เอกสารวิชาการฉบับที่ ๑/๒๕๔๙

Technical Paper No. 1/2006

# การใช้เทคโนโลยีชีวภาพในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (ปลาร้า)

# APPLICATION OF BIOTECHNOLOGY IN FERMENTED FISH PRODUCT (PLA-RA)

โดย

ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ — Pawared Inthuserdha

บดินทร์ อิทธิพงษ์ — Bordin Ittipong

สิริรัตน์ จงฤทธิพร — Sirirat Jongritthiporn

อัธยา กังสุวรรณ — Attaya Kungsuwan

กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ
กรมประมง
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Fishery Technological Development Division
Department of Fisheries
Ministry of Agriculture and Cooperative

กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ

เอกสารวิชาการฉบับที่ ๑/๒๕๔๙

Technical Paper No. 1/2006

# การใช้เทคโนโลยีชีวภาพในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (ปลาร้า)

# APPLICATION OF BIOTECHNOLOGY IN FERMENTED FISH PRODUCT (PLA-RA)

กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ

โดย

ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ — Pawared Inthuserdha

บดินทร์ อิทธิพงษ์ — Bordin Ittipong

สิริรัตน์ จงฤทธิพร — Sirirat Jongritthiporn

อัธยา กังสุวรรณ — Attaya Kungsuwan

กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ
เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ ๑๐๙๐๐
โทรศัพท์ (๐๒) ๙๔๐๖๑๓๐–๔๕

Fishery Technological Development Division
Kaset-Klang, Chatuchak, Bangkok 10900
Tel. (02) 9406130-45

รหัสทะเบียนวิจัยเลขที่ 43-44-2-07-06-06-3-954-005

**สารบาญ**


| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อ | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| คำนำ | 3 |
| วัตถุประสงค์ | 4 |
| อุปกรณ์ | 4 |
| วิธีดำเนินการ | 4 |
| 1. วิธีการหมักปลาร้า | 4 |
| 2. การวิเคราะห์คุณภาพปลาร้า | 5 |
| 3. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียจากปลาร้า | 5 |
| ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล | 6 |
| 1. ปริมาณจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักปลาร้า | 6 |
| 2. ค่า pH ในระหว่างการหมักปลาร้า | 8 |
| 3. การทดสอบด้านประสาทสัมผัส | 8 |
| 4. การจำแนกชนิดแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาร้าปลาเป็ด | 10 |
| สรุป | 10 |
| คำขอบคุณ | 10 |
| เอกสารอ้างอิง | 11 |


กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ

# การใช้เทคโนโลยีชีวภาพในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (ปลาร้า)

**ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ บดินทร์ อิทธิพงษ์ สิริรัตน์ จงฤทธิพร อัธยา กังสุวรรณ**
กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ ๑๐๙๐๐

## บทคัดย่อ

ทดลองหมักปลาร้าจากปลาเป็ดทั้งหมด 5 สูตร ใช้วิธีการหมักแบบดั้งเดิม 3 สูตร คือ สูตรที่ 1 หมักปลากับเกลือ (3:1 โดยน้ำหนัก) เป็นเวลา 1 คืน แล้วนำมาคลุกกับรำ (1 ส่วน) สูตรที่ 2 ใช้ปลา:เกลือ:รำ ในอัตราส่วน 3:1:1 โดยน้ำหนัก สูตรที่ 3 ใช้ปลา:เกลือ:รำ:ข้าวฟ่าง ในอัตราส่วน 9:3:2:1 โดยน้ำหนัก สำหรับอีก 2 สูตรเป็นการหมักแบบหมักหัวเชื้อก่อน โดยสูตรที่ 4 ใช้ปลา:เกลือ:รำหมัก ในอัตราส่วน 3:1:1 โดยน้ำหนัก และสูตรที่ 5 ใช้ปลา:เกลือ:รำหมัก:ข้าวฟ่างหมัก ในอัตราส่วน 9:3:2:1 โดยน้ำหนัก ใช้ระยะเวลาในการหมัก 10 เดือน ทำการสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์ทางด้านเคมีและจุลินทรีย์ทุกเดือน และทดสอบคุณลักษณะด้านประสาทสัมผัสเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก ซึ่งผลการวิเคราะห์เป็นดังนี้ ค่า pH เฉลี่ยของปลาร้าแต่ละสูตรเป็นดังนี้ 5.87, 5.79, 5.75, 5.08 และ 5.05 ตามลำดับ ปริมาณแบคทีเรียแลคติคเฉลี่ยที่พบในระหว่างการหมักของปลาร้าแต่ละสูตรเป็นดังนี้ $1.1x10^6$, $2.9x10^6$, $2.0x10^6$, $5.4x10^6$ และ $1.6x10^7$ CFU/g ตามลำดับ ผลการทดสอบด้านประสาทสัมผัสของปลาร้าทั้ง 5 สูตรพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในคุณลักษณะด้าน ลักษณะปรากฏ รสชาติ เนื้อสัมผัส และการยอมรับรวม แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ในคุณลักษณะด้านกลิ่น โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) ในคุณลักษณะด้านลักษณะปรากฏ รสชาติ และเนื้อสัมผัส ซึ่งพบว่าปลาร้าสูตรที่ 4 ได้คะแนนด้านลักษณะปรากฏและเนื้อสัมผัสมากที่สุด ปลาร้าสูตรที่ 5 ได้คะแนนด้านรสชาติและการยอมรับรวมมากที่สุด การใช้เทคโนโลยีชีวภาพโดยหมักหัวเชื้อรำข้าวและข้าวฟ่างในปลาร้าสูตรที่ 4 และ 5 จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นที่ยอมรับดีกว่าวิธีการหมักแบบดั้งเดิม (สูตร 1, 2 และ 3) ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาร้าปลาเป็ดโดยวิธี Photobiotin labeling DNA-DNA hybridization และ Ribotyping of 16S rRNA gene พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลตรงกันคือ *Tetragenococcus halophilus*

