บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. การเปลี่ยนแปลงของแลคติคแอสิดแบคทีเรียในการหมักแหนมเห็ด

1.1 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ในการหมักแหนมเห็ด

ผลการทดลองเพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักแหนมเห็ดที่ 0-72 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะทั่วไปในการทำแหนมเห็ด มีการเปลี่ยนแปลงแบ่งเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงเริ่มต้นของการหมักซึ่งหมายถึงในชั่วโมงที่ 0-6 ช่วงที่สองเป็นช่วงระยะการหมักในชั่วโมงที่ 9-72 ของการหมัก แสดงผลการเปลี่ยนแปลงในตาราง 10 และรูป 6

พบการเปลี่ยนแปลง ดังนี้ คือระยะเริ่ม (0-6 ชั่วโมง) เป็นช่วงที่มีเชื้อต่างๆ ปรับตัว และมีปริมาณเชื้อใกล้เคียงกันราว 1.40×10^{3} cfu/g ถึง 1.50×10^{3} cfu/g มี pH ราว 6.20-6.19 และปริมาณกรดร้อยละ 0.11-0.14 ในช่วงที่ 2 เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียมีการเจริญต่อเนื่อง จนครอบคลุมและมีบทบาทต่อการสร้างกรดอย่างเต็มที่ตั้งแต่ช่วงการบ่มในชั่วโมงที่ 9 เป็นต้นไป จำนวนแลคติคแอสิดแบคทีเรียเพิ่มอย่างรวดเร็วต่อเนื่องจนถึงระดับสูงสุดราว 5.54×10^{8} cfu/g เมื่อบ่มที่ 18-24 ชั่วโมง และคงปริมาณเชื้อระดับที่สูงใกล้เคียงกันโดยตลอดถึง 72 ชั่วโมงของการบ่ม โดยที่ปริมาณกรดแลคติคเพิ่มมากขึ้นและเพิ่มอย่างรวดเร็วโดยตลอดนับตั้งแต่เชื้อเจริญถึงปริมาณสูงสุดตั้งแต่การบ่มที่ 18 ชั่วโมง เป็นต้นไป การเปลี่ยนแปลงทั้งหมดมีผลเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างจาก 6.20 ลดต่ำลงเป็น 4.55 และมีปริมาณกรดแลคติคเพิ่มจากร้อยละ 0.11 เป็น 0.57

1.2 การแยกและจัดจำแนกแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีเพื่อจำแนกชนิดแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่พบในช่วงที่ 72 ชั่วโมงของการหมัก

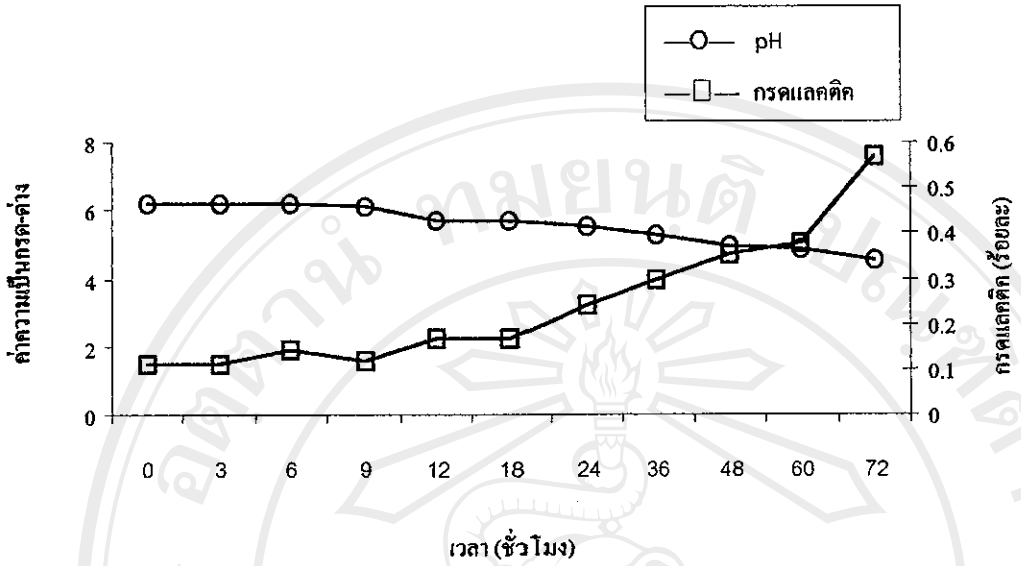
เลือกเก็บเซลล์ของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร MRS agar โดยสุ่มเก็บจากลักษณะของโคโลนีและการกระจายบนอาหาร ทั้งหมด 58 โคโลนี จุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้งหมดติดสีแกรมบวกแบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มรูปร่างท่อนแกรมบวก (Gram-positive rod) กลุ่มรูปร่างทรงกลมเดี่ยวและคู่ (Gram-positive cocci) และกลุ่มรูปร่างทรงกลมจัดเรียง 4 เซลล์ (Gram-positive tetrad) เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีตามวิธีใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan and Gibbons, 1986) และ The Gennera of Lactic Acid Bacteria (Wood and Holzapfel, 1995) สามารถจัดจำแนกแลคติคแอสิดแบคทีเรียเป็น 4 สกุล คือสกุล *Lactobacillus* 2 กลุ่ม คือกลุ่ม Obligate homofermentative และกลุ่ม Obligate heterofermentative

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

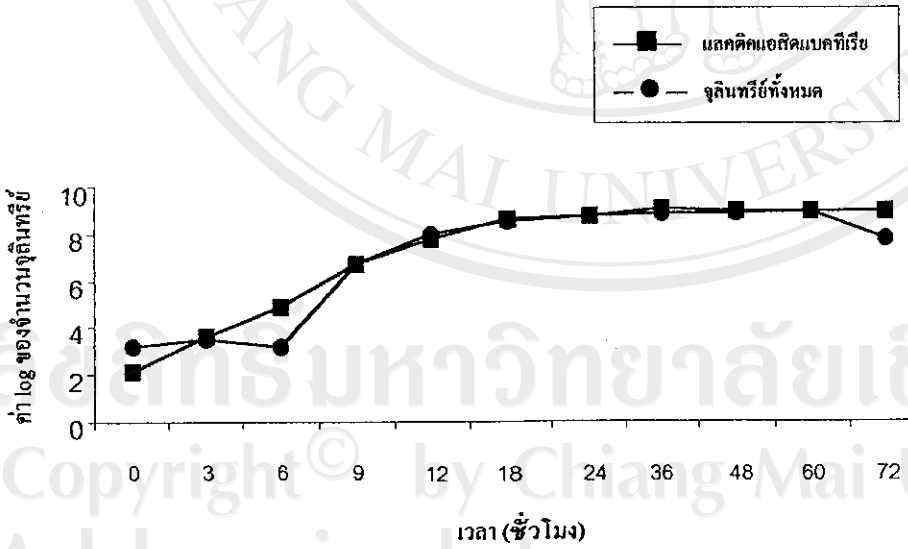
ตาราง 10 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดแลคติค ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณแลคติคแอสิดแบคทีเรียในระหว่างการหมักแหนมเห็ด

ระยะบ่ม (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณกรดแลคติค (ร้อยละ)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (cfu/g)	แลคติคแอสิดแบคทีเรีย (cfu/g)
0	6.20	0.11	1.40×10^{3}	1.34×10^{2}
3	6.16	0.11	3.30×10^{3}	4.10×10^{3}
6	6.19	0.14	1.50×10^{3}	7.50×10^{4}
9	6.13	0.12	5.36×10^{6}	4.78×10^{6}
12	5.71	0.17	9.52×10^{7}	5.20×10^{7}
18	5.65	0.17	3.16×10^{8}	4.01×10^{8}
24	5.49	0.24	5.28×10^{8}	5.54×10^{8}
36	5.29	0.30	7.02×10^{8}	1.06×10^{9}
48	4.97	0.35	7.60×10^{8}	8.90×10^{8}
60	4.87	0.38	8.20×10^{8}	8.90×10^{8}
72	4.55	0.57	6.00×10^{7}	9.10×10^{8}

