การเตรียมกล้าเชื้อผงสำหรับการผลิตผักกาดดอง

Preparation of Powder Inoculum for Pak-Gard-Dong Production

กัณฐวุฒิ บุญมี[1] กฤตพร รำจวนเกียรติ[2]

บทคัดย่อ

การเตรียมกล้าเชื้อผง *Lactobacillus plantarum* TISTR 1334 ผสมกับตัววัสดุยึดเกาะ 2 ชนิด คือ แป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวเหนียว อบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าการใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นวัสดุเกาะยึดจะให้จำนวนเชื้อรอดชีวิตมากกว่าโดยมีจำนวนเชื้อรอดชีวิตและความชื้นเท่ากับ 4.8×10^5 CFU/g และร้อยละ 9.35 ตามลำดับ เมื่อนำกล้าเชื้อผงที่ผลิตได้มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน พบว่ากล้าผงที่ผลิตได้มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและความชื้นเท่ากับ 5.7×10^4 CFU/g และร้อยละ 10.10 ตามลำดับ การหมักผักกาดดองโดยใช้กล้าเชื้อผง *L. plantarum* TISTR 1334 ร้อยละ 1, 3, 5 และ 7 เปรียบเทียบกับการดองแบบดั้งเดิม (ตัวอย่างควบคุม) พบว่าการใช้กล้าเชื้อผงใช้เวลาในการหมัก 5 วัน ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมใช้เวลาในการหมัก 7 วัน เมื่อนำมาทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสกับผู้บริโภค 30 คน ด้วยวิธีการให้ คะแนนความชอบ (Hedonic Scale Test) พบว่าผักกาดดองสูตรที่ใช้กล้าเชื้อผง *L. plantarum* TISTR 1334 ร้อยละ 5 ผู้บริโภคให้คะแนนความชอบด้าน สี กลิ่นรส รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมมากที่สุด

คำสำคัญ: กล้าเชื้อผง, ผักกาดดอง, การหมัก, *แลคโตบาซิลลัส แพลนทารัม*

[1] อาจารย์ประจำ คณะเทคโนโลยีชีวภาพ/หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต/มหาวิทยาลัยรังสิต kanthawut.b@rsu.ac.th

[2] อาจารย์ประจำ คณะเทคโนโลยีชีวภาพ/หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต/มหาวิทยาลัยรังสิต kittaporn.r@rsu.ac.th

Abstract

Powder inoculum preparation of *Lactobacillus plantarum* TISTR 1334 was mixed with two supporting materials were rice flour and sticky rice flour. Drying of rice flour at 50 °C for 6 hours showed viability of the culture. The viability of the culture as 4.8×10^5 CFU/g and moisture content was 9.35%. When powder inoculum were grown at room temperature for 30 days, the viability of the culture and moisture content were 5.7×10^4 CFU/g and 10.10%, respectively. Fermentation of Pak-Gard-Dong by using *L. plantarum* TISTR 1334 at 1, 3, 5 and 7 % w/v was compared with the traditional process (control). The result showed fermentation time of Pak-Gard-Dong took 5 days, while the control took 7 days. Used Hedonic Scales Test by 30 consumers showed that using pure culture 5% of *L. plantarum* TISTR 1334 was the highest score of color, taste, flavor, texture and overall.

Keywords: Powder Inoculum, Pak-Gard-Dong, Fermentation, *Lactobacillus plantarum*

ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

การดองผักเป็นวิธีการถนอมอาหารที่ใช้กันมานาน เพื่อชะลอการเน่าเสียของผักและเป็นการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้หลายเดือนโดยไม่ต้องอาศัยห้องเย็น ลงทุนน้อย ใช้เครื่องจักรน้อยและไม่ต้องอาศัยเทคโนโลยีชั้นสูงในการผลิต (สุมณฑา วัฒนสินธ์, 2549) กระบวนการดองเริ่มมีขึ้นจากความต้องการยืดอายุการเก็บอาหารเพื่อใช้ในระหว่างที่ไม่ใช่ฤดูกาลของผลิตผลนั้นๆ นอกจากเหตุผลในการยืดอายุแล้วการดองยังทำให้เกิดลักษณะเฉพาะในด้านกลิ่นรสที่เป็นที่ชื่นชอบของผู้บริโภคอีกด้วย (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกลู, 2536) สำหรับประเทศไทยผลิตภัณฑ์ผักดองที่นิยมบริโภคได้แก่ผักกาดดองเนื่องจากผักกาดเขียวเป็นพืชที่รู้จักกันแพร่หลาย เพราะปลูกง่ายและเก็บผลผลิตได้เร็ว จึงทำให้ผักกาดเป็นผักที่นิยมนำมาดองมากที่สุด การผลิตผักกาดดองเป็นการดองเกลือที่มีความเข้มข้นต่ำ (Processed Pickles) โดยที่ผักที่ดองได้ยังคงมีความกรอบและมีกลิ่นรสเฉพาะตัว ความเข้มข้นของน้ำเกลือที่ใช้จะน้อยกว่าร้อยละ 12 ส่วนมากจะใช้ที่ประมาณร้อยละ 4 - 8 โดยเป็นความเข้มข้นในระดับที่สูงพอที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยระดับความเข้มข้นของน้ำเกลือที่เหมาะสมที่สุดในการดองจะขึ้นอยู่กับชนิดของผักและผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเป็นหลัก (ฟองจันทร์ ชะลอกลาง, 2543) การดองด้วยวิธีนี้จะมีเชื้อจุลินทรีย์พวกที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลที่อยู่ในผักหรือเติมลงไปให้เป็นกรดแลคติก วิธีการดองแบบนี้ยังสามารถใช้ได้กับผักอีกหลายชนิด ในการดองด้วยวิธีนี้ควรรักษาอุณหภูมิของน้ำเกลือให้อยู่ที่ 21 องศาเซลเซียส และให้ผักจมอยู่ในน้ำเกลือตลอดระยะเวลาที่ดอง หากมีเชื้อราที่ผิวหน้าควรกำจัดออกทันที เนื่องจากเชื้อราจะย่อยสลายกรดและสร้างสภาวะที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียเจริญต่อไปได้ในกระบวนการดองมีการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลในผักให้เป็นกรดแลคติกโดยแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ Lactobacteriaceae มีอยู่ 5 สกุล คือ *Streptococcus sp., Pediococcus sp., Diplococcus sp., Leuconostoc sp.* และ *Lactobacillus sp.* แบคทีเรียเหล่านี้เป็นแกรมบวก สร้างสปอร์ไม่ได้ ต้องการวิตามินบีรวมและกรดอะมิโนในการเจริญ ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีปริมาณกรดอะซิติกเข้มข้นเกินกว่าร้อยละ 3 - 6 สามารถแบ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้ออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่ม Homofermentative และกลุ่ม Heterofermentative อาหารหมักดองจะมีกรดเป็นตัวควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าอาหารหมักดองจะเกิดปฏิกิริยาจากการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ทำให้ได้ลักษณะ เนื้อสัมผัส ลักษณะปรากฏ และกลิ่นรสของอาหารเปลี่ยนแปลงไปในทางที่

ผู้บริโภคยอมรับ โดยปัจจัยที่สำคัญในการหมักดอง คือ ความเป็นกรดด่าง, ปริมาณออกซิเจน, อุณหภูมิ, ปริมาณเกลือ และชนิดและปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักดอง (นันทนาถ กิติศรีวรพันธุ์, 2543) การหมักผักกาดดองโดยอาศัยแบคทีเรียที่ติดมากับวัตถุดิบเป็นเชื้อจุลินทรีย์ในบางครั้งก็ไม่ประสบความสำเร็จเพราะกระบวนการผลิตและคุณภาพผลิตภัณฑ์ไม่สม่ำเสมอ เช่น ความเปรี้ยวของผักดองที่ได้ในแต่ละครั้งไม่คงที่ หรือระยะเวลาในการหมักเร็วช้าต่างกัน เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากความผันแปรของชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ที่ติดมากับวัตถุดิบ (วรารักษ์ หงส์พร้อมญาติ, 2540)