**คำสำคัญ** : ปลาร้า การหมัก ปลาเป็ด แบคทีเรียแลคติค

# APPLICATION OF BIOTECHNOLOGY IN FERMENTED FISH PRODUCT (PLA-RA)

**Pawared Inthuserdha Bordin Ittipong Sirirat Jongritthiporn Attaya Kungsuwan**
Fishery Technology Development Division, Department of Fisheries,
Kaset-Klang, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

## ABSTRACT

Pla-ra was made from trash-fish with 5 formulae. The first three formulae (F1, F2 and F3) were done as traditional method having formula as follows: F1 one night salted fish (3:1) and rice bran (1) by weight, F2 fish : salt : rice bran (3:1:1) by weight and F3 fish : salt : rice bran : sorghum (9:3:2:1) by weight. The last two formula 4 and 5 (F4 and F5), were prepared using fermented rice bran and fermented sorghum, having formula as follows: F4 fish : salt : fermented rice bran (3:1:1) by weight and F5 fish : salt : fermented rice bran : fermented sorghum (9:3:2:1) by weight. All of them were fermented for 10 months. The samples were randomly taken each month for chemical and microbiological analyses until 10 months. Sensory evaluation was tested when the fermentation was finished. The results are as follows: the average pH of each formula (F1-F5) were 5.87, 5.79, 5.75, 5.08 and 5.05, respectively. The average number of lactic acid bacteria during fermentation were $1.1x10^6$, $2.9x10^6$, $2.0x10^6$, $5.4x10^6$ and $1.6x10^7$ CFU/g, respectively. The results of sensory evaluation were found significantly different in appearance, taste, texture and over all acceptance but it was not found significantly different ($P>0.05$) in odor. It was found significantly different ($P<0.01$) in appearance, taste and texture. F4 had the highest score in appearance and texture. F5 had the highest score in taste and over all acceptance. The application of biotechnology, using fermented rice bran and fermented sorghum (F4 and F5), made the acceptance of product better than traditional method (F1, F2 and F3). The identification of isolated strains using Photobiotin labeling DNA-DNA hybridization and Ribotyping of 16S rRNA gene method showed the same results of *Tetragenococcus halophilus.*

**Key words**: Pla-ra, Fermentation, Trash fish, Lactic acid bacteria

# คำนำ

เนื่องจากการทำประมงโดยใช้อวนลาก จะมีปลาที่ไม่ใช่ปลากลุ่มเป้าหมายติดมา ซึ่งเราเรียกปลากลุ่มนี้ว่า ปลาเป็ด ประกอบไปด้วยปลาหลายชนิด เช่น ปลาหลังเขียว ปลาตาหวาน ปลาทูแขก ปลาข้างเหลือง ปลาแป้น ปลาทรายแดง ที่ไม่ได้ขนาดหรือมีขนาดเล็กเกินไป ซึ่งในปี 2538 สามารถจับได้ประมาณ 9.1 แสนตัน คิดเป็นร้อยละ 38.14 ของปริมาณปลาที่จับได้ทั้งหมด (กองเศรษฐกิจการประมง, 2541) ปลาเป็ดส่วนใหญ่จะถูกนำมาทำเป็นอาหารสัตว์ ซึ่งได้ราคาที่ต่ำ ถ้าเราสามารถนำปลาเป็ดเหล่านี้มาแปรรูปเป็นอาหารที่คนสามารถบริโภคได้ จะเป็นการเพิ่มมูลค่าของปลาเป็ดและยังเป็นการใช้ทรัพยากรสัตว์น้ำอย่างคุ้มค่าอีกด้วย ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่จะนำปลาเป็ดมาแปรรูปเป็นอาหารหมักดองพื้นบ้าน เช่น ปลาร้าหรือน้ำปลา ซึ่งเป็นอาหารที่คนไทยทั่วประเทศนิยมรับประทานและยังสามารถนำไปจำหน่าย เพื่อเป็นการเพิ่มรายได้แก่เกษตรกรอีกทางหนึ่ง