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 6 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกรดแลคติคระหว่างการหมักแหนมเห็ด

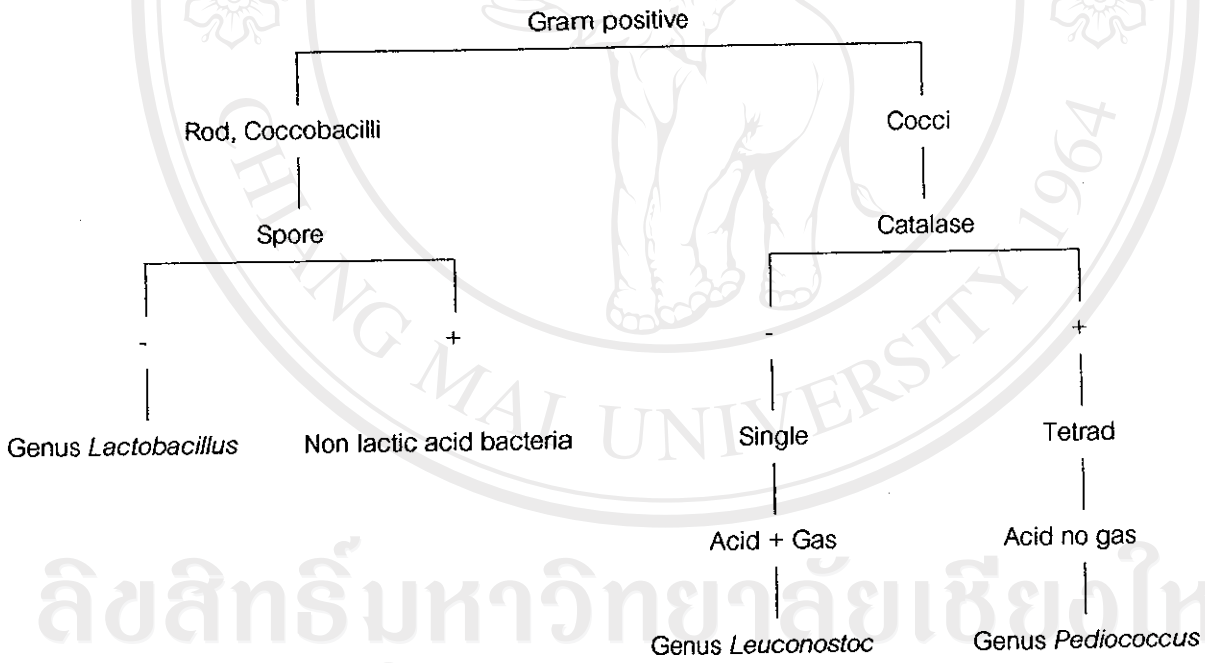


รูป 7 การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และแลคติคแอสิดแบคทีเรียระหว่างการหมักแหนมเห็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สกุล *Leuconostoc* และ สกุล *Pediococcus* แสดงรายละเอียดดังรูป 8 และมีสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี (ตาราง 11) จำนวนและชนิดของแลคติคแอสิดแบคทีเรียทั้งหมดตลอดระยะเวลาการหมักของแหนมเห็ดแสดงดังตาราง 12

จากตาราง 12 แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่พบมากและพบโดยตลอดการหมักคือ *Lactobacillus plantarum* ซึ่งมีลักษณะเป็นเซลล์รูปท่อน ต่อกันเป็นคู่ หรืออาจเป็นเซลล์เดี่ยว (รูป 10) ที่พบรองลงมาคือ *Lactobacillus brevis* ซึ่งมีลักษณะเป็นเซลล์รูปท่อน ต่อกันเป็นคู่ หรืออาจเป็นเซลล์เดี่ยว (รูป11)ในชั่วโมงที่ 3 ถึง 72 ส่วนในช่วงสุดท้ายของการหมัก (48-72 ชั่วโมง) พบ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ซึ่งมีลักษณะเป็นเซลล์รูปท่อนสั้น ส่วนมากต่อกันเป็นคู่ (รูป12) และ *Pediococcus pentosaceus* ซึ่งมีลักษณะเป็นเซลล์ทรงกลมจัดเรียง 4 เซลล์ (tetrads) (รูป 13)ในปริมาณเล็กน้อย



รูป 8 แผนภูมิการจำแนกแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่พบในแหนมเห็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 11 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีของแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่จัดจำแนกได้

คุณสมบัติ	*Lb. plantarum*	*Lb. brevis*	*P. pentosaceus*	*Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum*
รูปร่างเซลล์	ท่อนสั้น	ท่อนสั้น	tetrad	ทรงกลม
การติดสีแกรม	+	+	+	+
การมีสปอร์	-	-	-	-
การสร้างเอนไซม์คะตาเลส	-	-	-	-
การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส	-	-	+	-
การมีเอนไซม์โปรติเอส	-	+	-	-
การเจริญในสภาพไร้อากาศ	+	+	+	+
ออกซิเดชัน/เฟอร์เมนเตชัน	-/+	-/+	-/+	-/+
การหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ	+	-	+	+
การเคลื่อนที่	-	-	-	-
การเจริญใน 10% เอทธานอล	NR	NR	NR	-
การเจริญในอาหารที่มีสารละลาย				
โซเดียมคลอไรด์				
ร้อยละ 4, 6.5	NR	NR	+	NR
ร้อยละ 18	NR	NR	-	NR
การเจริญในอาหารที่มี				
pH 4.2, 7.5, 8.5	NR	NR	+	NR
pH 4.8	NR	NR	NR	+
การเจริญที่อุณหภูมิ				
35, 40 องศาเซลเซียส	NR	NR	+	NR
50 องศาเซลเซียส	NR	NR	-	NR

NR = not research

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 11 (ต่อ)

คุณสมบัติ	*Lb. plantarum*	*Lb. brevis*	*P. pentosaceus*	*Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum*
การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต				
กลูโคส	+	+	+	+
ไซโลส	+	+	NR	NR
อะราบิโนส	+	+	+	-
เมลลิไบโอส	+	+	NR	NR
แรฟฟิโนส	+	-	-	-
แรมโนส	+	-	NR	NR
เมลลิไซโตส	+	-	NR	NR
ซอบิทอล	+	-	NR	NR
แลกโทส	+	+	+	+
การสร้างเดกซแทรน	NR	NR	NR	+
เซลโลไบโอส	+	-	NR	NR
ฟรุคโตส	NR	NR	NR	+
ซูโครส	NR	NR	+	+
มอลโตส	NR	NR	+	NR

NR = not research

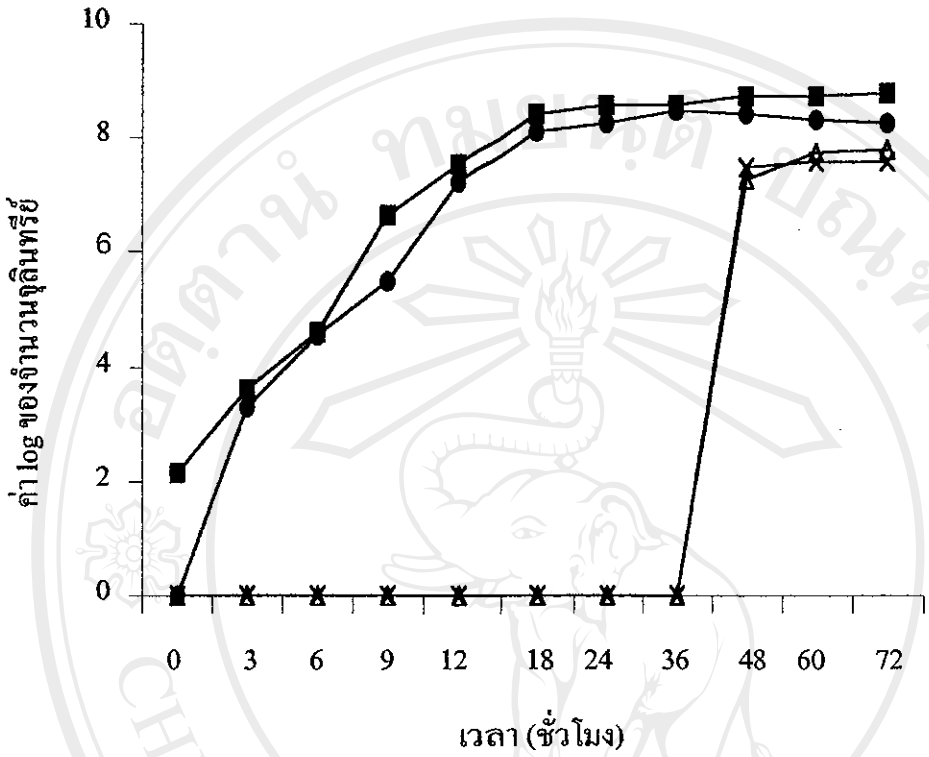
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 12 ปริมาณแลคติคแอสิดแบคทีเรียระหว่างการหมักแหนมเห็ด