ในปัจจุบันมีการใช้กล้าเชื้อ (Starter Culture) ที่ได้จากการเตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการโดยมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในปริมาณมากอาจประกอบด้วยจุลินทรีย์เพียง 1 ชนิด หรือมากกว่า 1 ชนิดก็ได้ โดยกล้าเชื้อทำให้การหมักมีประสิทธิภาพดีตามที่ต้องการ (Wood, 1997) และการใช้กล้าเชื้อยังมีคุณสมบัติเป็นวัตถุกันเสียชีวภาพ (Bio preservative) สามารถป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ การผลิตและการใช้กล้าเชื้ออาจอยู่ในรูปผง ของเหลว ก้อน หรือ อัดเม็ด แต่ส่วนมากนิยมทำเป็นกล้าเชื้อผง (Powder Inoculum) เพื่อสะดวกในการขนส่งและง่ายต่อการใช้งาน ในการหมักอาหารหลายชนิดในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ (Large-Scale Production) มีการใช้กล้าเชื้อเพื่อควบคุมกระบวนการผลิต และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ (Caplice and Fitzgerald, 1999) การใช้กล้าเชื้อมีจุดประสงค์หลักเพื่อลดเวลาการหมักในกระบวนการผลิต เพิ่มกลิ่นรสที่ผู้บริโภคต้องการ (Wood and Holzapfel, 1995) และยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ (De Vuyst, 2000) จากการศึกษาพบว่าการหมักแบบพื้นบ้าน (Traditional Fermented) อาศัยจุลินทรีย์จากธรรมชาติ (Natural; Wild-type) ระยะเวลาในการหมักและคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่คงที่ ทำให้มีการผลิตกล้าเชื้อเพื่อการค้า (Commercial Starter) เพื่อสนองตอบความต้องการใช้กล้าเชื้อในกระบวนการผลิตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม (Klijn *et al.* (1995) ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงได้ทดลองผลิตกล้าเชื้อผงเพื่อใช้ในการผลิตผักกาดดอง โดยศึกษาการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีบทบาทสำคัญในการหมักผักกาดดอง คือ *Lactobacillus plantarum* TISTR 1334 และคัดเลือกชนิดของวัสดุเกาะยึด 2 ชนิด คือ แป้งข้าวเจ้า และแป้งข้าวเหนียว ที่เหมาะสมในการผลิตกล้าเชื้อผงสำหรับหมักผักกาดดอง และศึกษาการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน เพื่อจะได้ทราบแนวทาง วิธีการผลิตกล้าเชื้อผงในเบื้องต้น และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ผลิตเพื่อการค้าต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

(1) เพื่อศึกษาผลการใช้วัสดุเกาะยึด 2 ชนิด คือ แป้งข้าวเหนียว และแป้งข้าวเจ้า ในการผลิตกล้าเชื้อผงสำหรับการผลิตผักกาดดองด้วยวิธีการอบแห้ง และเพื่อศึกษาปริมาณกล้าเชื้อผงที่เหมาะสมต่อการหมักผักกาดดอง

วิธีดำเนินการวิจัย

(1) วัตถุดิบและเครื่องมือที่ใช้ในการเก็บรวบรวมข้อมูล

(1.1) วัตถุดิบ

วัสดุเกาะยึด 2 ชนิด คือ แป้งข้าวเหนียว และแป้งข้าวเจ้า วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตผักกาดดอง คือ ผักกาดเขียว น้ำตาลปี๊บ เกลือป่น เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ในการศึกษามี 1 ชนิด คือ *Lactobacillus plantarum* TISTR 1334 ได้มาจากศูนย์เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(1.2) การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR 1334 จะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS both โดยเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น ก่อนการใช้งานจะมีการถ่ายเชื้อลงสู่อาหารใหม่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงนำหัวเชื้อบริสุทธิ์ไปใช้ในการหมัก เชื้อที่ใช้สำหรับเป็น Stock culture จะมีการถ่ายเชื้อสู่อาหารเหลว MRS ทุก 1 เดือน

(1.3) เครื่องมือที่ใช้ในการเก็บรวบรวมข้อมูล

การศึกษาวิจัยนี้ เป็นงานวิจัยในระดับห้องปฏิบัติการผู้วิจัยจึงใช้เครื่องมือในการเก็บรวบรวมข้อมูลแบบการสังเกต (Observation) โดยตรงจากการทดลอง โดยใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ในการทดลอง เพื่อทำการดองผักกาดดอง ติดตามกระบวนการหมักดังนี้ อุปกรณ์ที่ใช้ในการหมักคือโถแก้ว อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์ทางเคมี คือ เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH Meter) ชุดเครื่องแก้วสำหรับวัดปริมาณกรดด้วยวิธีการไตเตรท เครื่องชั่งละเอียด เครื่องเขย่าหลอด เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) และอุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ คือ ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) และหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) และตู้อบลมร้อน

