การศึกษาการผลิตปลาส้มจากวัสดุเศษเหลือในอุตสาหกรรมแปรรูปปลาส้มแบบครัวเรือน

Study of fermented fish (Plaa-som) production from by-product of Fermented fish household industry

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

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตปลาส้มจากวัสดุเศษเหลือในอุตสาหกรรมแปรรูปปลาส้มแบบครัวเรือน เตรียมปลาส้ม 4 สูตร โดยใช้หัวและโครงปลานิลสับ ข้าวเหนียวนึ่งสุก เกลือ และกระเทียมในอัตราส่วน 100:20:8:5 (สูตร 1) 100:20:8:10 (สูตร 2) 100:20:10:5 (สูตร 3) และ 100:20:10:10 (สูตร 4) หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 วัน พบว่า ปลาส้มสูตร 1, 2 และ 3 มีการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ ยกเว้นสูตร 4 เมื่อนำปลาส้มสูตร 4 มาตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียกรดแลกติก (ในสภาวะมีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน) แบคทีเรียก่อโรคคือเชื้อ *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, Coliforms, *Escherichia coli* และเชื้อ *Staphylococcus aureus* ตัวอ่อนของพยาธิตัวจี๊ด และตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ พบว่า ผลการวิเคราะห์ไม่พบจุลินทรีย์และพยาธิในทุกวิธีที่ตรวจ จากนั้นนำปลาส้มทำแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีพบว่า ค่า pH ปริมาณความชื้น ปริมาณกรดทั้งหมด โปรตีน ไขมัน แคลเซียม ฟอสฟอรัส และฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH มีค่าเป็น 4.80±0.11 และร้อยละ 5.12±0.23, 1.57±0.50, 25.15±0.54, 27.62±0.37, 1.82±0.37, 2.21±0.63 และ 69.42±0.35 ตามลำดับ

คำสำคัญ : ปลาส้ม, วัสดุเศษเหลือ, โครงปลา, ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

Abstract

The objective of this research was to study on quality of fermented fish (Plaa-som) from by-product of fermented fish household industry. Four formulations of Plaa-som were prepared from chopped head and fish frame of Nile tilapia, cooked glutinous rice, salt and garlic in the ratio of 100:20:8:5 (formula 1), 100:20:8:10 (formula 2), 100:20:10:5 (formula 3), and 100:20:10:10 (formula 4). All treatments were allowed to ferment for 60 days at room temperature. The results revealed that spoilage of fermented fish was found in formula 1, 2, and 3, except formula 4. Then the formula 4 of fermented fish was investigated for total plate count, lactic acid bacterial count (aerobic and anaerobic condition), pathogenic bacteria including *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium*

perfringens, Coliforms, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*, gnathostoma larvae and fluke metacercariae. It was found that all microorganisms and parasites were not detected from the formula 4 of fermented fish. The fermented fish was dried at 60°C and was analyzed for chemical quality. The pH value and moisture content, total titratable acidity, protein, fat, calcium, phosphorus, and antioxidant activity by DPPH assay of the fermented fish were 4.80+ 0.11, 5.12±0.23%, 1.57±0.50%, 25.15±0.54%, 27.62±0.37%, 1.82±0.37%, 2.21±0.63% and 9.42±0.35%, respectively.
Keywords: Plaa-som, By-products, Fish frame, Antioxidant activity by DPPH assay

บทนำ

การแปรรูปปลาแบบเชิงอุตสาหกรรม จะพบว่ามีชิ้นส่วนวัสดุเศษเหลือมากกว่าครึ่งหนึ่งของวัตถุดิบนำเข้าผลิต (Yongsawatdigul, 2013) สำหรับปลาส้มนั้นพบว่าในภาคอีสานมีการผลิตปีละประมาณ 1,170-1,352 ตัน (Chompuming *et al.,* 2009) ปัจจุบันการนำเฉพาะส่วนเนื้อปลาเข้าผลิตเป็นปลาส้มชิ้นเป็นที่นิยมมากขึ้นเนื่องจากสะดวกต่อการบริโภคจึงทำให้มีวัสดุเศษเหลือของปลามากขึ้น เศษเหลือที่เป็นหัวปลาขายเป็นอาหารสดในตลาดได้ 8-10 บาทต่อกิโลกรัมซึ่งเป็นราคาที่ต่ำมาก หากกลายเป็นขยะอินทรีย์ก็จะเป็นภาระที่มีค่าใช้จ่ายในการกำจัดทิ้ง การหาวิธีเปลี่ยนเศษเหลือทิ้งเหล่านี้ให้สามารถนำมารับประทานได้นั้นนอกจากจะช่วยลดปัญหามลภาวะจากขยะอินทรีย์แล้ว ยังเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มของวัสดุเศษเหลือจากปลาให้สูงขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มความมั่นคงทางอาหารโดยไม่ต้องเพิ่มผลผลิตด้วย

มีนักวิจัยหลายคณะได้สกัดวัสดุเศษเหลือจากปลาโดยการใช้สารละลายกรด เอนไซม์ และความร้อน ผลผลิตที่ได้เช่น สารสกัดที่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูกและการสะสมแคลเซียม สารสกัดคอลลาเจนสำหรับใช้ในการรักษาผู้ที่มีอาการข้อเสื่อมจากการขาดคอลลาเจน (Zhang *et al.,* 2011; Jodnak, 2013; Nie *et al.,* 2014; Mahboob *et al*., 2014; Kutako *et al.,* 2015) อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิตเพื่อสกัดสารสำคัญในลักษณะนี้ต้องอาศัยเทคโนโลยีที่มีความซับซ้อน และผลพลอยได้จากการผลิตอาจมีสารที่เป็นอันตรายได้เช่น พบสารก่อมะเร็งในซอสถั่วเหลืองที่ผลิตโดยการย่อยด้วยกรด (Laohakunjit *et al.,* 2011) กระบวนการหมักเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ช่วยสกัดสารสำคัญออกจากวัตถุดิบได้ และอาหารหมักจัดเป็นอาหารที่มั่นใจในความปลอดภัยและมีสารอาหารที่มีประโยชน์มากขึ้นกว่าเดิม จากรายงานของ Promchote (2017) พบว่า ปลาร้าซึ่งเป็นอาหารหมักพื้นเมืองของภาคอีสานนั้นมีสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นโปรตีนสายสั้นและกรดอะมิโนซึ่งเกิดจากกระบวนการย่อยสลายโปรตีนในปลาร้า สำหรับปลาส้มใช้เวลาหมักสั้นกว่าปลาร้าแต่มีรายงานว่าในผลิตภัณฑ์ปลาส้มมีการย่อยโปรตีนให้เป็นโปรตีนสายสั้นที่มีขนาดเล็กกว่า 1.3 kDa ได้ทั้งหมดที่เวลาการหมัก 120 ชั่วโมง (Chadong *et al.,* 2015) ในการหมักวัสดุเศษเหลือของปลาแบบปลาส้มจึงน่าจะมีโปรตีนสายสั้นที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้

ปลาส้มเป็นอาหารหมักพื้นเมืองของประเทศไทย ผลิตโดยหมักปลากับเกลือร้อยละ 3-8 ข้าวสุกร้อยละ 10-20 และกระเทียมร้อยละ 5-20 ปลาส้มสูตรปกติจะมีอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเพียง 6 วัน (Prachasitthisak *et al*., 2009: online) จากนั้นจะเริ่มเสื่อมเสีย แต่หากใช้วัสดุเศษเหลือของปลาที่ส่วนใหญ่

จะเป็นส่วนของกระดูกปลาซึ่งเป็นโครงสร้างแข็งนั้น ควรใช้เวลาหมักนานขึ้นเพื่อย่อยหรือสกัดสารสำคัญออกมาให้ได้มากที่สุด ปัจจัยสำคัญที่ช่วยถนอมอาหารปลาส้มคือปริมาณเกลือ (Jittrepotch *et al*., 2015) และกระเทียม การเพิ่มความเข้มข้นของเกลือให้สูงกว่าปลาส้มสูตรปกติคาดว่าจะช่วยลดปริมาณกระเทียมลงได้ และที่สำคัญคือยืดเวลาหมักให้นานขึ้น เนื่องจากเกลือมีบทบาทหลักในการคัดเลือกเชื้อที่ช่วยควบคุมสภาวะการหมัก ส่วนกระเทียมนั้นมีสารกลุ่มที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบเช่น สารอัลลิซิน อัลลิสแตติน กาลิซิน และอะโจอิน ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัสได้หลายชนิด (Limhang *et al*., 2016) มีรายงานว่ากระเทียมมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกในช่วงแรกของการหมักด้วย (Lim *et al.,* 2015) การศึกษาการผลิตปลาส้มจากวัสดุเศษเหลือของปลาที่ใช้ปริมาณเกลือและกระเทียมในอัตราส่วนที่ต่างกันนี้ จะทำให้ได้สูตรการหมักที่เหมาะสมสำหรับหมักเศษเหลือของปลาให้เป็นสารอาหารสำคัญได้มากขึ้น โดยต้องเป็นสูตรที่ไม่เกิดการเน่าเสียหรือปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ เพื่อให้ได้สูตรการผลิตที่สามารถนำไปต่อยอดเป็นอาหารทางเลือกที่ดีต่อสุขภาพและเกิดการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 การศึกษาสูตรการผลิตปลาส้มจากโครงปลา

2.1.1 นำปลานิลสดมาขอดเกล็ด ควักไส้ ตัดแต่งเอาส่วนที่เป็นเนื้อปลาออก นำหัวและโครงปลามาล้างน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 2 สับเพื่อย่อยชิ้นส่วนของหัวและโครงปลาให้มีขนาดประมาณ 2 เซนติเมตร

2.1.2 ผลิตปลาส้มโดยส่วนผสมหลักคือใช้หัวและโครงปลาสับ 1,000 กรัม ข้าวเหนียวนึ่งสุก 200 กรัม และแปรผันการใช้เกลือและกระเทียมโดยแบ่งออกเป็น 4 สูตร (Treatment) แต่ละสูตรแบ่งออกเป็น 3 ซ้ำ (Replication) ดังนี้

สูตร 1 เกลือ 80 กรัม กระเทียม 50 กรัม

สูตร 2 เกลือ 80 กรัม กระเทียม 100 กรัม

สูตร 3 เกลือ 100 กรัม กระเทียม 50 กรัม

สูตร 4 เกลือ 100 กรัม กระเทียม 100 กรัม

คลุกส่วนผสมให้เข้ากันทั่วถึงดี บรรจุส่วนผสมลงในขวดแก้วขนาด 16 ออนซ์ (450 กรัม) ให้เต็มก่อนปิดฝาให้สนิท หมักที่อุณหภูมิห้อง และตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาที่ระยะเวลาการหมัก 0, 7, 30, และ 60 วัน โดยตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดแบบ Standard plate count และนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติก (สภาวะมีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน) (AOAC, 2000; Chantharasophon *et al.,* 2010) เมื่อหมักครบ 60 วัน เลือกสูตรการหมักปลาส้มที่ไม่มีการเสื่อมเสียหรือการปนเปื้อนของเชื้อที่ไม่พึงประสงค์เพื่อตรวจวิเคราะห์ต่อไป

2.2 การตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรคและพยาธิในปลาส้มสูตรที่เลือก

2.2.1 วิเคราะห์แบคทีเรียก่อโรคประกอบด้วย *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, Coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ตามวิธีของ Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2000; Prachasitthisak *et al*., 2009: online)

2.2.2 ตรวจสอบตัวอ่อนของพยาธิตัวจี๊ด (Gnathostoma larvae) และตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ (Fluke metacercariae) ด้วยวิธี Press preparation (compression) technique (Prachasitthisak *et al.,* 2009: online) ทำซ้ำ 7 ครั้ง

2.3 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางทางเคมีของปลาส้มสูตรที่เลือก

นำปลาส้มสูตรที่เลือกมาอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียสด้วยตู้อบลมร้อนเป็นเวลา 48 ชั่วโมงหรือจนแห้งสนิท จากนั้นวิเคราะห์ค่า pH ค่าร้อยละของความชื้น กรดทั้งหมด โปรตีน ไขมัน แคลเซียม ฟอสฟอรัส และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH (Jodnak, 2013; Zheng *et al,* 2015)

2.4 การตรวจสอบลักษณะโครงสร้างสามมิติพื้นผิวของกระดูกปลาที่สึกกร่อนระดับจุลภาค

เลือกส่วนกระดูกปลาส้มที่เป็นส่วนของกระดูกสันหลังมาล้างทำความสะอาด อบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อตรวจดูลักษณะโครงสร้างสามมิติพื้นผิวของกระดูกปลาที่สึกกร่อนระดับจุลภาคเปรียบเทียบกับกระดูกปลาที่ไม่ผ่านการหมัก โดยใช้กล้องจุลทรรศอิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM; รุ่น JSM 5410LV; JEOL Ltd., Japan)

2.5 การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ: วางแผนการทดลองผลิตปลาส้ม 4 สูตรแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยผลการตรวจทางจุลชีววิทยาของปลาส้ม 4 สูตรที่ระยะเวลาการหมัก 0, 7 และ 30 วัน ด้วยวิธี One-way ANOVA และ Duncan's new multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $P<0.05$ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยคุณภาพทางทางเคมีของปลาส้มสูตร 4 ก่อนการหมักและหลังการหมักด้วยวิธี Independent t-test

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

3.1 ผลการศึกษาสูตรการผลิตปลาส้มจากโครงปลา

ผลิตปลาส้มจากหัวและโครงปลาสับที่ใช้เกลือและกระเทียมระดับต่างกัน 4 สูตร และตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาที่ระยะเวลาการหมัก 0, 7, 30, และ 60 วัน โดยที่เวลาเริ่มต้นก่อนการหมัก พบว่าปลาส้มทุกสูตรมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกทั้งในสภาวะมีและไม่มีออกซิเจนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อหมักเป็นเวลา 7 วัน พบว่าปลาส้มทุกสูตรมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ขณะที่จำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกในสภาวะมีและไม่มีออกซิเจนของปลาส้มสูตร 4 มีค่าสูงสุดและแตกต่างจากเกือบทุกสูตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ($P<0.05$) (Table 1) ปลาส้มทั้ง 4 สูตรที่ศึกษาครั้งนี้ใช้กระเทียมในปริมาณที่ต่ำกว่าสูตรปกติ 2-4 เท่า และสูตร 3 และ 4 ใช้เกลือสูงกว่าสูตรปกติ ปริมาณเกลือที่สูงขึ้นจะช่วยลดค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ (Aw) ได้มากขึ้น (Iamkampang, 2016) และคัดเลือกเชื้อที่ส่งเสริมการหมักหัวและโครงปลาซึ่งเป็นส่วนโครงสร้างแข็ง สำหรับกระเทียมนั้นใช้ลดลงเพราะมีราคาสูง แต่ยังคงใช้อยู่เพื่อจะได้มีบทบาทร่วมกับเกลือในช่วงแรกของการหมักที่กระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติก (Lim *et al.,* 2015) ปลาส้มสูตร 4 เป็นสูตรที่ใช้เกลือสูงและกระเทียมสูงกว่าทุกสูตร และเป็นสูตรที่พบแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีบทบาทสำคัญในการหมักสูงกว่าทุกสูตรที่เวลา 7 วันของการหมัก จะเห็นได้ว่าระดับเกลือและกระเทียมที่เหมาะสมกับลักษณะของวัตถุดิบสามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกให้สูงขึ้นได้ในช่วงแรกของการหมัก (Lim *et al.,* 2015) และส่งผลให้

เกิดกระบวนการย่อยสลายโครงสร้างแข็งให้เปลี่ยนเป็นสารอาหารที่ร่างกายดูดซึมไปใช้ได้ง่าย และการสร้างสารอาหารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากขึ้นในลำดับต่อไป

Table 1 Total plate count (TPC) and Lactic acid bacteria count at aerobic (LAB) and anaerobic conditions (LAB-an) of Plaa-som which were fermented for 60 days in 4 formulas

Methods	Time (Days)	Viable cell counts of Plaa-som (CFU/g)			
		Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4
TPC	0	$1.21\pm0.13\times10^{4a}$	$8.62\pm1.10\times10^{3a}$	$7.24\pm0.31\times10^{3a}$	$3.17\pm0.11\times10^{3a}$
	7	$1.83\pm0.62\times10^{8a}$	$6.24\pm1.66\times10^{7b}$	$9.47\pm2.20\times10^{7c}$	$1.67\pm0.34\times10^{7d}$
	30	$4.30\pm0.98\times10^{5a}$	$6.07\pm0.33\times10^{5a}$	$3.7\pm0.56\times10^{5a}$	$3.83\pm0.71\times10^{5a}$
	60	ND	ND	ND	0
LAB	0	<10	<10	<10	<10
	7	$2.06\pm0.68\times10^{7a}$	$1.18\pm0.23\times10^{7a}$	$3.74\pm1.75\times10^{7b}$	$4.83\pm1.0\times10^{7c}$
	30	$8.53\pm1.12\times10^{4a}$	$6.97\pm0.58\times10^{5a}$	$7.83\pm0.12\times10^{5a}$	$7.5\pm1.59\times10^{5a}$
	60	ND	ND	ND	0
LAB-an	0	<10	<10	<10	<10
	7	$5.57\pm0.85\times10^{5ab}$	$4.80\pm1.55\times10^{5a}$	$5.60\pm1.55\times10^{5ab}$	$6.60\pm0.62\times10^{5b}$
	30	$1.59\pm0.75\times10^{3a}$	$6.37\pm1.34\times10^{4a}$	$4.10\pm0.26\times10^{4a}$	$4.60\pm0.92\times10^{4a}$
	60	ND	ND	ND	0

Data expressed as mean±SD (n=3)

[a, b, c, d] Means with different superscript in same row are significantly different ($p<0.05$)

ND = Not determined

ที่เวลา 30 วันของการหมัก พบว่าปลาส้มทุกสูตรมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกทั้งในสภาวะมีและไม่มีออกซิเจนที่ลดลงแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่เวลา 60 วันของการหมัก พบว่าปลาส้มสูตร 1, 2 และ 3 มีการปนเปื้อนของเชื้อราบนผิวหน้าผลิตภัณฑ์ (Table 1) ดังนั้นจึงไม่มีการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกทั้งในสภาวะมีและไม่มีออกซิเจนเนื่องจากผลิตภัณฑ์เสื่อมเสีย ขณะที่ปลาส้มสูตร 4 ไม่มีเชื้อราปนเปื้อน จึงเลือกสูตร 4 ไปตรวจวิเคราะห์แต่ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์บนจานเพาะเชื้อทั้ง 3 วิธี (Table 1) ซึ่งคาดว่าผลที่ได้นี้เป็นผลลบปลอม (Negative false) ทั้งนี้จากการวิจัยของ Chadong *et al.* (2015) รายงานว่าในปลาส้มมีโปรตีนที่เป็นเปปไทด์สายสั้น ซึ่งสามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายอย่าง (Armin and Marzieh, 2018) เช่น ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และในปลาส้มสูตร 4 น่าจะมีปริมาณเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ จึงทำให้ตรวจไม่พบจุลินทรีย์ในวิธีที่เลือกใช้ แต่เมื่อคณะผู้วิจัยได้ทดสอบโดยการเพาะเชื้อ 1 loop-ful ในอาหารเหลวสูตร Nutrient ก็พบว่ามีการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเหลวดังกล่าว แสดงว่าในปลาส้มสูตร 4 ไม่ได้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ เพียงจุลินทรีย์ที่มีนั้นไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ตรวจวิเคราะห์ จากรายงานของ Jodnak

(2013) Nie *et al.* (2014) และ Slizytea *et al.* (2016) ยังพบว่า โปรตีนสายสั้นที่สกัดได้จากเศษเหลือทิ้งของปลาสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูกและ เพิ่มการสะสมแคลเซียมของเซลล์สร้างกระดูก สามารถลดน้ำตาลในเลือด และมีสมบัติของการต่อต้านสารอนุมูลอิสระ การศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าปลาส้มสูตร 1-3 ที่ใช้เกลือและ/หรือกระเทียมต่ำกว่าสูตร 4 ไม่สามารถหมักในระยะเวลานานถึง 60 วันผลิตภัณฑ์ก็เกิดการเสื่อมเสีย แสดงว่าทั้งชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ที่เจริญในสูตร 1-3 มีความแตกต่างจากของสูตร 4 ผลผลิตที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักจึงมีความแตกต่างกันการเสื่อมเสียก็ต่างกันด้วย ดังนั้นในกระบวนการหมักปลาส้มจากวัสดุเศษเหลือจากปลานั้นต้องใช้ปริมาณเกลือและกระเทียมที่เหมาะสม จึงจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีการเสื่อมเสียหรือมีเชื้อที่ไม่พึงประสงค์เจริญขึ้นมาบนผลิตภัณฑ์ และจะเห็นได้ว่าเกลือและกระเทียมนั้นมีผลทำงานร่วมกันในกระบวนการหมักตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุดกระบวนการหมักปลาส้มจากวัสดุเศษเหลือของปลา และการที่ปลาส้มสูตร 4 ได้ใช้เวลาในกระบวนการหมักนาน 60 วัน เนื่องจากคาดว่าเป็นระยะการหมักที่เข้าสู่สภาวะคงที่และทำให้เกิดการย่อยสารอาหารจากโครงปลาให้เปลี่ยนเป็นสารสำคัญที่มีมูลค่าสูงได้ ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Wanga *et al.* (2017) ที่หมัก Suanyu โดยนำปลาน้ำจืดหมักกับข้าวสุก เกลือ และเครื่องเทศนาน 1 เดือนขึ้นไปจะได้ปลาหมักที่มีกลิ่นและรสชาติที่ดีจากการย่อยสลายของโปรตีนในปลาออกมาเป็นเปปไทด์และกรดอะมิโน ดังนั้นจึงเลือกปลาส้มสูตร 4 เพื่อตรวจวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3.2 ผลการตรวจเชื้อก่อโรค พยาธิ คุณภาพทางเคมีของปลาส้มสูตร 4

หลังจากหมักปลาส้มสูตร 4 เป็นเวลา 60 วัน ตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella* spp., *Bacillus cereus, Clostridium perfringens, Coliforms, Escherichia coli, Staphylococcus aureus* และไม่พบตัวอ่อนของพยาธิตัวจี๊ด และตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ ผลการตรวจเชื้อก่อโรคและพยาธิดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Singh *et al.* (2015) ที่รายงานว่า เปปไทด์สายสั้นที่ได้จากการหมักนมถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* C2 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* (12±0.57 mm.) เชื้อ *Listeria monocytogenous* (10±0.57 mm.) และเชื้อ *Bacillis cereus* (10±0.57 mm.) และปลาส้มที่หมักจนได้ที่แล้วจะไม่พบพยาธิตัวจี๊ด และตัวอ่อนระยะติดต่อของพยาธิใบไม้ (Prachasitthisak *et al.*, 2009: online)

3.3 ผลการวิเคราะห์คุณภาพปลาส้มทางเคมี

หลังจากหมักปลาส้มสูตร 4 เป็นเวลา 60 วัน อบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียสจนแห้งสนิท วิเคราะห์คุณภาพทางเคมี พบว่า ปลาส้มสูตร 4 มีค่า pH ปริมาณกรดทั้งหมด และฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH แตกต่างจากก่อนการหมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Table 2) ในขณะที่ค่าร้อยละของความชื้น โปรตีน ไขมัน แคลเซียม และฟอสฟอรัสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Table 2) ค่า pH และปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นอย่างแตกต่างนี้บ่งชี้ว่ามีกระบวนการหมักวัสดุเศษเหลือจากปลาแบบปลาส้ม และพบสารที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชมากขึ้นโดยเห็นได้จากค่าฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ที่เพิ่มจากร้อยละ 39.02±1.10 เป็นร้อยละ 69.42±0.35 ซึ่งสูงขึ้นร้อยละ 77.9 โดยคาดว่าสารที่ออกฤทธิ์ดังกล่าวอาจจะเป็นกลุ่มเปปไทด์สายสั้นที่ได้จากการหมักย่อยโปรตีนในวัสดุเศษเหลือจากปลาสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Wu *et al.* (2017) ที่ทดลองใช้แบคทีเรียผลิตโปรตีเอสหมักเศษเหลือทิ้งจากปลาแซลมอล และ

พบว่าไฮโดรไลเสตเปปไทด์จากส่วนที่เป็นเนื้อปลาให้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH เป็นร้อยละ 74.06±1.14 ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ แต่การสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่เศษเหลือของปลาในแง่ของการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระนี้คุ้มค่ากว่าการสกัดจากเนื้อปลา

Table 2 pH value, moisture, acidity, protein, fat, ash, Calcium, Phosphorus, and %DPPH Inhibition of Plaa-som (formula 4) which was fermented for 60 days

Parameters	At day 0 of fermentation	At day 60 of fermentation
pH	6.52±0.21[a]	4.80±0.11[b]
Moisture content (%)	5.31±0.10[a]	5.12±0.23[a]
Acidity (%)	0.0[a]	1.57±0.50[b]
Protein (%)	25.88±0.22[a]	25.15±0.54[a]
Fat (%)	29.39±0.65[a]	27.62±0.37[a]
Calcium (%)	0.89±0.3[a]	1.82±0.37[a]
Phosphorus (%)	3.36±0.25[a]	2.21±0.63[a]
%DPPH Inhibition	39.02±1.10[a]	69.42±0.35[b]

[ab] Means with different superscript in same row are significantly different ($p<0.05$)

3.4 ผลการตรวจสอบลักษณะโครงสร้างสามมิติพื้นผิวของกระดูกปลาที่สึกกร่อนระดับจุลภาค

เลือกส่วนกระดูกปลาส้มที่เป็นส่วนของกระดูกสันหลังมาล้างทำความสะอาด อบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาคของพื้นผิวกระดูกปลาส้มโดยใช้กล้องจุลทรรศอิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่า ลักษณะโครงสร้างสามมิติของพื้นผิวกระดูกปลาที่เป็นกลุ่มควบคุม คือ กระดูกปลาก่อนการหมักนั้น มีพื้นผิวของกระดูกที่เรียบ (Fig. 1: a, b) ในขณะที่ลักษณะโครงสร้างสามมิติพื้นผิวของกระดูกปลาที่ผ่านการหมักเป็นเวลา 60 วัน มีพื้นผิวของกระดูกที่สึกกร่อน (Fig. 1: c, d) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการสึกกร่อนของโครงสร้างในระดับจุลภาคของพื้นผิวกระดูกปลาที่ผ่านการหมัก และยืนยันผลการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมที่เพิ่มจากร้อยละ 0.89±0.33 เป็นร้อยละ 1.82±0.37 (Table 2) ซึ่งบ่งชี้ว่ากระบวนการหมักปลาส้มที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทำให้เกิดการย่อยสลายโครงสร้างแข็งของกระดูกปลาได้ และคาดว่าเป็นการทำให้แคลเซียมที่เดิมเป็นโครงสร้างแข็งจะละลายออกมาเป็นแคลเซียมที่ร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้ได้มากขึ้นไม่ว่าจะเป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูกและการสะสมแคลเซียม

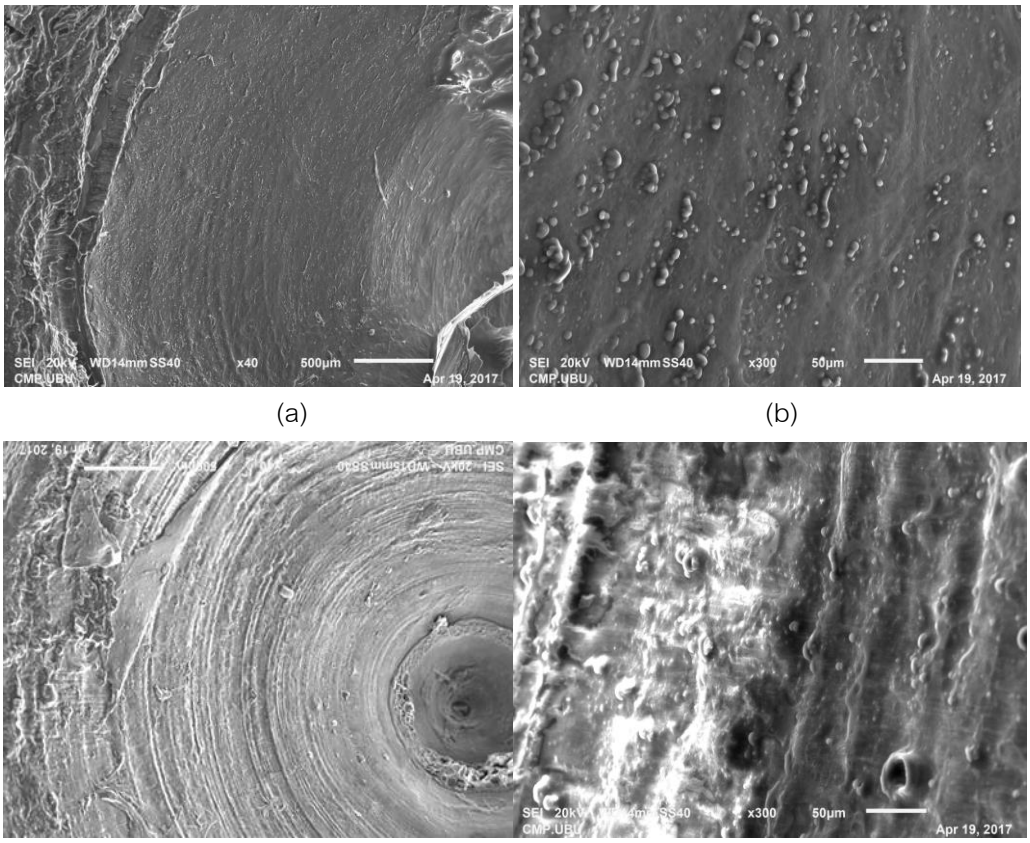

Fig. 1: Scanning electron microscopy of Tilapia fish bone before the fermentation of Plaa-som (a, b) and after 60 days of the fermentation of Plaa-som (c, d) Bar: 500 µ x40 (a, c) and 50 µ x300 (b, d)

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สูตรการผลิตปลาส้มจากเศษเหลือทิ้งของปลาที่ใช้โครงปลานิลสับต่อข้าวเหนียวนึ่งสุกต่อเกลือต่อกระเทียมในอัตราส่วน 100:20:10:10 หมักนาน 60 วัน เป็นสูตรที่เหมาะสมสำหรับหมักเศษเหลือของปลา เนื่องจากไม่เกิดการเน่าเสียหรือปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ และเป็นสูตรที่ให้สารที่ออกฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH สูงถึงร้อยละ 69.42±0.35 ซึ่งควรศึกษาต่อไปว่าเป็นการออกฤทธิ์ของสารใด และใช้เป็นจุดขายในการพัฒนาเป็นอาหารทางเลือกเพื่อสุขภาพต่อไป

เอกสารอ้างอิง

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 17th Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.

Armin, M.K., and Marzieh, M-N. 2018. BioActive peptides derived from fish by-product collagen. International Journal of Environmental Science Natural Resources. 13(2): 555-859.

Chadong, K, Yunchalard, S., and Piyatheerawong, W. 2015. Physicochemical characteristics and protein degradation during fermentation of Plaa-som, A traditional fermented fish product of North-Eastern Thailand. Indian Journal of Traditional Knowledge. 14(2): 220-225.

Chantharasophon, K., Moonsin, P., and Prawitthana, S. 2010. The potential of using and producing selective *Bacillus* sp. and *Saccharomyces* sp. from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) gastrointestinal flora as probiotics. Full report, Ubon Ratchathani Rajabhat University. 116 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. Full report, Maejo University Phrae Campus. 112 p. [in Thai]

Iamkampang, P. 2016. Effect of salt on fermentation and sensory characteristics of Kung-Jom. The journal of KMUTNB. 26(1): 105-112. [in Thai]

Jittrepotch, N., Rojsuntornkitti, K. and Kongbangkerd, T. 2015. Physico-chemical and sensory properties of Plaa-som, a Thai fermented fish product prepared by using low sodium chloride substitutes. International Food Research Journal. 22(2): 721-730.

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

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]

Laohakunjit, N., Phetaveeporndet, P., Kerdchoechuen, O., and Ratanakhanokchai, K. 2011. Flavoring agent produced from mungbean meal by protease. KMUTT Research and Development Journal. 34(2): 129-145.

Lim, S.B., Shin, SY., Moon, J.S., Otgonbayar, G., Joo, W., Lee, S.J., Jeon, C.O., and Han, N.S. 2015. Garlic is a source of major lactic acid bacteria for early-stage fermentation of cabbage-kimchi. Food Science and Biotechnology. 24(4): 1437–1441.

Limhang, K., Hiranvattanasuk, J., and Inthawat, M. (2016). Effect of garlic extract on inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi*. Khon Kaen Agriculture Journal. 44(SUPPL. 1): 650-655. [in Thai]

Mahboob, S., Haider, S., Sultana, S., Al-Ghanim, K.A., Al-Misned, F., Al-Balawi, H.F.A., and Ahmad, Z. 2014. Isolation and characterization of collagen from the waste material of two important freshwater fish species. The Journal of Animal & Plant Sciences. 24(6): 1802-1810.

Nie, R., Liu, Y., and Liu, Z. 2014. The calcium-binding activity of fish scale protein hydrolysates. Journal of Agricultural Chemistry and Environment. 3(1B): 11-15.

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]

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]

Slizytea, R., Rommib, K., Mozuraitytea, R., Eckc, P., Fived, K., and Rustad T. 2016. Bioactivities of fish protein hydrolysates from defatted salmon backbones. Biotechnology Reports. 11: 99-109.

Wanga, W., Xiaa, W., Gaoa, P., Xua, Y., and Jiang, Q. 2017. Proteolysis during fermentation of Suanyu as a traditional fermented fish product of China. International Journal of Food Properties. 20: S166–S176.

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 byproducts with bacterial extracellular proteases. Marine drugs. 15(4): 1-19.

Yongsawatdigul, J. 2013. Utilization of fishery byproducts for gel-enhancing agent and ACE inhibitory and antioxidant peptides. Complete Research Report, Suranaree University of Technology. 91 p. [in Thai]

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.

Zheng, M., Xia, Q., and Lu, S. 2015. Study on drying methods and their influence on effective component of loquat flower tea. Journal of LWT-Food Science and Technology. 63: 14-20.