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวน (cfu/g) และสัดส่วน (ร้อยละ) ของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย			
	Lb. plantarum	*Lb. brevis*	*P. pentosaceus*	*Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum*
0	1.34×10^{2} (100.00)	NF	NF	NF
3	4.15×10^{3} (48.78)	2.10×10^{3} (58.45)	NF	NF
6	4.15×10^{4} (55.34)	3.35×10^{4} (44.67)	NF	NF
9	4.43×10^{6} (92.58)	3.25×10^{5} (6.80)	NF	NF
12	3.41×10^{7} (65.58)	1.74×10^{7} (33.47)	NF	NF
18	2.76×10^{8} (67.21)	1.34×10^{8} (32.80)	NF	NF
24	3.68×10^{8} (66.34)	1.77×10^{8} (31.87)	NF	NF
36	3.68×10^{8} (70.75)	3.10×10^{8} (29.25)	NF	NF
48	5.70×10^{8} (64.04)	2.70×10^{8} (30.34)	2.00×10^{7} (2.25)	3.00×10^{7} (3.37)
60	5.80×10^{8} (65.17)	2.10×10^{8} (23.60)	5.90×10^{7} (6.63)	3.70×10^{7} (4.16)
72	6.30×10^{8} (69.23)	1.90×10^{8} (20.88)	6.30×10^{7} (6.92)	3.71×10^{7} (4.07)

NF = not found

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 9 การเปลี่ยนแปลงของแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่พบระหว่างการหมักแหนมเห็ด

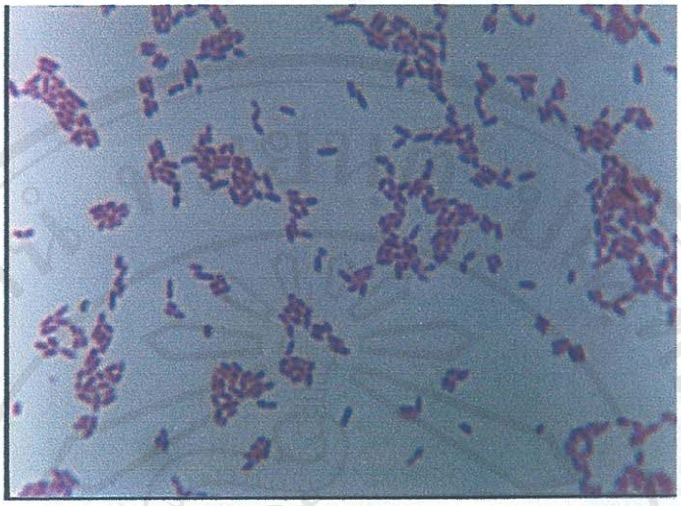
ก. *Lactobacillus plantarum* (—■—)

ข. *Lb. brevis* (—●—)

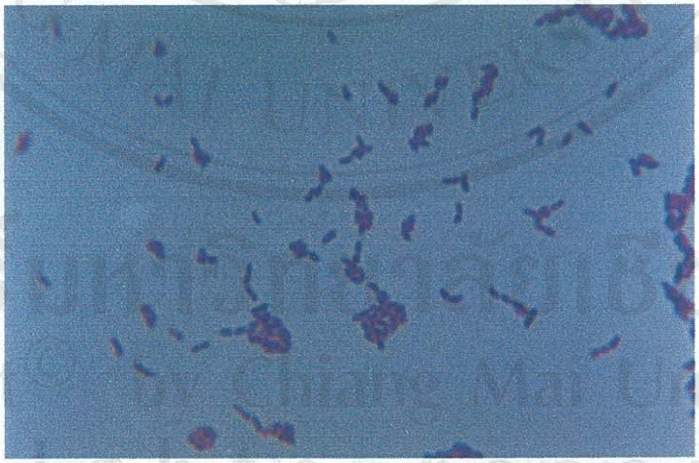
ค. *Pediococcus pentosaceus* (—△—)

ง. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (—×—)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

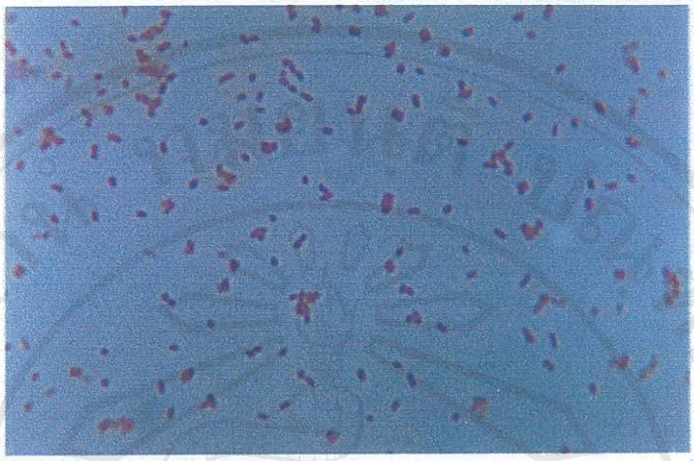


รูป 10 รูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของ *Lactobacillus plantarum* (× 1000)

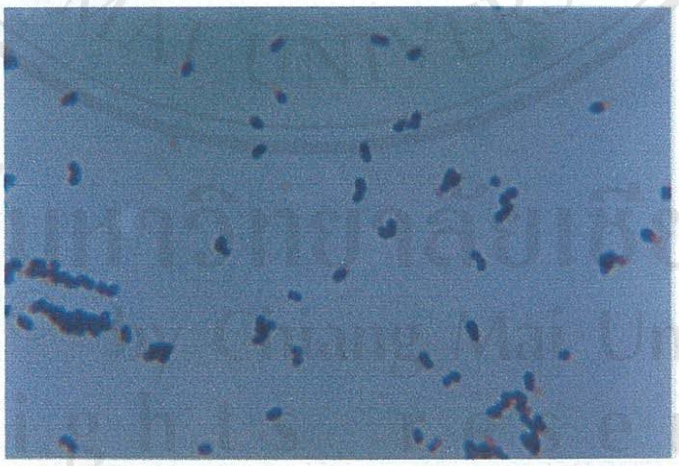


รูป 11 รูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของ *Lactobacillus brevis* (× 1000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 12 รูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของ *Pediococcus pentosaceus* (× 1000)



รูป 13 รูปร่างลักษณะและการติดสีแกรมของ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (× 1000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การคัดเลือกแลคติคแอสิดแบคทีเรียสำหรับการผลิตแหนมเห็ด

จากการแยกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียในตัวอย่างแหนมเห็ดที่เก็บจากท้องตลาด ได้ทั้งหมด 110 isolates (ตาราง 13) เมื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีแล้วพบแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สำคัญ 4 ชนิด คือ *Lactobacillus plantarum* จำนวน 65 ไอโซเลต *Lactobacillus brevis* จำนวน 22 ไอโซเต, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* จำนวน 10 ไอโซเลต และ *Pediococcus pentosaceus* จำนวน 13 ไอโซเลต ในการคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับหมักแหนมเห็ด นำแลคติคแอสิดแบคทีเรียไอโซเลตต่างมาทดสอบอัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่าง (หน่วย/ชั่วโมง)ในระหว่างการหมักโดยเลี้ยงเชื้อใน MRS broth จากการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง โดยคิดจากค่าความชันของกราฟ