ปลาร้าคือผลิตภัณฑ์ปลาหมักพื้นบ้านซึ่งเป็นที่รู้จักกันมาช้านาน โดยนิยมบริโภคกันทางภาคอีสานและภาคกลางตอนบน มีวิธีการทำที่ไม่ยุ่งยากโดยเริ่มจากนำปลามาขอดเกล็ด ตัดหัว ควักไส้ แล้วล้างน้ำ จากนั้นผสมกับเกลือในอัตราส่วน ปลา 3 ส่วน ต่อเกลือ 1 ส่วน ทิ้งไว้ 1 คืน แล้วนำมาคลุกกับข้าวคั่วหรือรำ จากนั้นอัดใส่ไหให้แน่น แล้วใช้ไม้ไผ่สานปิดปากไห หมักทิ้งไว้ประมาณ 8 เดือน (แพรวพรรณ, 2522) การทำปลาร้าในระดับชาวบ้านแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ ปลาร้าข้าวคั่ว กับ ปลาร้ารำ โดยปลาร้าข้าวคั่วเป็นปลาหมักเกลือที่ใส่ข้าวคั่ว เมื่อหมักได้ที่แล้ว เนื้อปลาจะนิ่ม มีสีเหลืองเข้ม และมีกลิ่นเฉพาะตัว ส่วนปลาร้ารำ เป็นปลาหมักเกลือที่ใส่รำ เมื่อหมักได้ที่แล้ว ปลาจะมีเนื้อนิ่มแต่ยังคงรูปตัวปลา ลักษณะค่อนข้างแห้งและมีกลิ่นแรงเฉพาะตัว ปลาร้าส่วนใหญ่มักจะทำมาจากปลาน้ำจืด ซึ่งใช้ได้ทั้งปลาขนาดเล็กและปลาขนาดใหญ่ ปลาขนาดเล็กเช่น ปลากระดี่ ปลาซิว ปลาสร้อย ปลาขนาดใหญ่เช่น ปลาช่อน ปลาชะโด ปลาดุก แต่ปลากระดี่เป็นปลาที่นิยมนำมาทำเป็นปลาร้ามากที่สุด เพราะจะทำให้ได้ปลาร้าที่มีคุณภาพดี (พูลทรัพย์และคณะ, 2542) ส่วนปลาทะเลที่นำมาทำปลาร้า เช่น ปลากุเราและปลาทรายแดง (อุดม และอารีย์, 2515) และเคยมีการศึกษาการหมักปลาร้าจากปลาทะเลโดยทำจาก ปลาทู ปลาจวด ปลาซาร์ดีน ปลาหลังเขียว ปลาปากคมและปลากะตัก (ผ่องเพ็ญ และคณะ, 2528)

แบคทีเรียแลคติคเป็นจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบได้ในอาหารหมักทั่วไป เช่น นมเปรี้ยว กะหล่ำปลีดอง แตงกวาดอง เนยแข็ง เป็นต้น เชื่อกันว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักในอาหาร เนื่องจากสามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดอินทรีย์และสารอื่นๆได้ ซึ่งมีผลโดยตรงกับ กลิ่น รสชาติและเนื้อสัมผัสของอาหาร (Gonzalez *et al*.,1994) นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติคหลายชนิดยังมีส่วนสำคัญในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอีกด้วย (Lewus *et al*., 1991) อาหารหมักพื้นบ้านของไทยส่วนใหญ่ยังคงเป็นการหมักแบบธรรมชาติ และผลิตในระดับครัวเรือนซึ่งไม่ค่อยคำนึงถึงเรื่องคุณภาพมากนัก ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอและเสี่ยงต่อการปนเปื้อนกับเชื้อโรคอีกด้วย สำหรับผลิตภัณฑ์ปลาหมักของไทยมีหลายชนิด ได้แก่ ปลาร้า น้ำปลา ไต

ปลา บูดู ปลาจ่อม กุ้งจ่อม หอยดอง ทั้งนี้ได้มีการตรวจพบแบคทีเรียแลคติคในผลิตภัณฑ์เหล่านี้ เช่น *Tetragenococcus halophilus, Enterococcus faecalis, Enterococcus hirae.* (Tanasupawat *et al*., 1998) ดังนั้นหากมีการศึกษาและสามารถนำแบคทีเรียเหล่านี้มาใช้เป็นหัวเชื้อ จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสม่ำเสมอและยังปลอดจากจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอีกด้วย

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบวิธีการหมักปลาร้าแบบดั้งเดิมกับวิธีหมักปลาร้าแบบหมักหัวเชื้อก่อน
2. เพื่อศึกษาชนิดของแบคทีเรียแลคติคที่มีบทบาทในการหมักปลาร้า

## อุปกรณ์

**วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักปลาร้า**

- ปลาเป็ดสด ซื้อจากสะพานปลาจังหวัดสมุทรสาคร ประกอบไปด้วยปลาหลายชนิด เช่น ปลาแป้น ปลาทรายแดง ปลาหางแข็ง ปลาปากคม วิธีการเตรียมปลาทำโดยขอดเกล็ด ตัดหัว ควักไส้ ล้างน้ำ แล้วทิ้งให้สะเด็ดน้ำ
- เกลือสมุทรชนิดเกล็ด
- รำข้าวเจ้าดิบ
- ข้าวฟ่างบดละเอียด

## วิธีดำเนินการ

**1.วิธีการหมักปลาร้า (มี 5 สูตร)**

ในการทดลองนี้ใช้วิธีการหมักปลาร้า 2 วิธี คือ แบบดั้งเดิมและแบบหมักหัวเชื้อก่อน ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้

**หมักแบบดั้งเดิม**

สูตรที่ 1 ใช้ปลา:เกลือ:รำข้าว ในอัตราส่วน 3:1:1 โดยน้ำหนัก โดยหมักปลาเป็ด 5 กก. กับเกลือ 1.67 กก. ก่อน 1 คืน จึงคลุกกับรำ 1.67 กก. จากนั้นใส่ไหหมักไว้

สูตรที่ 2 ใช้ปลา:เกลือ:รำข้าว ในอัตราส่วน 3:1:1 โดยน้ำหนัก โดยผสมปลาเป็ด 5 กก. กับเกลือ 1.67 กก. และรำข้าว 1.67 กก. คลุกให้เข้ากัน จากนั้นใส่ไหหมักไว้