(2) การศึกษาผลการใช้วัสดุเกาะยึด 2 ชนิด คือ แป้งข้าวเหนียวและแป้งข้าวเจ้า ในการผลิตกล้าเชื้อผงด้วยวิธีการอบแห้งสำหรับการหมักผักกาดดอง

นำจุลินทรีย์ *L. plantarum* TISTR 1334 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเชื้อแบคทีเรียอยู่ในช่วงการเจริญเติบโตคงที่ (Stationary phase) เป็นช่วงอายุที่เหมาะสมในการผลิตเป็นกล้าเชื้อผงเพราะทนต่ออุณหภูมิสูงที่ใช้ในการอบแห้งได้ดีที่สุด (Fu and Etzel, 1995) จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาหมุนเหวี่ยง (Refrigerated Centrifuge) เพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Mauriello *et al.*, 1999) เทของเหลวส่วนใสด้านบน (Supernatant) ออกและนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เพื่อให้ได้เซลล์แขวนลอย (Cell suspension) หลังจากนั้นเทผสมลงในขวดแก้วที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อโดยภายในขวดแก้วบรรจุแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวเหนียวในอัตราส่วนของเซลล์แขวนลอยร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักแป้ง (%v/w) คลุกเคล้าให้ทั่วและเทใส่ถาดที่ปลอดเชื้อปิดด้วยอลูมิเนียมชนิดปิดอาหารและนำไปอบในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างกล้าเชื้อผงโดยเทคนิคปลอดเชื้อมาตรวจนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตทุก 2 ชั่วโมง โดยใช้อาหาร MRS agar และหาความชื้นตามวิธีของ AOAC (2000) โดยวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกล้าเชื้อผงทำการบรรจุในขวดแก้ว และเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน และสุ่มตัวอย่างกล้าเชื้อผงมาตรวจนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและปริมาณความชื้นเพื่อดูแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บรักษากล้าเชื้อผงที่อุณหภูมิห้อง นำกล้าเชื้อผง *L. plantarum* TISTR 1334 ไปศึกษาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมต่อการหมักผักกาดดองต่อไป

(3) การศึกษาปริมาณกล้าเชื้อผง *L. plantarum* TISTR 1334 ที่เหมาะสมในการหมักผักกาดดอง

การศึกษาการใช้กล้าเชื้อผง *L. plantarum* TISTR 1334 เปรียบเทียบกับการดองโดยไม่ใช้กล้าเชื้อผง (ตัวอย่างควบคุม) โดยมีวิธีการหมักผักกาดดองดัดแปลงจาก มิ่งขวัญ มิ่งเมือง (2517) และ สิติมา จิตตินันทน์ (2540) เริ่มจากนำผักกาดเขียวมาตัดแต่งให้เหลือแต่ใจผัก นำไปล้างน้ำให้สะอาด และนำไปดอง โดยใช้อัตราส่วน ผักกาด 1

กิโลกรัม : เกลือ 50 กรัม : น้ำตาลปี๊บ 60 กรัม และน้ำ 2 ลิตร โดยวิธีการหมัก 2 ขั้นตอน ดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 นำผักกาดมาคลุกกับน้ำเกลือ (เกลือ 50 กรัม ที่ละลายในน้ำ 1 ลิตร) และนำไปใส่ในโหลแก้ว ปิดฝาและทิ้งไว้ 1 คืน หลังจากนั้นเทน้ำเกลือทิ้ง ขั้นตอนที่ 2 เติมน้ำตาลปี๊บ 60 กรัม ที่ละลายในน้ำ 1 ลิตร จากนั้นเติมกล้าเชื้อผง *L. plantarum* TISTR 1334 ปริมาณต่างๆ แสดงดังตารางที่ 1 หลังจากนั้นปิดโหลแก้วให้สนิทและทำการหมักที่อุณหภูมิห้องแสดงดังภาพที่ 1 ทำการหมักและสุ่มตัวอย่างน้ำผักดองมาวัดปริมาณกรดด้วยวิธีการไตเตรท และความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยเครื่อง pH meter ทุกวัน จนมีปริมาณกรดร้อยละ 0.701 - 0.75 และ/หรือค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 3.7 - 3.9 จึงสิ้นสุดการหมัก (ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2554) โดยวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 จะได้ระยะเวลาและปริมาณกล้าเชื้อผง *L. plantarum* TISTR 1334 ที่เหมาะสมในการหมัก

ภาพที่ 1 การหมักผักกาดดองในระดับห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 1 การจัดสิ่งทดลองเพื่อศึกษาปริมาณกล้าเชื้อผง *L. plantarum* TISTR 1334 ที่เหมาะสมในการหมักผักกาดดอง

สูตรที่	**ปริมาณกล้าเชื้อผง *L. plantarum* TISTR 1334 (ร้อยละ) (%w/v)**
1 (ตัวอย่างควบคุม)	0
2	1
3	3
4	5
5	7

นำผักกาดดองที่ได้จากตารางที่ 1 มาทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบ (Hedonic Scale Test) ด้านสี กลิ่นรส รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม (1 = ชอบน้อยที่สุด และ 9 = ชอบมากที่สุด) กับผู้ทดสอบจำนวน 30 คน โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (RCBD : Randomized Complete Block Design) วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี

Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และนำข้อมูลที่วิเคราะห์ได้มาสรุปและเลือกชนิดและปริมาณของกล้าเชื้อผงที่เหมาะสมในการหมักผักกาดดอง

สรุปผลการวิจัย

(1) ผลการศึกษาการใช้วัสดุเกาะยึด 2 ชนิด คือ แป้งข้าวเหนียวและแป้งข้าวเจ้าในการผลิตกล้าเชื้อผงด้วยวิธีการอบแห้งสำหรับการหมักผักกาดดอง

จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 1334 ในอาหาร MRS broth และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียให้อยู่ในช่วงการเจริญเติบโตคงที่คือ 18 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 7.2×10^{10} CFU/ml เมื่อนำมาผสมร่วมกับวัสดุเกาะยึด 2 ชนิด คือ แป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวเหนียว นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และสุ่มตัวอย่างกล้าเชื้อผงมานับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและปริมาณความชื้นทุก 2 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2 และตารางที่ 3

ตารางที่ 2 จำนวนเซลล์รอดชีวิตของกล้าเชื้อผง *L. plantarum* TISTR 1334 ในระหว่างการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อใช้แป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวเหนียวเป็นวัสดุเกาะยึด

วัสดุเกาะยึด	***L. plantarum* TISTR 1334 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (CFU/g)**			
	0 ช.ม.	**2 ช.ม.**	**4 ช.ม.**	**6 ช.ม.**
แป้งข้าวเหนียว	3.5×10^{9}	4.4×10^{7}	4.2×10^{6}	3.3×10^{4}
แป้งข้าวเจ้า	6.7×10^{9}	1.0×10^{8}	4.9×10^{7}	4.8×10^{5}

ตารางที่ 3 ปริมาณความชื้นของกล้าเชื้อผง *L. plantarum* TISTR 1334 ในระหว่างการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อใช้แป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวเหนียวเป็นวัสดุเกาะยึด

วัสดุเกาะยึด	***L. plantarum* TISTR 1334 ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)**			
	0 ช.ม.	**2 ช.ม.**	**4 ช.ม.**	**6 ช.ม.**
แป้งข้าวเหนียว	20.00^{a}	16.25^{b}	13.35^{b}	10.19^{c}
แป้งข้าวเจ้า	19.25^{a}	14.40^{b}	12.60^{b}	9.35^{c}

หมายเหตุ : 1) $^{a-c}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีตัวอักษรต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากตารางที่ 2 พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตจะลดลงตามระยะเวลาการอบแห้ง และการใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นวัสดุเกาะยึดจะมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการอบแห้ง 6 ชั่วโมง มากที่สุด เท่ากับ 4.8×10^{5} CFU/g จึงสรุปได้ว่าแป้งข้าวเจ้ามีความเหมาะสมในการใช้เป็นวัสดุเกาะยึดได้ดีกว่าแป้งข้าวเหนียว ทั้งนี้เป็นผลมาจากเม็ดแป้งข้าวเจ้ามีขนาดเล็กกว่าเม็ดแป้งข้าวเหนียว ส่งผลให้ในระหว่างการให้ความร้อนแป้งข้าวเจ้าสามารถป้องกันเซลล์ของแบคทีเรียได้ดีกว่าเกิดเป็นเจลห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียได้ หรืออาจกล่าวได้ว่าแป้งข้าวเจ้ามีคุณสมบัติการปกป้องเซลล์