2.1 การคัดเลือก *Lactobacillus plantarum*

ในการคัดเลือกแลคติคแอสิดแบคทีเรียพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำหมักลดลงตามเวลาหมัก (ตาราง 14 และรูป 14) โดยที่การหมักด้วย *Lb. plantarum* 100 มีความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้น 6.66 ลดลงเหลือ 5.38 ภายในเวลา 12 ชั่วโมง มีอัตราการลดลงของระดับความเป็นกรด-ด่าง สูงที่สุดคือ 0.32 หน่วย/ชั่วโมง ขณะที่ *Lb. plantarum* 002 และ 063 มีอัตราการลดลงของระดับความเป็นกรดด่างรองลงมาคือ 0.30 หน่วย/ชั่วโมง

2.2 ผลการคัดเลือก *Lactobacillus brevis*

ในการคัดเลือก *Lb. brevis* ทั้ง 10 ไอโซเลต พบว่าระดับความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำหมักลดลงตามเวลาหมักด้วย *Lb. brevis* ทั้ง 10 isolates (ตาราง 15 และรูป 15)โดยที่การหมักด้วย *Lb. brevis* 115 มีความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้น 6.67 ลดลงเหลือ 5.65 ภายในเวลา 12 ชั่วโมง มีอัตราลดลงของระดับความเป็นกรด-ด่างสูงที่สุดคือ 0.26 หน่วย/ชั่วโมง ขณะที่ *Lb. brevis* 033 มีอัตราการลดลงของระดับความเป็นกรด-ด่างรองลงมาคือ 0.24 หน่วย/ชั่วโมง

2.3 ผลการคัดเลือก *Pediococcus pentosaceus*

ในการคัดเลือก *P. pentosaceus* ทั้ง 7 ไอโซเลต พบว่าความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำหมักลดลงตามเวลาการหมัก (ตาราง 16 และรูป 16) โดยที่การหมัก *P. pentosaceus* 140 มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.67 ลดลงเหลือ 4.20 ภายในเวลา 12 ชั่วโมง มีอัตราการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง สูงที่สุดคือ 0.62 หน่วย/ชั่วโมง ส่วน *P. pentosaceus* 138 มีอัตราการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างรองลงมาคือ 0.60 หน่วย/ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 13 แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ

ชนิดของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย	รหัสเชื้อ	จำนวนของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย (ไอโซเลต)	แหล่งของแหนมเห็ด
Lb. plantarum	001-005, 015	6	ร้านเจ้าเงาะ จ. เชียงใหม่
Lb. plantarum	016, 017, 021, 022	4	ตลาดโก้งโค้ง จ. เชียงใหม่
Lb. plantarum	023, 024, 031, 032	4	ร้านอาหารมังสวิรัติ สวนดอก จ. เชียงใหม่
Lb. brevis	033, 034	2	ร้านอาหารมังสวิรัติ สวนดอก จ. เชียงใหม่
Lb. plantarum	036-040, 043	6	ตลาดเมฆ จ. ลำปาง
Lb. brevis	035, 047	2	ตลาดเมฆ จ. ลำปาง
Lb. plantarum	048, 049, 053, 054	4	ตลาด อ. แม่ทะ จ. ลำปาง
Lb. brevis	051, 052	2	ตลาด อ. แม่ทะ จ. ลำปาง
Lb. plantarum	055-057, 061-063	6	ร้านประตูชัยมังสวิรัติ จ. ลำปาง
Lb. plantarum	064, 065, 067, 068, 072, 073	6	ชมรมอนุรักษ์เห็ดนางรม-นางฟ้า จ. ลำปาง
Lb. plantarum	075-078	4	ตลาดทุ่งเกวียน จ. ลำปาง
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum*	079, 080	2	ตลาดทุ่งเกวียน จ. ลำปาง
P. pentosaceus	082, 083	2	ตลาด อ. ลี้ จ.ลำพูน
Lb. plantarum	084	1	ตลาด อ. ลี้ จ.ลำพูน
Leu. mesenteroides subsp. dextranicum	086	1	ตลาด อ. ลี้ จ.ลำพูน
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum*	087	1	กลุ่มอาสาพัฒนา จ. เพชรบุรี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 13 (ต่อ)

ชนิดของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย	รหัสเชื้อ	จำนวนของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย (ไอโซเลต)	แหล่งของแหนมเห็ด
Lb. brevis	088, 093, 094	3	กลุ่มอาสาพัฒนา จ. เพชรบุรี
Lb. plantarum	089, 092	2	กลุ่มอาสาพัฒนา จ. เพชรบุรี
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum*	095	1	ร้านอาหารมังสวิรัติ จ. กรุงเทพฯ
Lb. plantarum	097, 100	2	ร้านอาหารมังสวิรัติ จ. กรุงเทพฯ
P. pentosaceus	098, 099	2	ร้านอาหารมังสวิรัติ จ. กรุงเทพฯ
Lb. brevis	102-104	3	ร้านอาหารมังสวิรัติ จ. กรุงเทพฯ
Lb. brevis	105, 107	2	ตลาด จ. เชียงราย
Lb. plantarum	108, 109, 112,113	4	ตลาด จ. เชียงราย
P. pentosaceus	111	1	ตลาด จ. เชียงราย
Lb. brevis	114, 115	2	ตลาด อ. งาว จ. ลำปาง
Lb. plantarum	116, 117, 120	3	ตลาด อ. งาว จ. ลำปาง
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum*	119	1	ตลาด อ. งาว จ. ลำปาง
Lb. plantarum	121, 122, 126	3	ตลาด อ. ลอง จ. ลำปาง
Lb. brevis	127, 128	2	ตลาด อ. ลอง จ. ลำปาง
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum*	129	1	ตลาด อ. ลอง จ. ลำปาง
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum*	130	1	ตลาดดอยติ จ. ลำพูน
Lb. plantarum	131, 134	2	ตลาดดอยติ จ. ลำพูน
Lb. brevis	135, 136	2	ตลาดดอยติ จ. ลำพูน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 13 (ต่อ)

ชนิดของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย	รหัสเชื้อ	จำนวนของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย (ไอโซเลต)	แหล่งของแหนมเห็ด
P. pentosaceus	137, 138	2	ตลาดดอยติ จ. ลำพูน
P. pentosaceus	139, 140, 147- 149	5	ตลาดเมืองใหม่ จ. เชียงใหม่
Lb. brevis	141	1	ตลาดเมืองใหม่ จ. เชียงใหม่
Lb. plantarum	142	1	ตลาดเมืองใหม่ จ. เชียงใหม่
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum*	143	1	ตลาดเมืองใหม่ จ. เชียงใหม่
P. pentosaceus	150	1	ร้านอาหารมังสวิรัติ จ. เชียงใหม่
Lb. plantarum	151, 153, 155,156	4	ร้านอาหารมังสวิรัติ จ. เชียงใหม่
Lb. brevis	152	1	ร้านอาหารมังสวิรัติ จ. เชียงใหม่
Leu. mesenteroides subsp. *dextranicum*	154	1	ร้านอาหารมังสวิรัติ จ. เชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 ผลการคัดเลือก *Leuconostoc mesenteroides* subsp .*dextranicum*

ในการคัดเลือก *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* ทั้ง 7 ไอโซเลต พบว่าระดับความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำหมักลดลงตามเวลาหมักด้วย *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (ตาราง 17 และรูป 17) โดยที่การหมักด้วย *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* 079 และ 086 มีอัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่าง สูงเท่ากันคือ 0.19 หน่วย/ชั่วโมง