สูตรที่ 3 ใช้ปลา:เกลือ:รำข้าว:ข้าวฟ่าง ในอัตราส่วน 9:3:2:1 โดยน้ำหนัก โดยผสมปลาเป็ด 5 กก. เกลือ 1.67 กก. รำข้าว 1.11 กก. และข้าวฟ่าง 0.55 กก. คลุกให้เข้ากัน จากนั้นใส่ไหหมักไว้

กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ

**หมักแบบหมักหัวเชื้อก่อน**

สูตรที่ 4 ใช้ปลา:เกลือ:รำข้าว ในอัตราส่วน 3:1:1 โดยน้ำหนัก ทำโดยหมักรำข้าว 1.67 กก. ในน้ำ 1.67 ลิตรก่อน 1 วัน จากนั้นนำไปผสมกับปลาเป็ด 5 กก. และเกลือ 1.67 กก. คลุกให้เข้ากัน ใส่ไหหมักไว้

สูตรที่ 5 ใช้ปลา:เกลือ:รำข้าว:ข้าวฟ่าง ในอัตราส่วน 9:3:2:1 โดยน้ำหนัก ทำโดยหมักรำข้าว 1.11 กก. และข้าวฟ่าง 0.55 กก. ในน้ำก่อน 1 วัน จึงนำไปผสมกับปลาเป็ด 5 กก. และเกลือ 1.67 กก. คลุกให้เข้ากัน จากนั้นใส่ไหหมักไว้

**2. การวิเคราะห์คุณภาพปลาร้า**

ทำการสุ่มตัวอย่างปลาร้ามาตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณแบคทีเรียแลคติค และวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ทุกเดือนเป็นระยะเวลา 10 เดือน ดังวิธีต่อไปนี้

2.1 การหาปริมาณแบคทีเรียแลคติคใช้วิธี pour plate ด้วยอาหารวุ้น MRS (Difco) จากนั้นบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Ostergaard *et al*., 1998)

2.2 การหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Viable Count) ใช้วิธี pour plate ด้วยอาหารวุ้น PCA (Difco) จากนั้นบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Ostergaard *et al*., 1998)

2.3 การวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) โดยใช้เครื่องวัด pH meter JANWAY รุ่น 3310 (AOAC, 1995)

2.4 การประเมินคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส (sensory evaluation) นำปลาร้าที่หมักจนครบระยะเวลา 10 เดือน มาทำให้สุกโดยเข้าเตาอบไมโครเวฟประมาณ 3 นาที จากนั้นทดสอบชิมโดยใช้ผู้ทดสอบ 10 คนให้คะแนนแบบ 9-point Hedonic Scale ในคุณลักษณะด้าน ลักษณะปรากฏ กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และการยอมรับรวม เกณฑ์การยอมรับคือคุณลักษณะแต่ละด้านต้องได้คะแนนไม่น้อยกว่า 6 โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทั้งนี้วิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้วิธี ANOVA และ DMRT (Duncan's New Multiple – range Test) (ไพโรจน์, 2536)

**3. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียจากปลาร้า**

ทำการแยกแบคทีเรียแลคติคจากปลาร้าโดยวิธี pour plate ด้วยอาหารวุ้น MRS ที่ผสมเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 30°C นาน 3-7 วัน เมื่อโคโลนีเจริญนำมาเขี่ยลงบนอาหารวุ้น MRS ที่ผสมเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 30°C นาน 3 วัน เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว เมื่อโคโลนีเจริญนำมาเขี่ยลงบนอาหารวุ้น MRS slant ที่ผสมเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 30°C นาน 3 วัน จากนั้นเก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการจำแนกชนิดต่อไป

กองพัฒนาคุณภาพสาธารณสัตว์น้ำ

3.1 การทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียทำโดยการย้อมแกรม ทดสอบเอนไซม์แคตตาเลส การหมักน้ำตาลกลูโคส การเจริญที่อุณหภูมิ 10°C และ 45°C การเจริญที่ pH 4.5 และ 9.6 การเจริญที่เกลือเข้มข้น 18 เปอร์เซ็นต์ (Salminen and Wright, 1993)