ของแบคทีเรียให้อยู่รอดจากอุณหภูมิสูงได้ดีกว่าแป้งข้าวเหนียว จากตารางที่ 3 พบว่าหลังการอบแห้ง 6 ชั่วโมง การใช้แป้งข้าวเหนียวเป็นวัสดุเกาะยึดมีปริมาณความชื้นร้อยละ 10.19 มากกว่าการใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นวัสดุเกาะยึดซึ่งมีปริมาณความชื้นร้อยละ 9.35 โดยการใช้วัสดุเกาะยึดทั้ง 2 ชนิด มีแนวโน้มว่าความชื้นจะลดลงเมื่อระยะเวลาในการอบนานขึ้น

ผลของการเก็บรักษากล้าเชื้อผง *L. plantarum* TISTR 1334 ที่ผลิตได้ในขวดปลอดเชื้อปิดสนิทที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน พบว่าจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของกล้าเชื้อผงสูตรที่ใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นวัสดุเกาะยึดจะมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตเท่ากับ 5.7×10^4 CFU/g ในขณะที่การใช้แป้งข้าวเหนียวเป็นวัสดุเกาะยึดจะให้จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตน้อยกว่า โดยมีค่าเท่ากับ 6.6×10^3 CFU/g โดยกล้าเชื้อผงที่ผลิตได้ทั้ง 2 สูตร จะมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น พบว่ากล้าเชื้อผงทั้ง 2 สูตร เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน ความชื้นจะมีค่าเพิ่มขึ้น โดยสูตรที่ใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นวัสดุเกาะยึดจะมีความชื้นเท่ากับร้อยละ 10.10 ในขณะที่สูตรที่ใช้แป้งข้าวเหนียวจะมีความชื้นสูงกว่าโดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 11.30 จากผลการทดลองที่ได้สามารถสรุปได้ว่าการใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นวัสดุเกาะยึดที่ดีกว่าแป้งข้าวเหนียวเพราะมีจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียที่รอดชีวิตมากกว่า ทำให้กล้าเชื้อผงที่ผลิตได้สามารถเก็บรักษาได้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 30 วัน

(2) ผลการศึกษาปริมาณกล้าเชื้อผง *L. plantarum* TISTR 1334 ที่เหมาะสมในการหมักผักกาดดอง

การหมักผักกาดดองโดยใช้กล้าเชื้อผง *L. plantarum* TISTR 1334 พบว่าเมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้นปริมาณกรดแลคติกแต่ละสูตรจะมีค่าเพิ่มขึ้น (แสดงในตารางที่ 4) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของผักกาดดองและลดลง (แสดงในตารางที่ 5) โดยผักกาดดองสูตรที่มีการใช้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมากจะให้ปริมาณกรดแลคติกสูงกว่าสูตรที่มีการใช้กล้าเชื้อในปริมาณน้อย

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติก (ร้อยละ) ในระหว่างการหมักผักกาดดอง

สูตรที่	ปริมาณกรดแลคติก (ร้อยละ)						
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
1 (ตัวอย่างควบคุม)	0.12^{e}	0.14^{e}	0.24^{d}	0.25^{d}	0.38^{c}	0.58^{b}	$\underline{0.72}^{a}$
2	0.12^{d}	0.18^{d}	0.56^{c}	0.63^{b}	$\underline{0.71}^{a}$	NA	NA
3	0.12^{d}	0.28^{c}	0.56^{b}	0.59^{b}	$\underline{0.72}^{a}$	NA	NA
4	0.19^{d}	0.31^{c}	0.58^{b}	0.59^{b}	$\underline{0.74}^{a}$	NA	NA
5	0.21^{d}	0.35^{c}	0.62^{b}	0.65^{b}	$\underline{0.75}^{a}$	NA	NA

หมายเหตุ : 1) $^{a-e}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีตัวอักษรต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

2) ตัวเลขที่ขีดเส้นใต้ หมายถึงวันแรกที่ปริมาณกรดเหมาะสมในการหมักผักกาดดอง

3) NA หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์เนื่องจากได้ปริมาณกรดแลคติกที่เหมาะสมถึงค่าที่ต้องการแล้ว มีค่าปริมาณกรดแลคติกร้อยละ 0.7 - 0.75 จึงสิ้นสุดการหมัก (ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2554)