ได้คัดเลือกเชื้อที่มีอัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่างสูงได้ 2 เชื้อ เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป เชื้อที่คัดเลือกได้คือ *Pediococcus pentosaceus* 140 และ *Lactobacillus plantarum* 100

3. การใช้แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่คัดเลือกเป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักแหนมเห็ด

โดยการใช้แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ทำเป็นกล้าเชื้อ แล้วผสมในส่วนผสมสำหรับทำแหนมเห็ด เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ได้เติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย หมักแหนมเห็ดที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ด้วยการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกรดแลคติค การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแลคติคแอสิดแบคทีเรียบนอาหารแข็ง MRS เพื่อนับจำนวนแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รวมทั้งการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ซึ่งประกอบด้วยชุดการทดลองอยู่ 4 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่เติมเชื้อเริ่มต้นของ *Lactobacillus plantarum* 100, *Pediococcus pentosaceus* 140 ชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *Lb. Plantarum* 100 ผสมกับ *P. pentosaceus* 140 ในอัตราส่วน 1:1 รวมทั้งชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่มีการเติมเชื้อเริ่มต้น

3.1 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์

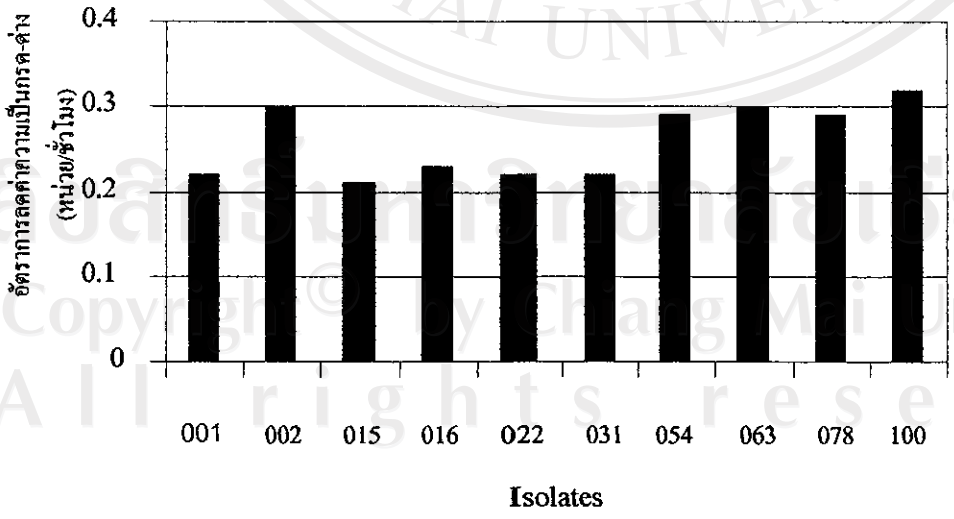
การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (ตาราง 18 และรูป 18) ระหว่างการหมักแหนมเห็ดด้วยเชื้อเริ่มต้นพบว่าค่า pH ของชุดควบคุม (control) ที่ไม่มีการเติมแลคติคแอสิดแบคทีเรียเป็นเชื้อเริ่มต้น มี pH จากเริ่มต้น 6.19 และลดลงตามระยะเวลาหมักที่ 72 ชั่วโมง เป็น 4.54 ในชุดการทดลองที่ใช้เชื้อเริ่มต้นเดี่ยว ของ *Lb. plantarum* 100 และ *P. pentosaceus* 140 ในการหมักแหนมเห็ด มี pH ลดต่ำลงใกล้เคียงสม่ำเสมอกันตลอด ระยะเวลาหมัก โดยมี pH ต่ำกว่า control อย่างชัดเจน เมื่อใช้เชื้อผสมของ *Lb. plantarum* 100 ร่วมกับ *P. pentosaceus* 140 มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของ pH ค่อนข้างไม่สม่ำเสมออย่างเชื้อเดี่ยวๆ โดยทั่วไปค่า pH ขึ้นลงไปมาระหว่าง control และเชื้อเดี่ยว อย่างไรก็ตามช่วงสุดท้ายมีค่า pH 4.21 ซึ่งต่ำกว่าเชื้อเดี่ยวๆ ทั้งหลาย

การเปลี่ยนแปลงของกรดแลคติค (ตาราง 19 และรูป 19) ระหว่างการหมักพบว่า ปริมาณกรดแลคติคในผลิตภัณฑ์สูงขึ้น เมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น ระหว่างการหมักตั้งแต่ชั่วโมงที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 14 อัตราการลดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของ *Lactobacillus plantarum* ในอาหารเหลว MRS

เชื้อ	ค่าความเป็นกรด-ด่าง ตามระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)					อัตราการลดค่าความเป็นกรด-ด่าง (หน่วย/ชั่วโมง)
	0	3	6	9	12	
001	6.67	6.51	6.13	6.05	5.81	0.22
002	6.67	6.48	6.09	6.03	5.48	0.30
015	6.67	6.50	6.11	6.05	5.84	0.21
016	6.66	6.48	6.11	6.01	5.73	0.23
022	6.67	6.50	6.11	6.04	5.79	0.22
031	6.67	6.50	6.12	6.04	5.81	0.22
054	6.65	6.48	6.10	6.02	5.49	0.29
063	6.67	6.49	6.11	6.02	5.47	0.30
078	6.66	6.48	6.09	5.97	5.51	0.29
100	6.66	6.45	6.08	5.98	5.38	0.32

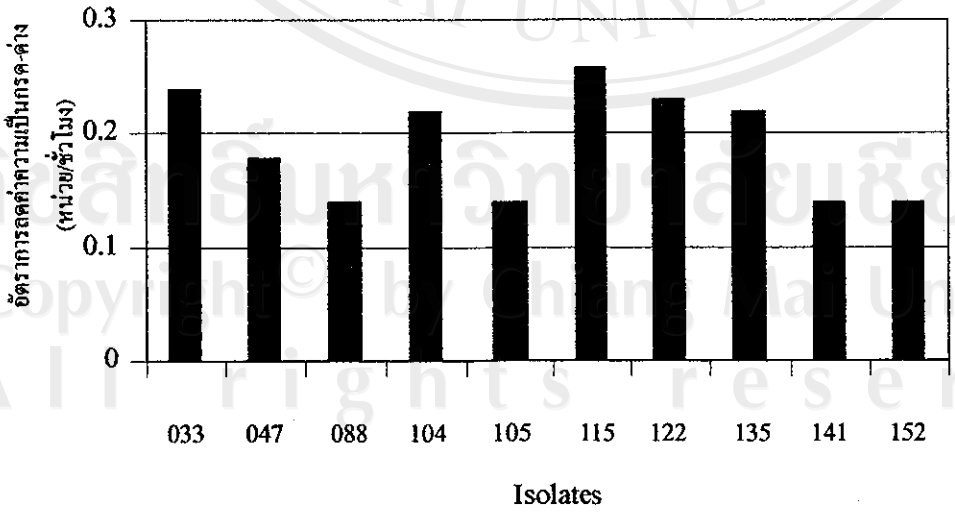


รูป 14 อัตราการลดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของ *Lactobacillus plantarum* ในอาหารเหลว MRS ภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 15 อัตราการลดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของ *Lactobacillus brevis* ในอาหารเหลว MRS

เชื้อ	ค่าความเป็นกรด-ด่าง ตามระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)					อัตราการลดค่าความเป็นกรด-ด่าง
	0	3	6	9	12	(หน่วย/ชั่วโมง)
033	6.67	6.59	6.40	6.22	5.71	0.24
047	6.67	6.55	6.49	6.25	5.97	0.18
088	6.67	6.61	6.31	6.24	6.11	0.14
104	6.67	5.59	6.31	6.15	5.81	0.22
105	6.66	5.59	6.31	6.22	6.11	0.14
115	6.67	6.42	6.20	6.01	5.65	0.26
122	6.67	6.65	6.38	6.25	5.75	0.23
135	6.67	6.61	6.34	6.22	5.81	0.22
141	6.66	6.60	6.31	6.24	6.09	0.14
152	6.67	6.56	6.44	6.32	6.10	0.14