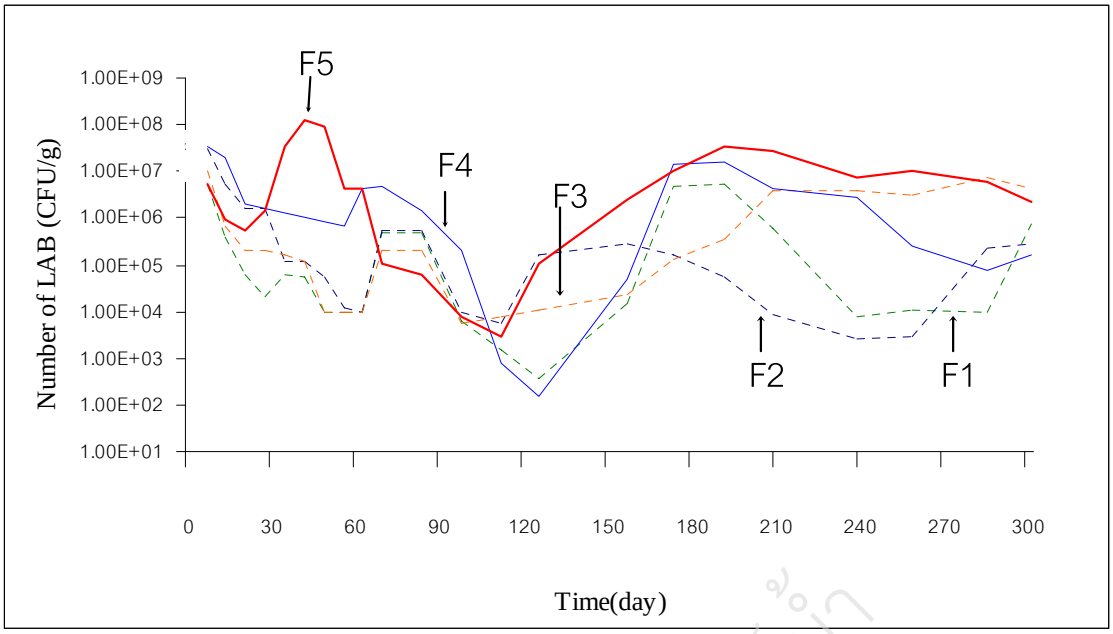
3.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้วิธี Photobiotin labeling DNA-DNA hybridization ทำโดยสกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นตรึง DNA สายเดี่ยวในหลุม microplate แล้วทำการ hybridization กับ probe DNA ที่ติดฉลากด้วย photobiotin ทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40°C จากนั้นเติม streptavidin-horseradish peroxidase กับ tetramethylbenzidine แล้วนำไปวัดการเกิดปฏิกิริยาด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (Tanasupawat *et al.*,1992)

3.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้วิธี Ribotyping of 16S rRNA gene ทำโดยสกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการ (16S rRNA) โดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) แล้วทำการตัด PCR product ที่เกิดขึ้นด้วย restriction enzyme โดยใช้เอนไซม์ 2 ตัวคือ *Alu* I และ *Mbo* I จากนั้นนำมาตรวจสอบรูปแบบของการตัดโดยวิธี gel electrophoresis เปรียบเทียบกับรูปแบบการตัดของ type strain 2 ตัวคือ *Tetragenococcus halophilus* (ATCC 33315) และ *Tetragenococcus muriaticus* (JCM 10006) (Jonganurakkun, 1999)

## ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

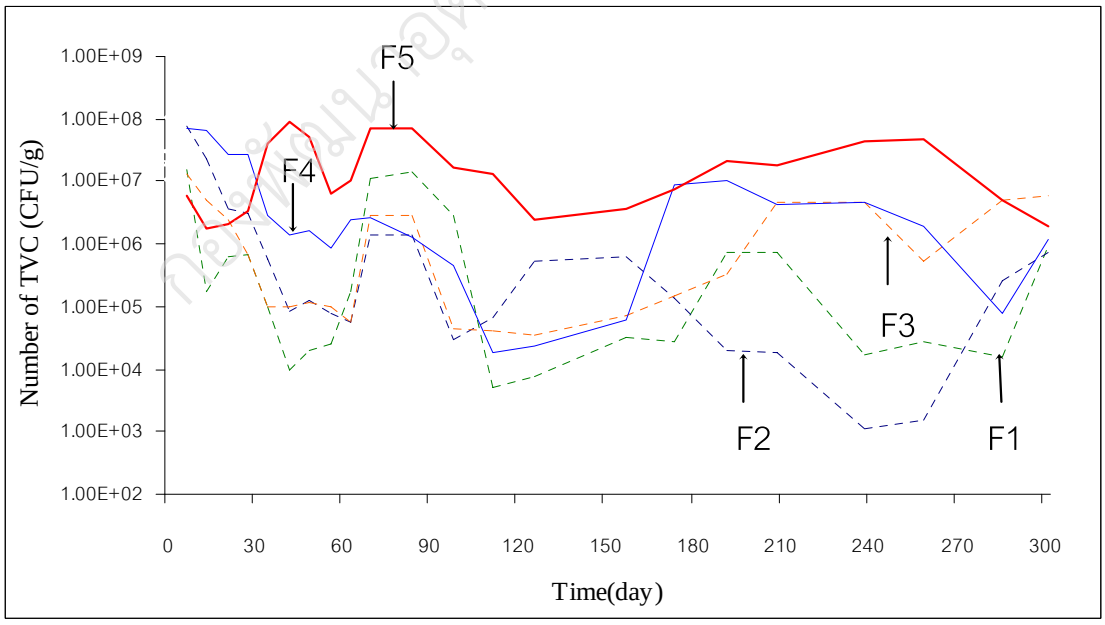
**1. ปริมาณจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักปลาร้า**

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (TVC) และปริมาณแบคทีเรียแลคติค (LAB) ในระหว่างการหมักปลาร้าทั้ง 5 สูตร แสดงดังรูปที่ 1 และ 2 พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์ตลอดช่วงระยะเวลาการหมัก เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียแลคติคในระหว่างการหมักปลาร้า (รูปที่ 1) พบว่าปริมาณแบคทีเรียแลคติคในปลาร้าสูตรที่ 4 และ 5 ซึ่งใช้วิธีการหมักแบบหมักหัวเชื้อก่อน มีปริมาณแบคทีเรียแลคติคสูงกว่าปลาร้าสูตรที่ 1, 2 และ 3 ซึ่งเป็นการหมักแบบดั้งเดิม ซึ่งจะส่งผลดีต่อกระบวนการหมักเพราะว่าแบคทีเรียแลคติคเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดอินทรีย์และสารอื่นๆซึ่งส่งผลโดยตรงกับกลิ่น รสชาติและเนื้อสัมผัสของอาหารหมัก (Gonzalez *et al.*, 1994) ทั้งนี้กรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติคที่แบคทีเรียแลคติคสร้างขึ้นสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (Farias *et al.*, 1994) โดยปริมาณแบคทีเรียแลคติคเฉลี่ยที่พบในระหว่างการหมักของปลาร้าแต่ละสูตรเป็นดังนี้ $1.1x10^6$, $2.9x10^6$, $2.0x10^6$, $5.4x10^6$ และ $1.6x10^7$ ตามลำดับ




**รูปที่ 1** ปริมาณแบคทีเรียแลคติค (LAB) ในระหว่างการหมักปลาร้าทั้ง 5 สูตร

<u>หมายเหตุ</u> F1 = ปลาร้าสูตรที่ 1, F2 = ปลาร้าสูตรที่ 2, F3 = ปลาร้าสูตรที่ 3, F4 = ปลาร้าสูตรที่ 4
F5 = ปลาร้าสูตรที่ 5

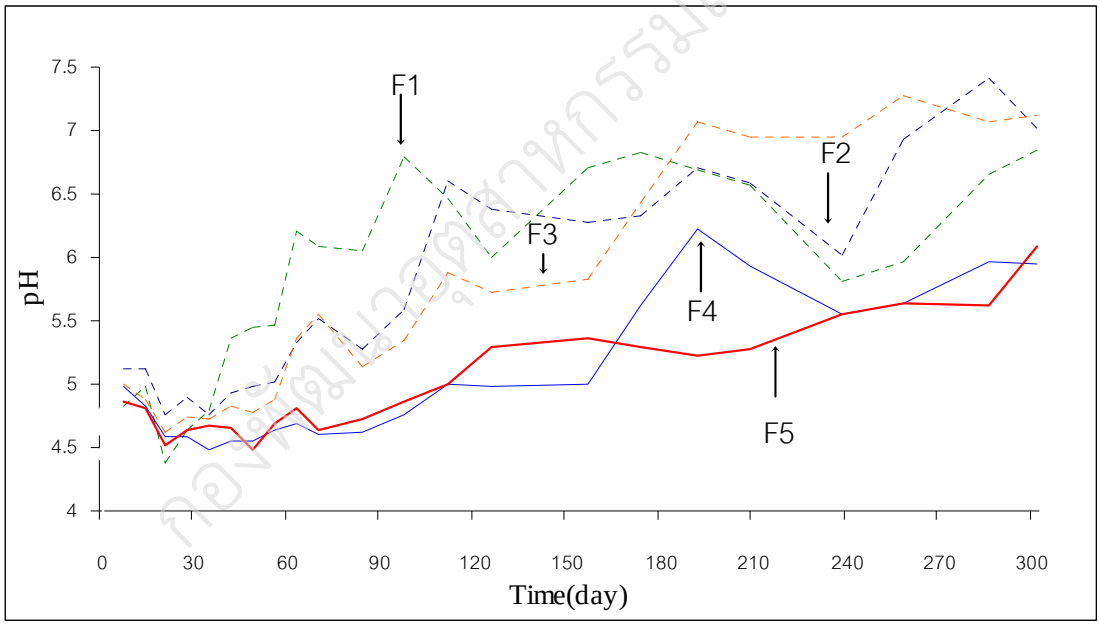



**รูปที่ 2** ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (TVC) ในระหว่างการหมักปลาร้าทั้ง 5 สูตร

กรมพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ

**2. ค่า pH ในระหว่างการหมักปลาร้า**

การเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการหมักปลาร้าแสดงดังรูปที่ 3 พบว่าช่วงเดือนแรก pH ในปลาร้าทุกสูตรจะลดลง เดือนต่อมาปลาร้าสูตรที่ 1 จะมีค่า pH เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงเดือนที่ 3 ในขณะที่ปลาร้าสูตรที่ 2 และ 3 ค่า pH จะค่อยๆเพิ่มขึ้นหลังจากเดือนที่ 2 ส่วนปลาร้าสูตรที่ 4 และ 5 ค่า pH ค่อนข้างจะคงที่ในช่วง 3 เดือนแรก หลังจากนั้น pH จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นทีละน้อยจนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก โดยค่า pH สุดท้ายของปลาร้าแต่ละสูตรเป็นดังนี้ 6.84, 7.03, 7.13, 5.96 และ 5.99 ตามลำดับ จากผลการศึกษาของพูลทรัพย์และคณะ (2543) พบว่าปลาร้าส่วนใหญ่จะมีค่า pH อยู่ในช่วงระหว่าง 5-6 ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่า ปลาร้าสูตรที่ 4 และ 5 มีค่า pH เป็นไปตามผลการศึกษาของพูลทรัพย์และคณะ (2543) เมื่อเปรียบเทียบค่า pH ของปลาร้าแต่ละสูตร พบว่าปลาร้าสูตรที่ 4 และ 5 ซึ่งเป็นการหมักแบบหมักหัวเชื้อก่อน สามารถรักษาระดับ pH ไว้ได้ต่ำกว่าปลาร้า 3 สูตรแรก ซึ่งเป็นการหมักแบบดั้งเดิม และค่อนข้างจะคงที่กว่าปลาร้าสูตรดั้งเดิม ซึ่งค่า pH ที่ต่ำจะมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอีกด้วย (Lewus *et al.*,1991)




**รูปที่ 3** การเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการหมักปลาร้าทั้ง 5 สูตร

**3. การทดสอบด้านประสาทสัมผัส**

ผลทดสอบด้านประสาทสัมผัส (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่าผู้ทดสอบชิมให้การยอมรับด้านลักษณะปรากฏ รสชาติ เนื้อสัมผัส และการยอมรับรวมของปลาร้าสูตรที่ 4 และ 5 มากกว่าปลาร้าสูตรที่ 1 และ 2 ซึ่งเป็นผลมาจากการหมักหัวเชื้อก่อน (รำหมักและข้าวฟ่างหมัก) จึงทำให้เกิดแบคทีเรียแลคติคขึ้นอย่างรวดเร็วและสร้างกรดอินทรีย์และสารอื่นๆที่ส่งผลดีต่อกลิ่น รสชาติและเนื้อสัมผัสของปลาร้า ซึ่งมีผล

ทำให้ปลาร้าสูตรที่ 4 และ 5 ได้รับคะแนนผ่านเกณฑ์ (คะแนนไม่ต่ำกว่า 6) ในคุณลักษณะทุกด้าน ตรงกันข้ามกับปลาร้าสูตรที่ 1 และ 2 ที่มีบางคุณลักษณะได้คะแนนต่ำกว่าเกณฑ์ คือปลาร้าสูตรที่ 1 ได้คะแนนทางด้านเนื้อสัมผัสต่ำกว่าเกณฑ์ และปลาร้าสูตรที่ 2 ได้คะแนนทางด้านรสชาติและการยอมรับรวมต่ำกว่าเกณฑ์ ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าปลาเป็ดสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักปลาร้าได้ และการหมักหัวเชื้อก่อนเป็นวิธีทางชีวภาพที่จะช่วยให้ปลาร้ามีคุณภาพที่ดีกว่าการหมักแบบดั้งเดิม ทั้งนี้คุณลักษณะที่ดีของปลาร้าควรเป็นดังนี้ ด้านลักษณะปรากฏควรมีผิวหนังคงรูป ไม่ฉีกขาด เนื้อปลาและน้ำเข้ากันพอดีไม่แห้งหรือเละจนเกินไป ด้านกลิ่นควรมีกลิ่นหอมของน้ำปลาและข้าวคั่ว ด้านรสชาติควรมีรสเค็มแต่มีความหวานของเนื้อปลา ด้านเนื้อสัมผัสเนื้อปลาควรจะนุ่มอยู่ในตัวปลา (พูลทรัพย์และคณะ, 2543)

**ตารางที่ 1** ผลการทดสอบด้านประสาทสัมผัสของปลาร้าทั้ง 5 สูตร

| คุณลักษณะ | สูตรที่ 1 | สูตรที่ 2 | สูตรที่ 4 | สูตรที่ 5 |
|---|---|---|---|---|
| ลักษณะปรากฏ ** | $6.00 \pm 1.20^{c}$ | $6.00 \pm 0.00^{c}$ | $8.67 \pm 0.49^{a}$ | $7.50 \pm 1.16^{b}$ |
| กลิ่น ns | $6.33 \pm 1.43$ | $6.33 \pm 1.43$ | $6.00 \pm 2.08$ | $7.00 \pm 2.25$ |
| รสชาติ ** | $6.33 \pm 2.53^{a}$ | $3.00 \pm 1.04^{b}$ | $6.33 \pm 1.43^{a}$ | $7.00 \pm 1.04^{a}$ |
| เนื้อสัมผัส ** | $5.33 \pm 0.98^{c}$ | $7.00 \pm 1.04^{b}$ | $8.00 \pm 1.04^{a}$ | $7.50 \pm 0.98^{ab}$ |
| การยอมรับรวม * | $6.00 \pm 1.70^{ab}$ | $5.67 \pm 1.43^{b}$ | $6.67 \pm 0.98^{ab}$ | $7.17 \pm 1.26^{a}$ |

<u>หมายเหตุ</u> ปลาร้าสูตรที่ 3 ไม่ได้นำมาทดสอบชิม เนื่องจากมีราขึ้น

อักษรที่เหมือนกันตามแนวนอนแสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

อักษรที่แตกต่างกันตามแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

** = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$)

* = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ns = ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ

**4. การจำแนกชนิดแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาร้าปลาเป็ด**

แยกแบคทีเรียแลคติคจากปลาร้าปลาเป็ดทั้ง 5 สูตรได้ 33 ไอโซเลต นำมาทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นพบว่าให้ผลเหมือนกันดังนี้ ย้อมติดสีแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างกลมและเรียงตัวเป็น 4 เซลล์ (Tetrad formation) ไม่สร้างเอนไซม์แคตตาเลส สร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคสแต่ไม่สร้างก๊าซ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10°C แต่ไม่เจริญที่ 45°C เจริญได้ที่ pH 9.6 แต่ไม่เจริญที่ pH 4.5 และสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือเข้มข้น 18 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคุณสมบัติเบื้องต้นดังกล่าวตรงกับแบคทีเรียสกุล *Tetragenococcus* sp. (Salminen and Wright, 1993) จึงได้เลือกตัวแทนจำนวน 3 ไอโซเลต มาทำการจำแนกชนิดโดยใช้ DNA เป็นเกณฑ์เพื่อเป็นการยืนยันโดยทำ 2 วิธีคือ Photobiotin labeling DNA-DNA hybridization และ Ribotyping of 16S rRNA gene ซึ่งทั้ง 2 วิธี ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน คือแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาร้าปลาเป็ดคือ *Tetragenococcus halophilus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกับแบคทีเรียที่พบมากในอาหารหมักที่มีเกลือสูง เช่น น้ำปลา หรือปลาร้า เป็นต้น (Jonganurakkun,1999) และ (Tanasupawat *et al*.,1998)

## สรุป

ปลาเป็ดเป็นสัตว์น้ำที่ยังไม่ได้ใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่แต่สามารถนำมาแปรรูปเป็นปลาร้าได้ เมื่อศึกษาเปรียบเทียบระหว่างวิธีการหมักปลาร้าแบบดั้งเดิม (สูตรที่ 1, 2 และ 3) กับการหมักแบบหมักหัวเชื้อก่อน (สูตรที่ 4 และ 5) พบว่าการหมักปลาร้าแบบหมักหัวเชื้อก่อนจะทำให้ได้ปลาร้าที่เป็นที่ยอมรับมากกว่าการหมักปลาร้าแบบดั้งเดิม เพราะทำให้เกิดปริมาณแบคทีเรียแลคติคซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการหมักในปริมาณที่สูง ซึ่งจะส่งผลต่อคุณภาพด้านลักษณะปรากฏ รสชาติและเนื้อสัมผัส จึงทำให้ได้รับการยอมรับดีกว่าวิธีการหมักแบบดั้งเดิม เมื่อทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่พบในระหว่างการหมักปลาร้าทั้ง 2 วิธีพบว่าเป็น *Tetragenococcus halophilus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบมากในอาหารหมักที่มีเกลือสูง

## คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ดร.รุจ วัลยะเสวี ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์ทางด้านอุปกรณ์และสถานที่ในการทำการวิจัยเกี่ยวกับเรื่องการจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยใช้ DNA เป็นเกณฑ์

## เอกสารอ้างอิง


กองเศรษฐกิจการประมง. 2541. สถิติผลผลิตสัตว์ทะเล ปี 2538. เอกสารฉบับที่ 4 / 2541. กลุ่มสถิติและสารสนเทศการประมง, กองเศรษฐกิจการประมง, กรมประมง. 53 หน้า.

ผ่องเพ็ญ รัตตกูล, ปรีดา เมธาทิพย์ และบุญส่ง ศิริมา. 2528. ปลาร้าสำเร็จรูป. ใน: รายงานประจำปี 2528. กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง. หน้า 162-174.

พูลทรัพย์ วิรุฬหกุล, จิราวรรณ แย้มประยูร และอมรรัตน์ สุขโข. 2542. ศึกษาเทคโนโลยีการผลิตปลาร้า. วารสารการประมง 52 (6): 580-585.

พูลทรัพย์ วิรุฬหกุล, จิราวรรณ แย้มประยูร, นิรชา วงษ์จินดา, ปรีดา เมธาทิพย์, ปรทิพย์ เกียรติกังวาฬไกรและอมรรัตน์ สุขโข. 2543. คุณภาพและความปลอดภัยของปลาร้า. วารสารการประมง 53 (4): 375-382.

แพรวพรรณ ห้องทองแดง. 2522. การศึกษาจุลชีวิทยาของอาหารหมักพื้นเมือง: ปลาร้า. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 122 หน้า.

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2536. การวางแผนและการวิเคราะห์ทางด้านประสาทสัมผัส. ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 275 หน้า.

อุดม สุนทรวิภาต และ อารีย์ วานิช. 2515. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของปลาร้าระหว่างการหมักดอง. รายงานผลการทดลอง. แผนกอุตสากรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง. หน้า 92-119.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. Official Method 981.12: pH of Acidified Foods. Official Methods of Analysis 16th ed., Arlington, VA.

Farias, M.E., De Ruiz Holgado, A.P. and F. Sesma. 1994. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheese : inhibition of foodborne pathogens. *J. Food Prot*. 57 : 1013-1015.

Gonzalez, B., Arca, P., Mayo, B. and J.E. Suarez. 1994. Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl. Environ. Microbial*. 60: 2158-2163.

Jonganurakkun, B. 1999. Identification of *Tetragenococcus halophilus* by Ribotyping of 16S rRNA gene. Bc. Thesis. Mahidol University, Bangkok. 55 pp.

Lewus, C.B., Kaiser, A. and T.J. Montrille. 1991. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocin from lactic acid bacteria iolated from meat. *Appl. Environ. Microbial*. 57: 1683-1688.

Ostergaard, A., Embarek, P.K.B., Wedell-Neergaard, C., Huss, H.H. and L. Gram. 1998. Characterization of anti-listerial lactic acid bacteria isolated from Thai fermented fish products. *Food Microbiol*. 15: 223-233.

Salminen, S. and A.V. Wright. (eds.). 1993. Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker Inc. New York. 442 pp.

Tanasupawat, S., Ekaki, T., Suzuki, K., Okata, S., Kamakata, K. and M. Kozaki. 1992. Characterization and Identification of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* strains from fermented foods in Thailand. *J. Gen. Appl. Microbiol*. 38: 121-134.

Tanasupawat, S., Okada, S. and K. Komagata. 1998. Lactic acid bacteria found in fermented fish in Thailand. *J. Gen. Appl. Microbiol*. 44: 193-200.