได้เชื้อบริสุทธิ์ ทดสอบสมบัติการทนเกลือ กิจกรรมเอนไซม์ย่อยโปรตีน และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Aeromonas hydrophila* นำเชื้อที่คัดเลือกได้มาจัดจำแนกเชื้อในระดับจีนัสโดยนำสมบัติตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีเปรียบเทียบกับการจัดจำแนกเชื้อของ Bergy's Manual of Determinative Bacteriology (Vos *et al.,* 2009)

2.3 การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อ *Rhizopus oligosporus* จากแป้งเชื้อเทมเป้

2.3.1 เก็บตัวอย่างแป้งเชื้อเทมเป้ โดยเป็นแป้งเชื้อเทมเป้จากศูนย์บริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 1 ตัวอย่าง และแป้งเชื้อจากเตมเปปัตตานี (146/85 ถนนหลังมอ อำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี) 1 ตัวอย่าง

2.3.2 การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อ *Rhizopus oligosporus* (ดัดแปลงวิธีการของ Chantharasophon *et al.,* 2015)

ใช้วิธีการเพาะเชื้อแบบ Spread plate บนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง เลือกขยุ้มเส้นใยเชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันมาเพาะเชื้อซ้ำอีก 7-10 ครั้งจนได้เชื้อบริสุทธิ์ เลือก

เชื้อที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *Rhizopus oligosporus* TISTR 3001 โดยการเจริญบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เชื้อเจริญเติบโตเร็ว ฟู และอัดแน่นเต็มจานเพาะเชื้อ และบนอาหาร Coconut agar ที่วุ้นอาหารใต้โคโลนีเชื้อไม่มีสีเหลืองส้ม และไม่มีการเรืองแสง UV ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

2.4 การผลิตปลาส้มโดยใช้กล้าเชื้อที่คัดเลือกได้

2.4.1 เตรียมกล้าเชื้อสำหรับใช้ผลิตปลาส้ม

1) เพาะเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้บนอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน ถ่ายเชื้อ 15 มิลลิลิตร ลงบนอาหารข้าวสุก (ข้าวต่อน้ำกลั่นเป็น 10:7) 50 กรัมในขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 วันก่อนใช้เป็นกล้าเชื้อ

2) เพาะเชื้อ *Rhizopus oligosporus* ที่คัดเลือกได้บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน ถ่ายเชื้อโดยตัดชิ้นวุ้นอาหารที่เพาะเชื้อเป็นชิ้นขนาด 1 ตารางเซนติเมตร 3 ชิ้นนำไปคลุกผสมกับอาหารข้าวสุก 50 กรัมในขวดแก้ว บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 วันก่อนใช้เป็นกล้าเชื้อ

2.4.2 ผลิตปลาส้มจากวัสดุเศษเหลือของปลา (ดัดแปลงวิธีการของ Chompuming *et al.,* 2009; Giri *et al*., 2012; Wu *et al.,* 2017) โดยมีส่วนผสมของหัวและโครงปลาสับ 1,000 กรัม กระเทียมบด 100 กรัม เกลือ 100 กรัม ข้าวเหนียวนึ่งสุก 150 กรัม และเติมกล้าเชื้อต่างกัน 3 สูตรๆ ละ 3 ซ้ำ ดังนี้

สูตร 1 เติมอาหารข้าวสุกปลอดเชื้อ 50 กรัม (กลุ่มควบคุม)

สูตร 2 เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่เพาะบนอาหารข้าวสุก 50 กรัม

สูตร 3 เติมกล้าเชื้อ *Rhizopus oligosporus* ที่เพาะบนอาหารข้าวสุก 50 กรัม

คลุกส่วนผสมทุกส่วนให้เข้ากันทั่วถึงดีบรรจุส่วนผสมลงในภาชนะขวดแก้ว อัดให้เต็มและปิดฝาให้สนิท หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 วัน ตรวจการเปลี่ยนแปลงของสี กลิ่น และลักษณะปรากฏที่ผิวหน้าของปลาส้มในภาชนะหมัก

2.5 ตรวจคุณภาพปลาส้มทางจุลินทรีย์ ทางกายภาพ และทางเคมี

2.5.1 ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดแบบ Standard plate count และแบคทีเรียกรดแลกติกตามวิธีการของ Chantharasophon *et al.* (2011) ตรวจแบคทีเรียก่อโรคประกอบด้วย *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, Coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (Prachasitthisak *et al*., 2009: online)

2.5.2 ตรวจโครงสร้างแข็งของปลาส้ม โดยนำปลาส้มปริมาณ 1,000 กรัมใส่หม้อ Pressure cooker เติมน้ำสะอาด 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนมีไอน้ำพ่นผ่านวาว์แรงดันออกมาปรับให้ไอน้ำพ่นอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 30 นาที กรองแยกส่วนของโครงสร้างแข็งที่เหลืออยู่มาล้างทำความสะอาด สะเด็ดน้ำนาน 30 นาที แล้วชั่งน้ำหนักที่ได้เพื่อคำนวณหาร้อยละของโครงสร้างแข็งที่เหลืออยู่เทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น

2.5.3 นำปลาส้มอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงหรือจนแห้งสนิท วิเคราะห์คุณภาพทางเคมี ประกอบด้วย pH ปริมาณความชื้น กรด (เทียบกับกรดแลกติก) โปรตีนละลาย โปรตีนทั้งหมด

(Jodnak, 2013) และคำนวณหา degree of protein hydrolysis เป็นร้อยละของอัตราส่วนของโปรตีนละลายต่อโปรตีนทั้งหมด (ดัดแปลงจาก Raikate *et al.,* 2011)

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ: วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยคุณภาพทางทางเคมีระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาส้ม 3 สูตรแบบ One-way analysis of variance เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มตัวอย่างแบบ Duncan's new multiple range tests

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากตัวอย่างปลาส้ม

3.1.1 ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากตัวอย่างปลาส้มในเขตจังหวัดอุบลราชธานีและจังหวัดยโสธรจำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่า สามารถคัดแยกเชื้อที่มีรูปร่างเชื้อเป็น Cocci จำนวน 5 ไอโซเลต Tetracocci จำนวน 4 ไอโซเลต และ Lactobacilli จำนวน 9 ไอโซเลต รวม 18 ไอโซเลต

3.1.2 ผลการศึกษาสมบัติการทนเกลือ โดยนำเชื้อที่คัดแยกได้จำนวน 18 ไอโซเลตไปเพาะในอาหาร MRS broth ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 7 พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้เจริญในอาหารที่มีเกลือร้อยละ 7 จำนวน 3 ไอโซเลต โดยเป็นเชื้อที่จัดเรียงเซลล์แบบ Lactobacilli จำนวน 2 ไอโซเลต โดยให้รหัสเชื้อเป็น L1 และ L2 และเชื้อที่จัดเรียงเซลล์แบบ Tetracocci จำนวน 1 ไอโซเลต ให้รหัสเชื้อเป็น P1

3.1.3 ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน โดยนำเชื้อรหัส L1, L2 และ P2 ที่คัดแยกได้ไปเพาะเชื้อแบบ Point inoculation บนอาหาร MRS agar ที่เติม Skimmed milk ร้อยละ 1 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน พบว่า แบคทีเรีย L1, L2 และ P1 สร้างโซนใสที่บ่งชี้ว่ามีกิจกรรมการย่อยโปรตีน โดยวัดขนาดรัศมีโซนใสได้ 2.0$\pm$0.5, 1.5$\pm$0.5 และ 2.0$\pm$0.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ

3.1.4 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่า

1) แบคทีเรียกรดแลกติก L1, L2 และ P1 สร้างโซนใสที่บ่งชี้ว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ โดยมีขนาดรัศมีโซนใสเป็น 2.0$\pm$0.5, 1.0$\pm$0.5 และ 2.5$\pm$0.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ และของ Disc drug ที่เป็น Streptomycin 30 ไมโครกรัมวัดได้ 5.5$\pm$0.5 มิลลิเมตร

2) แบคทีเรียกรดแลกติก L1, L2 และ P1 สร้างโซนใสที่บ่งชี้ว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ได้ โดยมีขนาดรัศมีโซนใสเป็น 1.0$\pm$0.5, 1.0$\pm$0.5 และ 2.0$\pm$0.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ และของ Disc drug ที่เป็น Kanamycin 30 ไมโครกรัมวัดได้ 4.5$\pm$0.5 มิลลิเมตร

3) แบคทีเรียกรดแลกติก L1, L2 และ P1 ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และของ Disc drug ที่เป็น Kanamycin 30 ไมโครกรัมวัดได้ 5.0$\pm$0.2 มิลลิเมตร

3.1.5 ผลการจัดจำแนกเชื้อในระดับจีนัส โดยใช้สมบัติตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมี พบว่าเชื้อไอโซเลต L1 และ L2 มีสมบัติเป็นแบบเชื้อ *Lactobacillus* spp. (Table 1) และ P1 มีสมบัติเป็นแบบเชื้อ *Pediococcus* sp. (Table 2)

Table 1 Comparison of cell shape, cell arrangement and biochemical properties of the selected isolates, L1 and L2 with *Lactobacillus* spp.

Properties test	*Lactobacillus* spp.	L1	L2
Cell shape	Bacilli	Bacilli	Bacilli
Cell arrangement	Streptobacilli	Streptobacilli	Streptobacilli
Gram	Positive	Positive	Positive
Motility	Negative	Negative	Negative
Catalase	Negative	Negative	Negative
Casein hydrolysis	Positive	Positive	Positive
Growth in 7% NaCl	Positive/negative	Positive	Positive
Growth at 10°C	Positive/negative	Positive	Positive
Growth at 45°C	Positive/negative	Negative	Negative
Growth at pH 4.4	Positive/negative	Positive	Positive
Growth at pH 9.6	Negative	Negative	Negative

Table 2 Comparison of cell shape, cell arrangement and biochemical properties of the selected isolates, P1 with *Pediococcus* spp.

Properties test	*Pediococcus* spp.	P1
Cell shape	Coccii	Coccii
Cell arrangement	Tatrad	Tatrad
Gram	Positive	Positive
Motility	Negative	Negative
Catalase	Negative	Negative
Casine hydrolysis	Positive	Positive
Growth in 7% NaCl	Positive/negative	Positive
Growth at 10°C	Positive/negative	Positive
Growth at 45°C	Positive/negative	negative
Growth at pH 4.4	Positive	Positive
Growth at pH 9.6	Negative	Negative

ผลการศึกษาครั้งนี้คล้ายกับผลการศึกษาของ Thongruck *et al.* (2017) ที่ได้คัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกที่เป็นเชื้อเด่นจากตัวอย่างกุ้งส้ม และพบว่าในกุ้งส้มมีแบคทีเรียเด่นจัดจำแนกได้เป็นเชื้อ *Pediococcus argentinicus, Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus garvieae, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus sakei* และ *Lact. Plantarum* ซึ่งพบว่าแบคทีเรียเหล่านี้มาจากวัตถุดิบที่ใช้ผลิต และช่วยให้ผลิตภัณฑ์กุ้งส้มมีลักษณะที่ต้องการและไม่เน่าเสียจากแบคทีเรียก่อโรค ผลที่ได้ครั้งนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Hongsachart (2016) ที่คัดแยกได้แบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างปลาส้ม 37 ไอโซเลท แบ่งเป็นรูปร่างกลม 8 ไอโซเลท และรูปร่างแท่ง 29 ไอโซเลท แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลทหมายเลข L8-16 ที่คัดแยกจากปลาส้มแสดงการยับยั้งต่อเชื้อ *Shigella* sp., *Pseudomonas* sp. *Bacillus megaterium, Bacillus cereus, Escherichia coli* และ *Salmonella* Typhi

3.2 ผลการคัดแยกและคัดเลือกเชื้อ *Rhizopus oligosporus* จากตัวอย่างแป้งเชื้อเทมเป้

ผลการคัดเลือกเชื้อจากตัวอย่างแป้งเชื้อเทมเป้ พบว่าแป้งเชื้อจากเตมเปปัตตานีให้เชื้อที่มีลักษณะเป็น *Rhizopus oligosporus* ที่มีการเจริญเติบโตเร็ว เชื้อฟู อัดแน่นเต็มจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA ในเวลา 2 วัน และบนอาหาร Coconut พบว่าที่วุ้นอาหารใต้โคโลนีเชื้อไม่มีสีเหลืองส้ม และไม่มีการเรืองแสง UV ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ซึ่งแสดงว่าไม่ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน

ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Chantharasophon *et al.,* (2015) ที่รายงานว่าเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* เป็นเชื้อที่ไม่ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน โดยเชื้อที่คัดแยกได้ครั้งนี้มาจากกล้าเชื้อของเตมเปปัตตานี ซึ่งเป็นกล้าเชื้อผงของประเทศอินโดนีเซียแต่เป็นกล้าเชื้อแบบเชื้อผสม การศึกษาครั้งนี้จึงได้คัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญได้เร็วและสร้างเส้นใยโปร่งฟูและอัดแน่นในจานเพาะเชื้อ ซึ่งคาดว่าจะเป็นกล้าเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพโดยเฉพาะมีการย่อยโปรตีนได้ดี ซึ่งจะช่วยหมักวัสดุเศษเหลือจากปลาให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้เร็วขึ้น

3.3 ผลการผลิตปลาส้มโดยใช้กล้าเชื้อที่คัดเลือกได้

ผลิตปลาส้ม โดยมีส่วนผสมของหัวและโครงปลาสับ 1,000 กรัม กระเทียม 100 กรัม เกลือ 100 กรัม ข้าวเหนียวนึ่งสุก 150 กรัม และเติมกล้าเชื้อต่างกันโดย สูตร 1 ไม่เติมกล้าเชื้อ สูตร 2 เติมกล้าเชื้อแบบผสมของแบคทีเรียกรดแลกติก L1, L2 และ P1 และสูตร 3 เติมกล้าเชื้อ *Rhizopus oligosporus* พบว่าสีและกลิ่นของปลาส้มสูตรที่ 1, 2 และ 3 มีสีปกติ มีกลิ่นหอมของปลาหมักแบบกลิ่นปลาส้ม ไม่มีกลิ่นเน่าเสีย ลักษณะปรากฏที่ผิวหน้าของปลาส้มในภาชนะหมักเป็นปกติ ไม่มีฟอง ไม่มีเส้นใยเชื้อรา ผลที่ได้นี้คล้ายกับการศึกษาของ Giri *et al.* (2012) และ Wu *et al.* (2017) ที่ใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* และใช้แบคทีเรียกรดแลกติกเป็นกล้าเชื้อหมักวัสดุเศษเหลือจากปลาได้ ซึ่งบ่งชี้ว่าทั้งกล้าเชื้อราและกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้สามารถใช้หมักวัสดุเศษเหลือจากปลาแบบปลาส้มได้โดยไม่ทำให้ปลาเน่าเสีย

3.3 ผลการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ กายภาพ และทางเคมีของปลาส้ม

3.3.1 หลังจากหมักปลาส้ม 3 สูตรเป็นเวลา 60 วัน ตรวจไม่พบเชื้อทั้งจากการตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียกรดแลกติก และแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella* spp., *Bacillus cereus, Clostridium perfringens, Coliforms, Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*

การที่ตรวจไม่พบแบคทีเรียก่อโรคในผลิตภัณฑ์ครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Thongruck *et al.* (2017) และ Hongsachart (2016) แต่ผลการตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียกรดแลกติกที่ไม่พบในปลาส้มที่หมักจากวัสดุเศษเหลือของปลาเป็นเวลา 60 วันครั้งนี้ต่างจากการหมักกะปิเป็นเวลา 2-6 เดือนในรายงานของ Kleekayai *et al.* (2014) ที่ยังคงพบจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียกรดแลกติก จึงคาดว่าผลที่ได้น่าจะเป็นผลลบปลอม (Negative false) เนื่องจากการหมักวัสดุเศษเหลือของปลาแบบปลาส้มครั้งนี้ไม่ได้ผลิตแบบปลอดเชื้อ แต่ในการหมักอาจมีสารบางอย่างที่มีฤทธิ์ไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ไว้ทำให้ตรวจไม่พบ ดังเช่นในรายงานของ Armin and Marzieh (2018) ที่พบว่าสารสกัดโปรตีนจากวัสดุเศษเหลือจากปลานั้นเป็นเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

3.3.2 ผลการตรวจโครงสร้างแข็งที่เหลืออยู่ของปลาส้ม พบว่าปลาส้มสูตรที่ 1, 2 และ 3 มีโครงสร้างแข็งที่เหลืออยู่ร้อยละ 8.33±0.01, 6.67±2.89 และ 0.0 ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่า ปลาส้มสูตร 3 ที่ใช้กล้าเชื้อ *Rhizopus oligosporus* ในการผลิตไม่มีโครงสร้างแข็งเหลืออยู่หลังจากการต้มอัดไอ 30 นาที ขณะที่สูตร 2 ที่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกแบบผสมของ L1, L2 และ P1 ยังคงพบโครงสร้างแข็งเหลืออยู่เช่นเดียวกับสูตร 1 ที่ไม่ได้ใช้กล้าเชื้อ แสดงว่าปลาส้มสูตร 3 มีกิจกรรมการย่อยสลายสูงที่สุด ดังเช่นผลการศึกษาของ Fukuda *et al.* (2014) ที่หมักน้ำปลาด้วยโคจิเชื้อรา และพบว่าน้ำปลาหมักมีการย่อยสลายได้สูงกว่าทำให้ได้น้ำปลาเร็วกว่าและมีกลิ่นรสเฉพาะตัวที่แตกต่างจากการหมักที่ไม่ใช้กล้าเชื้อ นอกจากนี้ยังคาดว่าการย่อยสลายกระดูกปลาที่เกิดขึ้นจะทำให้แคลเซียมเปลี่ยนฟอร์มไปอยู่ในรูปที่ร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้ได้ง่ายขึ้น (Jodnak, 2013)

3.3.3 ผลการวิเคราะห์คุณภาพทางทางเคมีของปลาส้มหลังจากอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าค่า pH, ปริมาณความชื้น กรด โปรตีนละลาย โปรตีนทั้งหมด และค่า degree of protein hydrolysis ของปลาส้มสูตร 1 มีค่าเป็น 4.94±0.01 และร้อยละ 5.57±0.51, 1.72±0.12, 1.63±0.16, 16.28±0.73 และ 10.02±1.08 ตามลำดับ ปลาส้มสูตร 2 มีค่าเป็น 4.63±0.14 และร้อยละ 5.71±0.44, 1.71±0.03, 2.12±0.03, 17.03±0.18 และ 12.43±0.23 ตามลำดับ และปลาส้มสูตร 3 มีค่าเป็น 5.30±0.01 และร้อยละ 5.94±1.19, 1.83±0.08, 8.90±0.01, 17.35±0.23 และ 51.31±0.70 ตามลำดับ (Table 3)

Table 3 pH value, moisture, acidity, soluble protein, total protein, and degree of protein hydrolysis of Plaa-som (Formula 1: control; Formula 2: L1+L2+P1 inoculum; and Formula 3: *Rhizopus oligosporus* inoculum) which were fermented for 60 days and dried at 60°C for 48 h

Parameters	Formula 1	Formula 2	Formula 3
pH	4.94±0.01[a]	4.63±0.14[b]	5.30±0.01[c]
Moisture content (%)	5.57±0.51[a]	5.71±0.44[a]	5.94±1.19[a]
Acidity (%)	1.72±0.12[a]	1.71±0.03[a]	1.83±0.08[a]
Soluble protein (%)	1.63±0.16[a]	2.12±0.03[b]	8.90±0.01[c]
Total protein (%)	16.28±0.73[a]	17.03±0.18[ab]	17.35±0.23[b]
Degree of protein hydrolysis (%)	10.02±1.08[a]	12.43±0.23[b]	51.31±0.70[c]

[abc] Mean in the same row with a different superscript letter are significantly different ($p<0.05$)