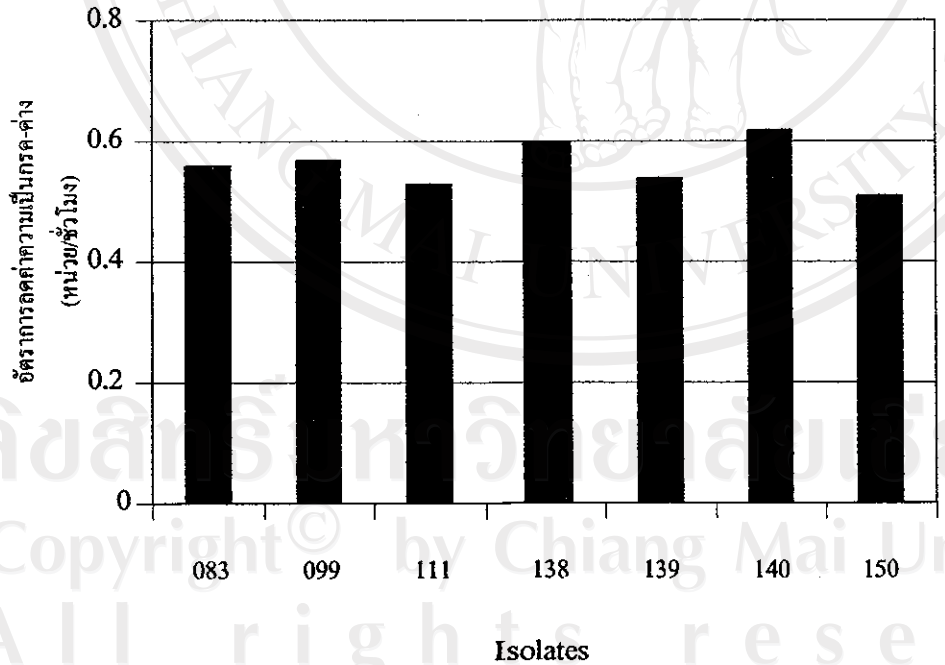


รูป 15 อัตราการลดค่าความเป็นกรด-ด่างของ *Lactobacillus brevis* ในอาหารเหลว MRS ภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 16 อัตราการลดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของ *Pediococcus pentosaceus* ในอาหารเหลว MRS

เชื้อ	ค่าความเป็นกรด-ด่าง ตามระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)					อัตราการลดค่าความเป็นกรด-ด่าง (หน่วย/ชั่วโมง)
	0	3	6	9	12	
083	6.67	6.60	5.97	5.01	4.45	0.56
099	6.67	6.54	5.92	4.72	4.40	0.57
111	6.67	6.60	6.00	5.12	4.50	0.53
138	6.67	6.60	6.93	4.65	4.30	0.60
139	6.66	6.60	6.23	4.97	4.53	0.54
140	6.67	6.60	5.85	4.43	4.20	0.62
150	6.67	6.60	6.31	5.01	4.62	0.51

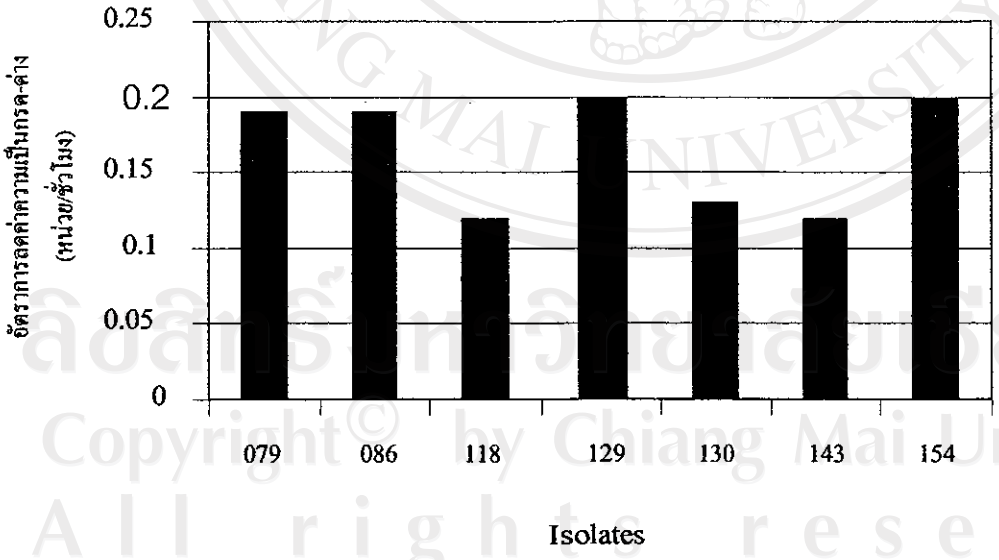


รูป 16 อัตราการลดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของ *Pediococcus pentosaceus* ในอาหารเหลว MRS ภายในเวลา 12 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 17 อัตราการลดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ในอาหารเหลว MRS

เชื้อ	ค่าความเป็นกรด-ด่าง ตามระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)					อัตราการลดค่าความเป็นกรด-ด่าง (หน่วย/ชั่วโมง)
	0	3	6	9	12	
079	6.66	6.61	6.31	6.11	5.92	0.19
086	6.67	6.60	6.29	6.09	5.90	0.19
118	6.67	6.62	6.33	6.21	6.19	0.12
129	6.67	6.61	6.32	6.12	5.87	0.20
130	6.67	6.65	6.30	6.22	6.15	0.13
143	6.67	6.59	6.31	6.22	6.19	0.12
154	6.67	6.63	6.32	6.13	5.87	0.20



รูป 17 อัตราการลดค่าความเป็นกรด-ด่าง ของ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ในอาหารเหลว MRS ภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

12-60 โดยชุดควบคุมมีปริมาณกรดแลคติคเพิ่มมากขึ้นจาก 0.13 ถึง 0.55 ในเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อใช้เชื้อเดี่ยวๆ ของ *Lb. plantarum* 100 และ *P. pentosaceus* 140 ผลิตภัณฑ์มีกรดแลคติคเกิดขึ้นในปริมาณมากขึ้นกว่าชุดควบคุมอย่างเด่นชัดตลอดระยะเวลาหมัก โดยทั่วไปการเปลี่ยนแปลงของเชื้อเดี่ยวๆ ทั้ง 2 มีลักษณะคู่ขนานกัน แม้ว่า เชื้อ *P. pentosaceus* 140 จะให้ปริมาณกรดแลคติคมากกว่าเล็กน้อย ในการใช้เชื้อผสมของ *Lb. plantarum* 100 ร่วมกับ *P. pentosaceus* 140 ปริมาณกรดแลคติคเกิดอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก ปริมาณกรดแลคติคเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลา และมีปริมาณมากเหนือกว่า แหนมเห็ดจากเชื้อเดี่ยวๆ ปริมาณกรดเกิดขึ้นมากที่สุดนับแต่ ชั่วโมงที่ 36 และคงระดับปริมาณกรดจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง

การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแลคติคแอสิดแบคทีเรียระหว่างการหมักแหนมเห็ดด้วยเชื้อเริ่มต้น (ตาราง 20 และรูป 20) พบว่า ชุดควบคุมมีลักษณะการดำเนินไปของแลคติคแอสิดแบคทีเรียอย่างช้าๆ ในช่วง 6-12 ชั่วโมงแรกของการหมัก อัตราเพิ่มจำนวนเร็วขึ้นในช่วง 12-24 ชั่วโมง และหลังจากนั้นคงสภาพสม่ำเสมอ แล้วจึงลดลงในช่วง 60-72 ชั่วโมง เป็น 8.70×10^{8} cfu/g ในการเติมเชื้อเดี่ยวเริ่มต้นของ *Lb. plantarum* 100 และ *P. pentosaceus* 140 และเชื้อผสมของ *Lb. plantarum* 100 ร่วมกับ *P. pentosaceus* 140 มีการเพิ่มจำนวนของแลคติคแอสิดแบคทีเรียในอัตราที่มากกว่าชุดควบคุม