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระหว่างการหมักผักกาดดอง

สูตรที่	ปริมาณกรด-ด่าง (pH)						
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
1 (ตัวอย่างควบคุม)	8.22[a]	7.43[b]	7.19[b]	4.93[c]	4.18[d]	3.98[d]	3.79[e]
2	7.01[a]	6.98[a]	5.90[b]	4.55[c]	3.77[d]	NA	NA
3	4.68[a]	4.26[b]	4.16[b]	4.13[b]	3.72[c]	NA	NA
6	4.62[a]	4.33[b]	4.25[b]	4.23[b]	3.75[c]	NA	NA
7	4.31[a]	4.26[a]	4.09[b]	3.98[b]	3.72[c]	NA	NA

หมายเหตุ : 1) [a-e] หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีตัวอักษรต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

2) ตัวเลขที่ขีดเส้นใต้ หมายถึงวันแรกที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เหมาะสมในการหมักผักกาดดอง

3) NA หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์เนื่องจากได้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมถึงค่าที่ต้องการแล้ว มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 3.7 - 3.9 จึงสิ้นสุดการหมัก (ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2554)

เมื่อพิจารณาการหมักผักกาดดองโดยใช้กล้าเชื้อผง *L. plantarum* TISTR 1334 เปรียบเทียบกับการดองโดยไม่ใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ (ตัวอย่างควบคุม) พบว่าการใช้กล้าเชื้อผง *L. plantarum* TISTR 1334 ในการหมักผักกาดดองใช้เวลาในการหมัก 5 วัน ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมใช้เวลาในการหมักนานกว่าคือ 7 วัน การใช้กล้าแบคทีเรียแลคติกหมักผักในรูปของกล้าเชื้อผงนั้นมีบทบาทคือจะสามารถควบคุมคุณภาพและเวลาในการผลิตได้ค่อนข้างคงที่ และให้ลักษณะที่ต้องการโดย *L. plantarum* TISTR 1334 เป็นแบคทีเรียพวก Homofermentative ไม่สร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส จะได้เฉพาะกลิ่นรสของผักดอง (นภา โล่ทอง, 2535) เมื่อนำผักกาดดองทั้ง 5 สูตร มาทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบ (Hedonic Scale Test) ได้ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 คะแนนเฉลี่ยของการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผักกาดดองด้วยวิธีการ Hedonic Scale Test

สูตรที่	คะแนนเฉลี่ย				
	สี	กลิ่นรส	รสชาติ	เนื้อสัมผัส	ความชอบโดยรวม
1(ตัวอย่างควบคุม)	5.32[b]	5.14[c]	5.20[c]	5.10[c]	5.22[c]
2	5.44[b]	6.53[b]	6.67[b]	5.21[c]	5.24[c]
3	5.36[b]	6.63[b]	6.70[b]	5.40[c]	5.33[c]
4	6.63[a]	7.27[a]	7.20[a]	6.65[a]	6.80[a]
5	6.43[a]	7.13[a]	7.13[a]	6.19[b]	6.22[b]

หมายเหตุ : 1) [a-c] หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่มีตัวอักษรต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การหมักผักกาดดองโดยใช้กล้าเชื้อผง *L. plantarum* TISTR 1334 เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม เมื่อนำมาทดสอบทางประสาทสัมผัสกับผู้บริโภคจำนวน 30 คน ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบ (Hedonic Scale Test) พบว่าผักกาดดองสูตรที่ 4 ใช้กล้าเชื้อผง *L. plantarum* TISTR 1334 ร้อยละ 5 ผู้บริโภคให้คะแนนความชอบด้านสี กลิ่นรส รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมมากที่สุด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยลักษณะของผักกาดดองมีสีเหลืองปานกลาง กลิ่นรสกำลังดี มีรสเปรี้ยวกำลังดี มีเนื้อสัมผัสที่กรอบ โดยมีค่าคะแนนความชอบโดยรวมเท่ากับ 6.80 มีค่าอยู่ระหว่าง 6 (ชอบเล็กน้อย) ถึง 7 (ชอบปานกลาง) จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการใช้กล้าเชื้อผง *L. plantarum* TISTR 1334 ร้อยละ 5 มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพผักกาดดองส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสและรสชาติที่ผู้บริโภคต้องการ (Wood and Holzapfel, 1995)

อภิปรายผล

การผลิตกล้าเชื้อผง *L. plantarum* TISTR 1334 โดยวิธีอบแห้งพบว่าแป้งข้าวเจ้าเป็นวัสดุเกาะยึดมีความเหมาะสมมากกว่าการใช้แป้งข้าวเหนียว โดยมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตเท่ากับ 4.8×10^5 CFU/g และเมื่อนำมาทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องนาน 30 วัน พบว่าจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงเหลือเท่ากับ 5.7×10^4 CFU/g เมื่อพิจารณาต้นทุนด้านวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกล้าเชื้อผง พบว่าต้นทุนการใช้แป้งข้าวเจ้ามีราคาถูกกว่าแป้งข้าวเหนียว และการใช้แป้งข้าวเจ้ายังช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบทางการเกษตร ให้เกษตรกรที่ปลูกข้าวเจ้าอีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะในการนำผลวิจัยไปใช้

(1) ใช้เป็นข้อมูลและแนวทางในนำมาพัฒนาต่อยอดเพื่อผลิตกล้าเชื้อผงทางการค้าในการผลิตผักกาดดองต่อไปในอนาคต และ สามารถนำผลวิจัยไปประยุกต์ใช้ในการเรียนการสอนได้

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

(1) ศึกษาชนิดและปริมาณวัสดุเกาะยึดชนิดต่างๆ เพิ่มเติมในอนาคต เช่น การใช้หางนมผง (Skim Milk) และ/หรือ มอลโตเดรกตริน (Maltodextrin) เป็นต้น

(2) ศึกษาการอบแห้งวิธีอื่น เช่น การเตรียมกล้าเชื้อผงโดยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัย หน่วยงานของรัฐบาล และหน่วยงานเอกชน ที่สนับสนุนวัตถุดิบในการวิจัย และขอขอบคุณผู้ที่ให้การช่วยเหลือ และให้ความร่วมมือในการวิจัยทุกท่าน

เอกสารอ้างอิง

นภา โล่ทอง. (2535). **กล้าเชื้ออาหารหมัก และเทคโนโลยีการหมัก**. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 159 หน้า.

นันทนาถ กิติศรีวรพันธุ์. (2543). **ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักและกลิ่นของผักกาดเขียวปลี (*Brassica juncae* L.) ดอง**. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 137 หน้า.

ฟองจันทร์ ชะลอกลาง. (2543). **ผลของความเข้มข้นเกลือและระยะเวลาในการหมักต่อคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของ ผักกาดเขียวปลีดองเค็ม**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. กรุงเทพฯ.

มิ่งขวัญ มิ่งเมือง. (2517). **การศึกษาจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในขณะหมักดองผักกาดเขียว (Brassica juncea, (L.) Czetn et Coss)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์. (2524). **อาหารหมักในอุตสาหกรรมหมักดอง**. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร, 70 – 155 หน้า

วรารักษ์ หงส์พร้อมญาติ. (2540). **การดองผักกาดเขียวปลีโดยวิธีควบคุมและใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์กลุ่มแลคติกแอซิด.** กรุงเทพฯ :มหาวิทยาลัยมหิดล, 2540. 112 หน้า.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. (2536). **ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โอเดรียน สโตร์,

สิติมา จิตตินันทน์. (2540). **การดองผักกาดเขียวปลีโดยวิธีควบคุม และใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์กลุ่มแลคติกแอซิค = Production of pickled green mustard by using pure culture lactic acid bacteria in controlled fermentation**. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล, 96 หน้า.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. (2549). **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 2.กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.. 264 หน้า.

AOAC. (2000). **Official Method of Analysis. 17 th ed**. The Association of official analytical Chemistry, Arlington, Virginia

Caplice, E. & Fitzgerald, G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. International **Journal of Food Microbiology**. 50: 131–149.

De Vuyst, L. (2000). Technology aspects related to the application of functional starter cultures. **Food Technology and Biotechnology**. 38: 105–112.

Fu, W. Y. & Etzel. M.R. (1995). Spray-drying of *Lactococcus lactis spp*. C_2 and cellular injury. **J. Food Sci**. 60: 195-200.

Klijn, N., Weerkamp, A. H. & De Vos, W.M. (1995). Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus spp*. in natural ecosystems. **Applied Environmental Microbiology**. 61: 788–792.

Mauriello, G., M. Aponte, R. Andolft, G. Moschetti & Villain, F. (1999). Spray-drying of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria**. J. Food prot**. 62: 773-777.

Wood, B. J. B. (1997). **Microbiology of fermented foods**. London: Blackie Academic & Professional.

Wood, B. J. B., & Holzapfel, W.H. (1995). **The genera of lactic acid bacteria**. London: Blackie Academic & Professional.