ผลของค่า pH บ่งชี้ว่าการใช้แบคทีเรียกรดแลกติกเป็นกล้าเชื้อผลิตปลาส้มนั้นจะทำให้มีค่า pH ต่ำลง ซึ่งเป็นสิ่งที่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสเปรี้ยวเร็วมากขึ้น แต่จะสังเกตได้ว่าการใช้เชื้อ *Rhizopus oligosporus* VA1 เป็นกล้าเชื้อทำให้ค่า pH ต่ำลงน้อยกว่าทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ใช้แบคทีเรียกรดแลกติก แต่ปริมาณกรดที่ได้กลับสูงกว่าแบบไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กันซึ่งทำให้มีกลิ่นและรสเปรี้ยวน้อยกว่า สิ่งที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ชัดเจนคือปริมาณโปรตีนละลายและค่า degree of protein hydrolysis ที่พบว่าปลาส้มสูตร 3 มีค่าสูงกว่าปลาส้มสูตร 2 และสูตร 1 ตามลำดับ ซึ่งคาดว่ากล้าเชื้อ *Rhizopus oligosporus* VA1 ในปลาส้มสูตร 3 สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมการย่อยสลายในกระบวนการหมักวัสดุเศษเหลือจากปลาสูงกว่าการใช้แบคทีเรียกรดแลกติกและแบบไม่ใช้กล้าเชื้อในปลาส้มสูตร 2 และสูตร 1 ตามลำดับ ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับ Chantharasophon *et al.,* (2015) ที่รายงานว่าเชื้อ *Rhizopus oligosporus* สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส กลูโคอะไมเลส โปรตีเอส และไลเปสได้สูง นอกจากประสิทธิภาพของเอนไซม์จากกล้าเชื้อแล้วคาดว่ายังส่งผลถึงปริมาณสารอาหารและสารออกฤทธิ์ทางเภสัชที่ได้ในผลิตภัณฑ์ด้วย ซึ่งจากการรายงานของ Promchote (2017) พบว่า ถ้าระดับการย่อยของโปรตีนสูงขึ้นแสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH เพิ่มสูงขึ้นด้วย จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

เชื้อ *Rhizopus oligosporus* VA1 เป็นกล้าเชื้อที่มีศักยภาพสำหรับผลิตปลาส้มจากปลาเหลือทิ้งมากกว่าการใช้แบคทีเรียกรดแลกติกแบบเชื้อผสมของไอโซเลต L1, L2 และ P1 และแบบไม่ใช้กล้าเชื้อโดยปลาส้มที่ได้มีค่า pH เป็น 5.30±0.01 ร้อยละของปริมาณความชื้น กรด โปรตีนละลาย โปรตีนทั้งหมด และ degree of protein hydrolysis เป็น 5.94±1.19, 1.83±0.08, 8.90±0.01, 17.35±0.23 และ 51.31±0.70 ตามลำดับ และควรศึกษาถึงปริมาณสารออกฤทธิ์ทางเภสัชที่ได้จากผลิตภัณฑ์ด้วยจะได้ส่งเสริมให้มีการนำไปใช้พัฒนาเป็นอาหารทางเลือกเพื่อสุขภาพ

เอกสารอ้างอิง

Chantharasophon, K., Prawitthana, S., and Chantarasopon, S. 2017. The use of *Bacillus amyloliquefaciens* KJ720206 and soy milk kefir as probiotics in Nile tilapia. Journal of Fisheries Technology Research. 11(1): 46-54. [in Thai]

Chantharasophon, K., Warong, T., Mapatsa, P., and Leelavatcharamas, V. 2011. High potential probiotic *Bacillus* species from gastrointestinal tract of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Biotechnology. 4(6): 498-505.

Chantharasophon, K., Wongklom, A., and Chantarasopon, S. 2015. Product development of health food from germinated brown rice by high GABA producing of aromatic yeast from ripe palmyra palm pulp and *Rhizopus oligosporus*. Complete Research Report, Ubon Ratchathani Rajabhat University. 129 p. [in Thai]

Chompuming, U., Chatsungnoen, T., and Chaithawatwithi, T. 2009. The quality improvement of Plaa som products by biotechnological processes: A case study of Phrae and Pha Yao province. Complete Research Report, Maejo University Phrae Campus. 112 p. [in Thai]

Fukuda, T., Furushita, M., Shiba, T., and Harada, K. 2014. Fish fermented technology by filamentous fungi. Journal of National Fisheries University. 62(4): 163-168.

Ghorai, T., Dora, K.C., Sarkar, S., Chowdhury, S., and Bordoloi, R. 2016. Efficacy of biofermenter on shrimp head waste using *Lactobacillus brevis* (MTCC1750). Asian Journal Animal Science. 11(1): 19-23.

Giri, A., Nasu, M., and Ohshima, T. 2012. Bioactive properties of Japanese fermented fish paste, fish miso, using Koji inoculated with *Aspergillus oryzae*. International Journal of Nutrition and Food Sciences. 1(1): 13-22.

Hongsachart, P. 2016. Isolation and determination of antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermented fish product, Pla-som. KKU Science Journal. 44(2): 318-330.

Jodnak, S. 2013. Biological activity of Tilapia bone protein hydrolysate and its effect on osteoblasts. Master Nutraceuticals and Functional Foods, Prince of Songkla University. 76 p. [in Thai]

Kleekayai, T., Saetae, D., Wattanachaiyingyong, O., Tachibana, S., Yasuda, M., and Suntornsuk, W. 2014. Characterization and in vitro biological activities of Thai traditional fermented shrimp pastes. Journal of food science and technology. 52(3): 1839-1848.

Kongkiattikajorn, J. 2015. Potential of starter culture to reduce biogenic amines accumulation in som-fug, a Thai traditional fermented fish sausage. Journal of Ethnic Foods. 2: 186-194.

Kutako, M., Tocharoen, T., Sonthi, M., Hiransuchalert, R., and Watanachote, J. 2015. Yield and protein pattern of collagen extracted from Greenback mullet (*Liza subviridis*) scale by different pepsin concentrations. Khon Kaen Agriculture Journal. 43(SUPPL.1): 562-567. [in Thai]

Noviana, A., Dieny, F.F., Rustanti N., Anjani, G., and Afifah, D.N. 2018. Antimicrobial activity of tempeh gembus hydrolyzate. [Online] Available from: http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/116/1/012044 [2018, July 11]

Phuc, L.H. 2016. Evaluation of the quantities, value and proposal of utilization of fish by-product from fish processing industry in Vietnam. Journal of Fisheries science and Technology. 3: 28-37.

Prachasitthisak, Y., Eamsiri, J., Sajjabut, S., Rojekittikhun, W., and Pubumpen, S. 2009. Hygienic quality improvement of fermented fish (Pla-som). The 11st Nuclear Science and Technology Conference. [Online] Available from http://www.nst.or.th/nstconf/nst/nst11/BA/BA10_%20Yuthapong_%20Prachasitthisak.pdf. [2017, June 12] [in Thai]

Prasetyo, T., Ardhianto, F., Pawitra, M., and Sumardiono, S. 2018. Improvement the chemical properties of cassava through microbial fermentation using *Rhizopus oligosporus*. [Online] Available from: https://www.matecconferences.org/articles/.../abs/.../matecconf_rsce2018_01025.html [2018, July 15]

Promchote, P.T. 2017. Chemical compositions and antioxidant properties of Pla-ra, Thai indigenous fermented fish product. Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University. 19(2): 159-172. [in Thai]

Raikate, P., Rugchat, O., Singanusong, R., and Noitup, P. 2011. Protein hydrolysate from fish waste: Conditions for red tilapia (*Oreochromis niloticus*) viscera hydrolysis with papain. NU Science Journal. 8(1): 101-108.

Rubina, N., Muhammad, N., Muhammad, I., and Quratulain, S. 2018. Nutritional enhancement of barley in solid state fermentation by *Rhizopus oligosporus* ML-10. [Online] Available from: https://juniperpublishers.com/nfsij/pdf/NFSIJ.MS.ID.555700.pdf [2018, July 11]

Srisakultiew, P., Kawborisut, S., and Srisathaporn, A. 2014. Preliminary data of low cost fish feed from tilapia culture industries. Khon Kaen Agriculture Journal. 42(1): 773-777. [in Thai]

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

Vos, P.D., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K., and Whitman, W.B., editors. 2009. Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume three, The Firmicutes. Dordrecht; New York: Springer.

Wu, R., Chen, L., Liu, D., Huang, J., Zhang, H., Xiao, X., Lei, M., Chen, Y., and He, H. 2017. Preparation of antioxidant peptides from salmon by-products with bacterial extracellular proteases. Marine drugs. 15(4): 1-19.

Zhang, F., Wang, A., Li, Z., He, S., and Shao, L. 2011. Preparation and characterization of collagen from freshwater fish scales. Food and Nutrition Sciences. 2: 818-823.