3.2 ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

การประเมินคุณภาพของแหนมเห็ดที่หมักได้ 3 วัน และผ่านการนึ่งให้สุกเป็นเวลา 10 นาที เพื่อความมั่นใจของผู้ทดสอบชิม ในการประเมินคุณภาพในลักษณะต่างๆของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ความแน่นเนื้อ การยึดเกาะ รสเปรี้ยว กลิ่นแหนมเห็ด และการยอมรับรวม (ตาราง 21)

ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านความแน่นเนื้อ พบว่าชุดการทดลองที่มีการเติมเชื้อผสมของ *Lb. plantarum* 100 และ *P. pentosaceus* 140 ในอัตราส่วน 1:1 มีความแน่นเนื้อสูงที่สุดคือ51.50 แต่มีลักษณะใกล้เคียงกันกับชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* 140 โดยมีความแตกต่างไปจากชุดการทดลองที่เหลืออื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ผลการประเมินคุณภาพด้านการยึดเกาะ แหนมเห็ดที่เติมเชื้อผสมระหว่าง *Lb. plantarum* 100 และ *P. pentosaceus* 140 ในอัตราส่วน 1:1 มีคะแนนการยึดเกาะสูงที่สุดคือ 50.90 และมีลักษณะใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *P. pentosaceus* 140 ส่วนชุดการทดลองที่เติม Lb. plantarum 100 มีการยึดเกาะต่ำที่สุด โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

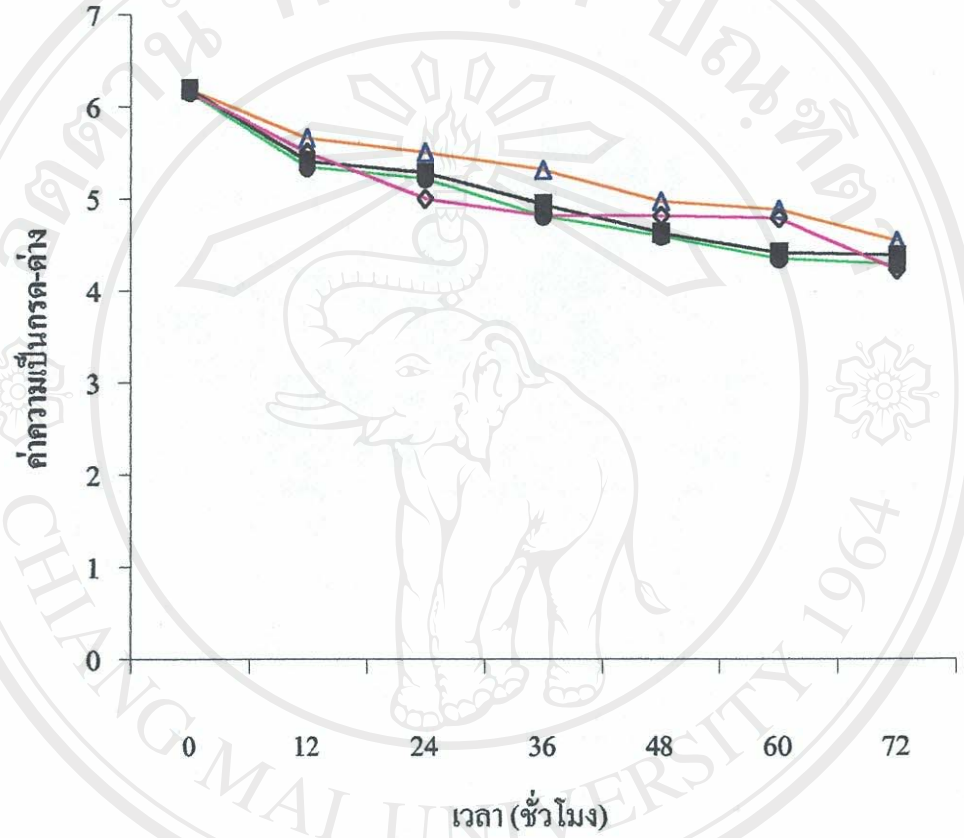
ตาราง 18 ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการหมักแหนมเห็ดด้วยเชื้อเริ่มต้นแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

แหนมเห็ด	ค่าความเป็นกรดด่างตามระยะเวลาของการหมัก (ชั่วโมง)						
	0	12	24	36	48	60	72
control	6.19	5.67	5.50	5.31	4.97	4.87	4.54
Lb. plantarum 100	6.20	5.40	5.27	4.94	4.63	4.42	4.37
P. pentosaceus 140	6.16	5.34	5.21	4.82	4.58	4.35	4.28
Lb. plantarum 100 + *P. pentosaceus* 140	6.17	5.50	5.01	4.80	4.81	4.79	4.21

ตาราง 19 ปริมาณกรดแลคติค (ร้อยละ) ระหว่างการหมักแหนมเห็ดด้วยเชื้อเริ่มต้นแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

แหนมเห็ด	ปริมาณกรดแลคติคตามระยะเวลาของการหมัก (ชั่วโมง)						
	0	12	24	36	48	60	72
control	0.13	0.21	0.22	0.32	0.36	0.42	0.55
Lb. plantarum 100	0.13	0.18	0.30	0.44	0.51	0.59	0.74
P. pentosaceus 140	0.15	0.24	0.38	0.51	0.57	0.65	0.76
Lb. plantarum 100 + *P. pentosaceus* 140	0.14	0.32	0.44	0.78	0.78	0.78	0.81

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 18 การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่างระหว่างการหมักแหนมเห็ดด้วย

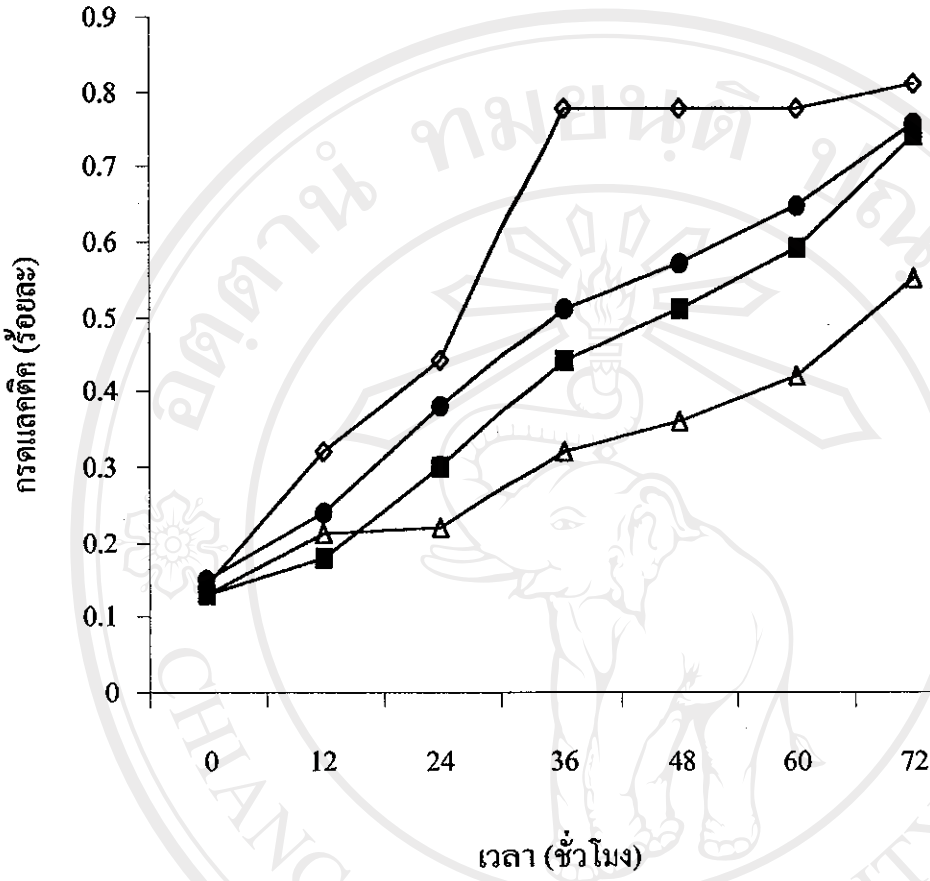
ก. ชุดควบคุม (—△—)

ข. *Lactobacillus plantarum* 100 (—■—)

ค. *Pediococcus pentosaceus* 140 (—●—)

ง. เชื้อผสม *Lactobacillus plantarum* 100 ร่วมกับ *Pediococcus pentosaceus* 140 (—◊—)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 19 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติค ระหว่างการหมักแหนมเห็ดด้วย

ก. ชุดควบคุม (—△—)

ข. *Lactobacillus plantarum* 100 (—■—)

ค. *Pediococcus pentosaceus* 140 (—●—)

ง. เชื้อผสม *Lactobacillus plantarum* 100 ร่วมกับ *Pediococcus pentosaceus* 140 (—◊—)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 20 จำนวนแลคติคแอสิดแบคทีเรียระหว่างการหมักแหนมเห็ดด้วยเชื้อเริ่มต้นแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

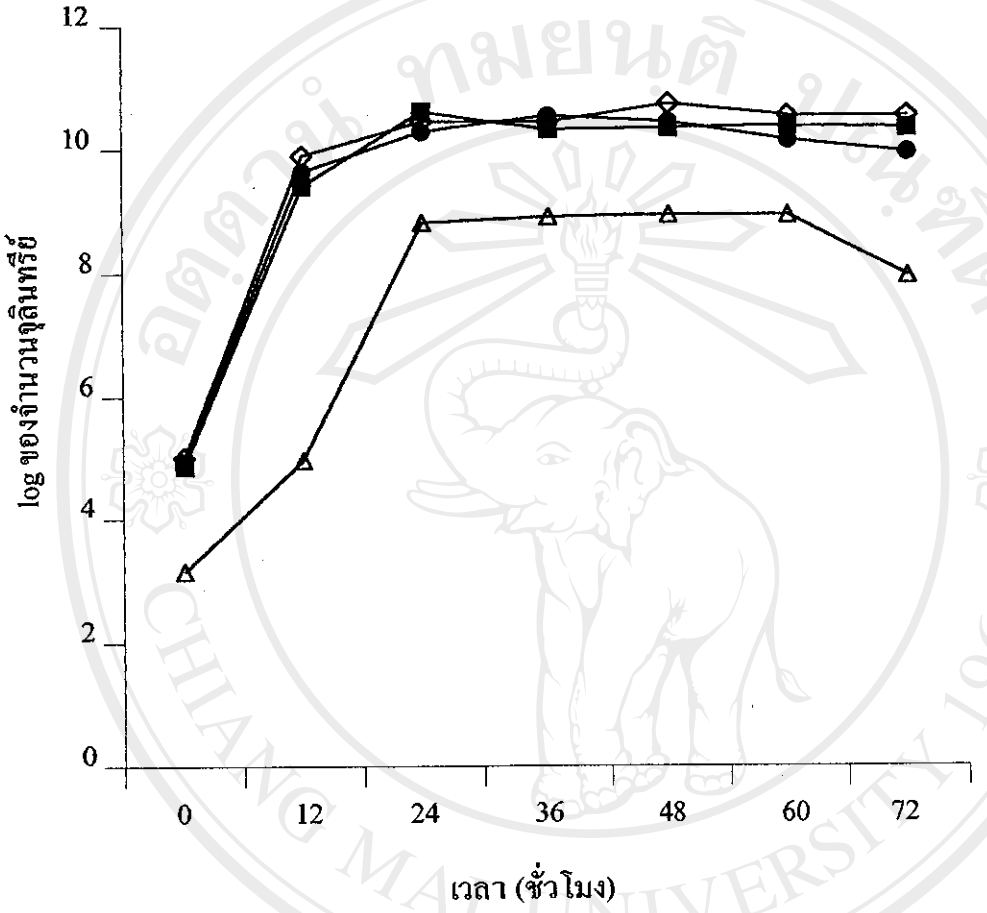
แหนมเห็ด	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (cfu/ml) ตามระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง)						
	0	12	24	36	48	60	72
control	1.45×10^{3}	9.47×10^{4}	6.33×10^{8}	8.17×10^{8}	8.47×10^{8}	8.53×10^{8}	8.70×10^{7}
Lb. plantarum 100	7.00×10^{4}	2.43×10^{9}	4.27×10^{10}	2.12×10^{10}	2.17×10^{10}	2.48×10^{10}	2.31×10^{10}
P. pentosaceus 140	8.70×10^{4}	4.37×10^{9}	1.97×10^{10}	3.57×10^{10}	2.89×10^{10}	1.43×10^{10}	9.27×10^{9}
Lb. plantarum 100 + *P. pentosaceus* 140	9.70×10^{4}	7.67×10^{9}	2.93×10^{10}	2.75×10^{10}	5.73×10^{10}	3.61×10^{10}	3.60×10^{10}

ตาราง 21 ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแหนมเห็ดผลิตโดยใช้แลคติคแอสิดแบคทีเรียเป็นกล้าเชื้อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

แหนมเห็ด	ความแน่นเนื้อ	การยึดเกาะ	รสเค็ม	รสเปรี้ยว	กลิ่นแหนมเห็ด	การยอมรับรวม
ชุดควบคุม	50.70^{b}	49.90^{bc}	31.30^{a}	66.70^{b}	65.30^{b}	63.80^{b}
Lb. plantarum 100	50.60^{b}	49.50^{c}	31.20^{a}	66.80^{b}	65.70^{c}	65.00^{b}
P. plantarum 100	51.20^{ab}	50.60^{ab}	31.20^{a}	70.30^{a}	67.00^{b}	65.00^{b}
Lb. plantarum 100 + *P. plantarum* 100	51.50^{a}	50.90^{a}	31.80^{a}	69.50^{a}	68.70^{a}	69.60^{a}

a-c = ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p< 0.05$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 20 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแลคติคแอสิดแบคทีเรียระหว่างการหมักแหนมเห็ดด้วย

ก. ชุดควบคุม (—△—)

ข. *Lactobacillus plantarum* 100 (—■—)

ค. *Pediococcus pentosaceus* 140 (—●—)

ง. เชื้อผสม *Lactobacillus plantarum* 100 ร่วมกับ *Pediococcus pentosaceus* 140(—◇—)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการประเมินคุณภาพรสเค็ม พบว่าทุกชุดการทดลองมีคะแนนใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

ผลการประเมินคุณภาพรสเปรี้ยว ชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสม *Lb. plantarum* 100 ร่วมกับ *P. pentosaceus* 140 และเชื้อเดี่ยว *P. pentosaceus* 140 มีคะแนนสูงที่สุด

ผลการประเมินคุณภาพกลิ่นแหนมเห็ด ชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสม *Lb. plantarum* 100 และ *P.pentosaceus* 140 ในอัตราส่วน 1:1 มีคะแนนของกลิ่นแหนมเห็ดสูงที่สุดคือ 68.10 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และในแหนมเห็ดที่เติมเชื้อ *P.pentosaceus* 140 มีคะแนนรองลงมาคือ 67.00

การประเมินคุณภาพด้านการยอมรับรวม ชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสมของ *Lb. plantarum* 100 และ *P. pentosaceus* 140 ในอัตราส่วน 1:1 มีคะแนนการยอมรับรวมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คือ 69.60 ส่วนชุดการทดลองที่มีคะแนนรองลงมา เป็นชุดการทดลองที่เติมเชื้อเดี่ยว *Lb. plantarum* 100 และ *P. pentosaceus* 140 มีคะแนนการยอมรับรวมเท่ากันคือ 65.00 ซึ่งชุดการทดลองที่เติมเชื้อเริ่มต้นมีคะแนนการยอมรับรวมสูงกว่าชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ได้เติมเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียเป็นเชื้อเริ่มต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved