



## รายงานฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การพัฒนากระบวนการผลิตปลาร้าเพื่อเพิ่มอัตรา  
การผลิตและสร้างอัตลักษณ์ของผลิตภัณฑ์

(ภาษาอังกฤษ) Development of Salty Fermented Fish or Plara  
production process for increasing production rate, and for value  
adding and product identity

โดย รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา และคณะ

เมษายน พ.ศ. 2560

สัญญาเลขที่ RDG5950116

## รายงานฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) การพัฒนากระบวนการผลิตปลาร้าเพื่อเพิ่มอัตรา  
การผลิตและสร้างอัตลักษณ์ของผลิตภัณฑ์

(ภาษาอังกฤษ) Development of Salty Fermented Fish or Plara  
production process for increasing production rate, and for value  
adding and product identity

| คณะผู้วิจัย |                               | สังกัด                                                                                                                                                       |
|-------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.          | รศ.ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา | ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์<br>จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย                                                                                             |
| 2.          | ผศ.ดร. ปรรัตน์ ศุภมิตรโยธิน   | โปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหาร<br>คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏ<br>นครราชสีมา                                                     |
| 3.          | อ.ดร. ชื่นจิต จันทจรูญพงษ์    | ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนาการ คณะ<br>ทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร<br>มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ<br>มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี |
| 4.          | อ. อัจฉริยา สุริยา            | สาขาวิชาอาหารและบริการ คณะเทคโนโลยี<br>มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี                                                                                             |
| 5.          | อ.ดร. ศานต์ เศรษฐชัยมงคล      | ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์<br>จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย                                                                                             |

ชุดโครงการ “การพัฒนาอุตสาหกรรมขนาดกลางและขนาดย่อม” ปีงบประมาณ 2559

สนับสนุนโดย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานฉบับนี้เป็นของผู้วิจัย วช. - สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## บทสรุปผู้บริหาร

ชื่อโครงการวิจัย: การพัฒนากระบวนการผลิตปลาร้าเพื่อเพิ่มอัตราการผลิตและสร้างอัตลักษณ์ของผลิตภัณฑ์

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย: รศ.ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา

ปีที่ดำเนินการ: 2559

แหล่งทุน: ชุดโครงการ “การพัฒนาอุตสาหกรรมขนาดกลางและขนาดย่อม” ปีงบประมาณ 2559 สนับสนุนโดย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตปลาร้าสำหรับเร่งการหมักปลาร้าด้วยการใช้กล้าเชื้อที่คัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์แอโรบิกที่มีประสิทธิภาพ ให้สามารถช่วยลดระยะเวลาในกระบวนการหมักได้ถึงร้อยละ 50 แต่ยังคงไว้ซึ่งคุณภาพและอัตลักษณ์ด้านกลิ่นรสดั้งเดิมมากที่สุด กิจกรรมทั้งหมดดำเนินการภายใต้เครือข่ายนักวิจัยจาก 4 สถาบัน ใน 6 เขตพื้นที่หลักในการผลิตปลาร้าของภาคอีสาน โดยแบ่งเป็น 5 ขั้นตอนคือ (1) สืบค้นข้อมูลและเก็บตัวอย่างปลาร้า (2) ศึกษาอัตลักษณ์ของปลาร้าและรูปแบบการหมักของจุลินทรีย์ (3) พัฒนากล้าเชื้อจำเพาะในรูปแบบพร้อมใช้ที่สามารถเติมลงในระบบการหมักได้โดยตรง (4) การทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อในการหมักปลาร้าและคุณภาพของปลาร้าที่ได้ (5) พัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่จากปลาร้าที่ผลิตจากการหมักด้วยกล้าเชื้อ

### สรุปผลการวิจัย

#### 1. สืบค้นข้อมูลและเก็บตัวอย่างปลาร้า

การสืบค้นข้อมูลการผลิตปลาร้า ดำเนินการภายใต้เครือข่ายนักวิจัยจาก 4 สถาบัน ใน 6 เขตพื้นที่ที่ผลิตปลาร้าในภาคอีสาน ได้แก่ จังหวัดอุดรธานี หนองคาย นครพนม สกลนคร นครราชสีมา และชัยภูมิ สืบค้นข้อมูลและเก็บตัวอย่างปลาร้าโดยนักวิจัยในพื้นที่ลงพื้นที่สำรวจผู้ผลิตเพื่อรวบรวมข้อมูลเบื้องต้นและเลือกพื้นที่ผลิตและผู้ประกอบการเป้าหมายที่สามารถใช้เป็นตัวแทนปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตที่ต้องการศึกษาได้ และในช่วงที่สองนักวิจัยจากส่วนกลางจะร่วมลงพื้นที่เพื่อสำรวจกระบวนการผลิต เก็บตัวอย่าง และสัมภาษณ์ผู้ประกอบการเพื่อเก็บข้อมูลเชิงลึก

ผลการสำรวจพบว่าการผลิตปลาร้าในพื้นที่ที่มีลักษณะทางภูมิศาสตร์ใกล้เคียงกัน ใช้วัตถุดิบจากแหล่งเดียวกัน จะมีรูปแบบการผลิตที่เหมือนกัน และปลาร้าที่ได้จะมีอัตลักษณ์ใกล้เคียงกัน โดยพบว่า การผลิตปลาร้าในพื้นที่จังหวัดอุดรธานีคล้ายกับจังหวัดหนองคาย จังหวัดนครพนมคล้ายกับจังหวัดสกลนคร และจังหวัดนครราชสีมาคล้ายกับจังหวัดชัยภูมิ กระบวนการผลิตที่พบแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ ได้แก่ การหมักแบบแห้ง (Solid state fermentation, SSF) แบบทั่วไป การหมักแบบแห้ง (Solid state fermentation, SSF) แบบเกลือสูง และการหมักแบบเติมน้ำ (Submerge state fermentation, SMF)

## 2. ศึกษาอัตลักษณ์ของปลาร้าและรูปแบบการหมักของจุลินทรีย์

โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ของตัวอย่างปลาร้า และวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวโมเลกุล เพื่อระบุอัตลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ที่สัมพันธ์กับกระบวนการผลิตในเขตพื้นที่เฉพาะ ผลการศึกษาพบว่า

### 2.1. อัตลักษณ์ของปลาร้า

สมบัติที่สามารถใช้บ่งชี้อัตลักษณ์ของปลาร้า ได้แก่ สมบัติทางเคมีและกายภาพ และองค์ประกอบของสารระเหย ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กับพื้นที่การผลิตและกระบวนการผลิตประกอบด้วย

#### 2.1.1. สมบัติทางเคมีและกายภาพของปลาร้ามีความแตกต่างอย่างชัดเจนที่สามารถบ่งชี้อัต

ลักษณ์ของปลาร้าได้ คือ ปริมาณเกลือ (ความเค็ม) และปริมาณรำที่ใช้ (ไฟเบอร์) โดยพบว่า

2.1.1.1. ปลาร้าหมักแบบแห้ง (Solid state fermentation, SSF) แบบทั่วไป ที่พบในจังหวัดอุดรธานีและจังหวัดหนองคาย จะมีเกลือความเข้มข้นโดยเฉลี่ยที่ร้อยละ 25 หากเป็นปลาร้าตัวเนื้อปลาไม่มีสีแดงตัวปลาไม่ยุบน้ำปลาร้ามีสีเข้มเนื่องจากหมักนาน หากเป็นปลาร้ารวมน้ำปลาร้ามีสีเข้มและเนื้อปลาอยู่

2.1.1.2. ปลาร้าหมักแบบแห้ง (Solid state fermentation, SSF) แบบเกลือสูง ซึ่งเป็นกระบวนการผลิตที่พบโดยทั่วไปในพื้นที่จังหวัดสกลนครและนครพนม จะมีเกลือความเข้มข้นโดยเฉลี่ยที่มากกว่าร้อยละ 30 ปลาร้ารวมเนื้อปลาไม่มีสีแดงเนื้อปลาอยู่ น้ำปลาร้ามีสีเข้มเนื่องจากการหมักเป็นเวลานาน

2.1.1.3. ปลาร้าหมักแบบเติมน้ำ (Submerge state fermentation, SMF) ซึ่งเป็นกระบวนการผลิตที่พบโดยทั่วไปในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดชัยภูมิ จะมี



เกลือความเข้มข้นโดยเฉลี่ยที่ต่ำที่สุดคือร้อยละ 20 มีไฟเบอร์สูง ตัวปลาามีสีแดงตัวปลาไม่ยุบ น้ำปลาร้ามีสีเข้มเนื่องจากสีของรำคั่ว

#### 2.1.2. องค์ประกอบของสารระเหยที่บ่งชี้เอกลักษณ์ด้านกลิ่นของปลาร้าพบว่าปลาร้าที่มี

คุณภาพดีทุกรูปแบบการผลิต คือ ปลาร้าที่มีกลิ่นหอมจากสารเมตาบอไลต์ในกลุ่มของกรด butanoic และอนุพันธ์ของกรดดังกล่าว เช่น ethylbutanoate และ 3-methylbutanoate โดยพบว่าสัดส่วนของสารระเหยที่พบในปลาร้าที่ผลิตจากแต่ละรูปแบบจะมีความแตกต่างกัน

#### 2.2. รูปแบบการหมักของจุลินทรีย์

ผลจากการศึกษาที่พบบ่งชี้ได้ว่า ในระบบการหมักปลาร้าทุกรูปแบบ กระบวนการหมักจะเริ่มต้นด้วยกระบวนการ auto-fermentation โดยจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันคือ *Halanaerobium* spp. และ *Lentibacillus* spp. โดยกิจกรรมของ *Halanaerobium* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดสารกลุ่มซัลไฟด์ทำให้ปลาร้ามีสีดำและกลิ่นฉุนของสารกลุ่มซัลไฟด์ พร้อมกับการแสดงกิจกรรมของ *Lentibacillus* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำให้เนื้อปลาร้าเริ่มมีสีแดง และหลังกระบวนการ auto-fermentation จุลินทรีย์อื่น ๆ จะสามารถเพิ่มจำนวน ได้แก่ *Bacillus* และ lactic acid bacteria ที่เป็นจุลินทรีย์เฉพาะถิ่น (แบคทีเรียออโตโคโนส) รวมถึงจุลินทรีย์ที่สร้างสารให้สีแดงซึ่งสามารถเจริญได้ดีในสภาวะการหมักของแต่ละรูปแบบร่วมดำเนินการหมักซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการสร้างกลิ่นรสในปลาร้าให้มีความซับซ้อนและเป็นอัตลักษณ์มากยิ่งขึ้น

ข้อมูลที่สังเคราะห์ได้จึงนำมาใช้เป็นแนวทางในการออกแบบกระบวนการหมักและพัฒนาการค้าเชื้อจุลินทรีย์สำหรับเร่งการหมักปลาร้า

### 3. การพัฒนาการค้าเชื้อเฉพาะในรูปแบบพร้อมใช้ที่สามารถเติมลงในระบบการหมักได้โดยตรง

#### 3.1. การออกแบบกระบวนการหมักปลาร้า

ในการออกแบบกระบวนการหมักแบบใช้กล้าเชื้อ โดยอาศัยข้อมูลจากการศึกษาการแสดงออกทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ในชุมชนการหมักปลาร้า ออกแบบกระบวนการหมักโดยการหมักด้วยกล้าเชื้อให้แสดงกิจกรรมร่วมกับจุลินทรีย์ที่เป็น predominant ในระบบการหมัก เป็นแบบการหมัก 2 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 การหมักแบบ auto-fermentation โดยการเตรียมปลาร้าตามรูปแบบที่ผลิต ปล่อยให้เกิดกระบวนการหมักแบบ auto-fermentation ด้วย *Halanaerobium* spp.

และ *Lentibacillus* spp. เป็นระยะเวลาหนึ่งเพื่อให้ย่อยโปรตีนเป็นกรดอะมิโนที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นใช้ในการเจริญต่อไปได้ และเพื่อให้สร้างสารกลุ่ม sulfide

### ขั้นตอนที่ 2 การหมักด้วยกล้าเชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการพัฒนาเป็นกล้าเชื้อเร่งหมักปลาร้าจุลินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ กล้าเชื้อออโตโคโนส คือ พัฒนาจากจุลินทรีย์หลักที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักแต่ละรูปแบบเพื่อให้สร้างกลิ่นรสที่เป็นอัตลักษณ์ และกล้าเชื้อเร่งสีและกลิ่นโดยพัฒนาจากจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากปลาร้าที่สร้างสารให้กลิ่นรสเฉพาะในปลาร้าและจุลินทรีย์ที่สร้างสารสีแดง สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือก ดังสรุปในตาราง

| รูปแบบการผลิต   | กล้าเชื้อออโตโคโนส<br>(autochthonous starter) | กล้าเชื้อเร่งกลิ่นและสี<br>Common starters |
|-----------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------|
| SSF แบบทั่วไป   | <i>Bacillus atrophaeus</i> UD6-2              | <i>Tetragenococcus halophilus</i> NCFF-2   |
| SSF แบบเกลือสูง | <i>Bacillus atrophaeus</i> NC58-2             | <i>Salinicoccus hispanicus</i> UDBD82-1    |
| SMF             | <i>Bacillus atrophaeus</i> SN78-1             |                                            |

### 3.2. การผลิตกล้าเชื้อในรูปแบบพร้อมใช้ที่สามารถเติมลงระบบการหมักได้โดยตรง

การผลิตกล้าเชื้อสำหรับใช้เร่งการหมักปลาร้าที่สามารถเติมในระบบการหมักได้โดยตรง พัฒนาขึ้นโดยการเตรียมกล้าเชื้อในรูปแบบกล้าเชื้อก้อนราแห้ง การผลิตประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

3.2.1. เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ไปพร้อมกับการฝึกฝนให้จุลินทรีย์สามารถเจริญในสภาวะที่มีเกลือสูงได้โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสภาวะเกลือสูงขึ้นพร้อมกับสร้างความคุ้นเคยกับสารอาหารในปลาร้า

3.2.2. ผสมเซลล์เจอร์ของจุลินทรีย์ที่ผ่านการฝึกฝนกับรำข้าวในอัตราส่วน 6 : 5 ขึ้นรูปแบบก้อนเม็ด/แผ่น หรือผง แล้วอบแห้งแบบ 2 step (ขั้นแรก 70°C, 30 นาที ขั้นที่ 2 60°C, 1 ชั่วโมง) ได้กล้าเชื้อที่มีจุลินทรีย์รอดชีวิตจากค่าเริ่มต้นมากกว่าร้อยละ 90

กล้าเชื้อที่ผลิตได้ เมื่อติดตามอายุการเก็บโดยประเมินแอกติวิตีของเชื้อ พบว่าสามารถเก็บได้มากกว่า 6 เดือน

### 4. การทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อในการหมักปลาร้าและคุณภาพของปลาร้าที่ได้

ทดสอบคุณสมบัติการหมักปลาร้าแบบเติมกล้าเชื้อตามวิธีที่ผลิตของแต่ละพื้นที่พื้นที่ละ 1 ตัวอย่าง เมื่อทดสอบกระบวนการหมักด้วยกล้าเชื้อที่จำเพาะกับการหมัก 3 รูปแบบ พบว่าสามารถ

ลดเวลาในการหมักปลาร้าทุกรูปแบบได้มากกว่าร้อยละ 50 โดยปลาร้าที่ผลิตได้รับการยอมรับ  
คุณภาพด้านประสาทสัมผัสไม่แตกต่างจากปลาร้าที่ผลิตแบบดั้งเดิม

#### 5. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่จากปลาร้าที่ผลิตจากการหมักด้วยกล้าเชื้อ

ผลิตภัณฑ์ใหม่ที่พัฒนาขึ้นจาก ปลาร้าที่หมักแบบกล้าเชื้อได้จากปลาร้าที่หมักแบบ SMF และ  
SSF แบบทั่วไป คือ ปลาร้าผงพร้อมปรุง และปลาร้าฟูทรงเครื่อง

##### 5.1. ปลาร้าผงพร้อมปรุง

พัฒนากระบวนการผลิตปลาร้าผงโดยใช้ปลาร้าวัตถุดิบที่ได้จากปลาร้าที่หมักแบบ  
SMF แบบเดิมกล้าเชื้อ เปรียบเทียบกับปลาร้าที่ไม่เติมกล้าเชื้อ พบว่า ปลาร้าผงที่ผลิตจาก  
ปลาร้าที่เติมกล้าเชื้อจะได้ yield สูงกว่าปลาร้าที่หมักโดยไม่เติมกล้าเชื้อ นำปลาร้าที่หมักด้วย  
หัวเชื้อมาผลิตปลาร้าเข้มข้นโดยการเติมน้ำคั่วหัวที่ร้อยละ 5 โดยมีร้อยละของผลผลิตเท่ากับ  
33.90 ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวผลิตในบรรจุภัณฑ์แบบซองขนาด 30 กรัม สำหรับใช้เป็นเครื่องปรุง  
รสอาหาร หรือใช้ผสมน้ำเตรียมเป็นน้ำปลาร้า สามารถเก็บได้อย่างน้อย 6 เดือน

##### 5.2. ปลาร้าฟูทรงเครื่อง

พัฒนากระบวนการผลิตปลาร้าฟูโดยใช้ปลาร้าวัตถุดิบที่ได้จากปลาร้าที่หมักแบบ SFF  
แบบทั่วไปแบบเดิมกล้าเชื้อ เปรียบเทียบกับปลาร้าที่ผลิตแบบดั้งเดิมหมัก 1 ปี พบว่าปลาร้าฟู  
ที่ผลิตจากปลาร้าหมักแบบเดิมกล้าเชื้อที่ได้มีเนื้อสัมผัส สี กลิ่นและรส ที่ได้รับการยอมรับทาง  
ประสาทสัมผัสสูงกว่าปลาร้าฟูที่ผลิตจากปลาร้าแบบดั้งเดิม (เพิ่มเติมรายละเอียดภายหลัง)  
ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวผลิตในบรรจุภัณฑ์แบบขวดแก้วขนาด 50 กรัม สามารถเก็บได้อย่างน้อย 6  
เดือน

#### ผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

- 1) องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับจุลินทรีย์ในระบบนิเวศของการหมักปลาร้าและกลไกการแสดงออก  
ของสารพันธุกรรมในระหว่างกระบวนการหมัก รวมทั้งองค์ประกอบของสารระเหยที่ให้กลิ่นรส  
และสารที่สามารถใช้ระบุเป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพสัมพันธ์กับอัตลักษณ์ด้านกลิ่นรสจากกระบวนการ  
ผลิตในเขตพื้นที่เฉพาะ องค์ความรู้ดังกล่าวสามารถใช้อธิบายกระบวนการหมักของปลาร้าในเชิง  
ลึก และสามารถนำเสนอเป็นผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการได้
- 2) เทคโนโลยีการผลิตหัวเชื้อปลาร้าใหม่ต้นทุนต่ำ สำหรับผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้สำหรับหมัก  
ปลาร้าจำเพาะตามรูปแบบการผลิตในแต่ละพื้นที่ซึ่งสามารถลดระยะเวลาในการหมักปลาร้าให้  
สั้นลงได้น้อยกว่าร้อยละ 50 และเทคโนโลยีในการผลิตกล้าเชื้อดังกล่าวมีความแตกต่างจาก  
ศาสตร์การผลิตหัวเชื้อในการหมักอาหารที่ใช้อยู่ทั่วไป โดยออกแบบกระบวนการผลิตหัวเชื้อ  
ด้วยการใช้วัสดุที่ใช้ในกระบวนการผลิตปลาร้า และใช้เทคโนโลยีที่ไม่ซับซ้อนแต่สามารถ

ควบคุมกระบวนการผลิตให้มีประสิทธิภาพได้ ช่วยแก้ปัญหาทั้งประเด็นเรื่องเพิ่มอัตราการผลิต และการควบคุมความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ได้ และจุดสำคัญในการผลิตนั้นอยู่ที่ขั้นตอนในการขยายหัวเชื้อซึ่งถือเป็น know how

- 3) ต้นแบบกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้ 3 รูปแบบ พร้อมคู่มือมาตรฐานกระบวนการผลิตปลาร้า และอัตลักษณ์ปลาร้าที่ผลิตในแต่ละพื้นที่ ที่พัฒนาขึ้นสำหรับผู้ประกอบการ เพื่อใช้ในการนำร่องการนำเทคโนโลยีใหม่เข้าสู่ผู้ประกอบการ
- 4) ผลิตภัณฑ์ปลาร้าแปรรูปใหม่จากปลาร้าที่ผลิตจากกระบวนการหมักปลาร้าด้วยกล้าเชื้อ 2 ผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ปลาร้าผงพร้อมปรุงจากปลาร้า 100% และ ปลาร้าฟูทรงเครื่อง เพื่อเป็นทางเลือกให้กับผู้ประกอบการ
- 5) Research commercialized plan เพื่อเป็นแนวทางให้กับผู้รับถ่ายทอดเทคโนโลยีใช้ประเมินแผนธุรกิจในอนาคตได้
- 6) ยื่นจดสิทธิบัตร 2 เรื่อง

## บทคัดย่อภาษาไทย

จากการสำรวจข้อมูลการผลิตปลาร้า ใน 6 เขต ได้แก่ จังหวัดอุดรธานี หนองคาย นครพนม สกลนคร นครราชสีมา และชัยภูมิ พบว่าการผลิตปลาร้าในพื้นที่ที่มีลักษณะทางภูมิศาสตร์ใกล้เคียงกัน และใช้วัตถุดิบจากแหล่งเดียวกันมีรูปแบบการผลิตที่เหมือนกันและปลาร้าจะมีอัตลักษณ์ใกล้เคียงกัน การผลิตปลาร้าในพื้นที่จังหวัดอุดรธานีคล้ายกับจังหวัดหนองคายส่วนใหญ่ผลิตแบบการหมักแบบแห้ง (Solid state fermentation, SSF) แบบทั่วไป จังหวัดนครพนมคล้ายกับจังหวัดสกลนครที่ส่วนใหญ่ผลิตแบบการหมักแบบแห้ง (Solid state fermentation, SSF) แบบเกลือสูง และจังหวัดนครราชสีมา คล้ายกับจังหวัดชัยภูมิที่นิยมผลิตแบบการหมักแบบเติมน้ำ (Submerge state fermentation, SMF) อัตลักษณ์ของปลาร้าจากทุกรูปแบบการหมักสามารถบ่งชี้ได้ด้วยปริมาณเกลือและรูปแบบสารระเหย โดยปลาร้าหมักแบบ SSF แบบเกลือสูง จะมีเกลือที่ความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 30 ส่วนแบบ SSF แบบทั่วไป และแบบ SMF มีเกลือโดยเฉลี่ยที่ร้อยละ 25 และ 20 ตามลำดับ ปลาร้าที่มีคุณภาพดีทุกรูปแบบ ประกอบด้วยสารระเหยใน 10 ลำดับแรก คือ สารระเหยในกลุ่มของกรด butanoic และอนุพันธ์ของกรดดังกล่าว รวมถึงสาร dimethyldisulfide โดยพบว่าปลาร้าที่หมักแบบ SSF แบบเกลือสูง จะพบสาร dimethyldisulfide ในลำดับต้นกว่ากรด butanoic และอนุพันธ์ของกรดดังกล่าว ส่วนปลาร้าหมักแบบ SSF แบบทั่วไป และ แบบ SMF จะพบ dimethyldisulfide ในลำดับไกลกว่าลำดับของกลุ่มกรด butanoic และอนุพันธ์ของกรดดังกล่าว แต่ลำดับและชนิดของสารอนุพันธ์ในการหมักทั้งสองแบบ จะมีความแตกต่างกัน ในส่วนของลักษณะปรากฏปลาร้าตัวที่หมักจากทุกรูปแบบที่มีคุณภาพดีเนื้อปลาต้องมีสีแดงและเนื้อไม่ยุบ การตรวจสอบการแสดงออกทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ในระบบการหมักปลาร้าทุกรูปแบบ พบว่าปลาร้าจะเริ่มต้นการหมักแบบ auto-fermentation ด้วยจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันคือ *Halanaerobium* spp. และ *Lentibacillus* spp. หลังจากนั้นจุลินทรีย์อื่นๆ ที่เป็นจุลินทรีย์เฉพาะถิ่น (จุลินทรีย์ออโตโคโนส ได้แก่ *Bacillus* และ lactic acid bacteria) จะเพิ่มจำนวนและร่วมดำเนินการหมัก นำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการออกแบบกระบวนการหมักให้เป็นการหมักแบบ 2 ขั้นตอน คือ (i) หมักปลาร้าเบื้องต้นด้วยระบบ auto-fermentation (ii) เติมห้ำเชื้อเพื่อเร่งการพัฒนา กลิ่น สีและเนื้อสัมผัสของปลาร้า การพัฒนาห้ำเชื้อเร่งหมักปลาร้าทำโดยใช้จุลินทรีย์ 3 ชนิด (เชื้อออโตโคโนสของการหมักแต่ละรูปแบบและเชื้อเร่งสีและกลิ่น) เตรียมเซลล์ให้ทนเกลือผสมกับรำและอบแห้งแบบสองขั้นตอนและใช้เติมในระหว่างกระบวนการหมักปลาร้าได้โดยตรง เมื่อทดสอบกระบวนการหมักด้วยห้ำเชื้อที่จำเพาะกับการหมัก 3 รูปแบบ พบว่าสามารถลดเวลาในการหมักปลาร้าทุกรูปแบบได้มากกว่าร้อยละ 50 โดยปลาร้าที่ผลิตได้รับการยอมรับคุณภาพด้านประสาทสัมผัสไม่แตกต่างจากปลาร้าที่ผลิตแบบดั้งเดิม ปลาร้าที่ผลิตจากการหมักด้วยห้ำเชื้อ สามารถใช้ผลิตผลิตภัณฑ์รูปแบบใหม่ 2 ชนิด คือ ปลาร้าผงพร้อมปรุง และ ปลาร้าพุทธรังเครื่อง ที่ได้ปริมาณผลผลิตและการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงกว่าการผลิตจากปลาร้าที่หมักแบบดั้งเดิม

### Abstract

From the survey results collected from Undorntanee, Nongkai Nakornphanom, Sakonnakorn, Nakornrachsrma and Chaiyaphoom, Salty Fermented fish or “Plara” produced in the similar geographical areas and raw material used from the same source were made from the same process and had similar identity. Plara making process in these areas could be classified into 3 main processes which were general solid state fermentation (g-SSF) mainly practiced in Undorntanee and Nongkai, high salted solid state fermentation (hs-SSF) in Nakornphanom, Sakonnakorn, Submerge state fermentation (SMF) and Submerge state fermentation (SMF) in Nakornrachsrma and Chaiyaphoom. The identities of Plara could be indicated by salt concentrations and volatile compound profiles. Plara made from hs-SSF, g-SSF and SMF generally contained salt >30%, ~25% and ~20%, respectively. Quality Plara from all processes composed of the first 10 volatile compounds including a group of butanoic acid and its derivatives and dimethyldisulfide. Plara from hs-SSF contained dimethyldisulfide in the first order following by butanoic acid and its derivatives. Plara from g-SSF and SMF contained dimethyldisulfide with the late order than butanoic acid and its derivatives but the type and order of the derivatives of these two making process were different. Quality appearance of Plara from all process, the texture and color of fish should be firm and red. In investigation of gene expression of bacterial communities in all Plara fermentation, systems were commenced with auto-fermentation with the same microbes; *Halanaerobium* spp. and *Lentibacillus* spp. following by the other microflora (autochthonous; *Bacillus* and lactic acid bacteria with increasing population and co-fermentation. Based on fermentation profile found, the fermentation were designed to be 2 step fermentation including (i) initiated Plara fermentation through auto-fermentation prior to (ii) adding of microbial starter to accelerate the development of aroma, color and texture of Plara. Starters were developed as multi-starter of 3 microbes (autochthonous of each fermentation, pigment and aroma accelerating microbes) that were firstly optimized to be salt tolerance and mixed with dried rice bran then subjected to 2 step drying process. The specific starters developed could reduce all Plara fermentation process time up to 50% with acceptable qualities similar to conventional Plara. Plara from starter fermentation could be produced two new products, Plara powder and Crispy fried Plara with higher yield and more acceptable sensory quality relative to the same products made from conventional Plara.

## สารบัญ

| บทที่              | หัวข้อ                                                                          | หน้า      |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| บทคัดย่อภาษาไทย    |                                                                                 | 9         |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ |                                                                                 | 10        |
| สารบัญ             |                                                                                 | 11        |
| สารบัญตาราง        |                                                                                 | 13        |
| สารบัญภาพ          |                                                                                 | 16        |
| <b>บทที่ 1</b>     | <b>บทนำ</b>                                                                     | <b>18</b> |
| 1.1                | ความสำคัญ และที่มาของปัญหา                                                      | 19        |
| 1.2                | วัตถุประสงค์ของการวิจัย                                                         | 20        |
| 1.3                | ขอบเขตของการวิจัย                                                               | 20        |
| 1.4                | ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากโครงการ                                             | 21        |
| 1.5                | กรอบแนวความคิดของการวิจัยและขั้นตอนการวิจัย                                     | 21        |
| 1.6                | การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง                                          | 22        |
| 1.7                | วิธีการดำเนินการวิจัย                                                           | 28        |
| 1.8                | แผนงานโครงการ                                                                   | 35        |
| <b>บทที่ 2</b>     | <b>ผลการวิจัย</b>                                                               | <b>36</b> |
| 2.1                | ศึกษาข้อมูลกรรมวิธีผลิตปลาร้า คุณลักษณะของปลาร้า เพื่อประเมินอัตลักษณ์ของปลาร้า | 37        |
| 2.2                | ศึกษารูปแบบการหมักและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักปลาร้า                    | 95        |
| 2.3                | การพัฒนากล้าเชื้อพร้อมใช้สำหรับเร่งกระบวนการหมักปลาร้า                          | 113       |
| 2.4                | การทดสอบคุณสมบัติการหมักและคุณภาพของกล้าเชื้อในปลาร้าทั้ง 3 ชนิด                | 124       |
| 2.5                | การทดสอบคุณภาพของปลาร้าที่ผลิตได้จากการหมักโดยใช้กล้าเชื้อ                      | 134       |
| 2.6                | การพัฒนาผลิตภัณฑ์รูปแบบใหม่จากปลาร้าที่ได้จากการหมักด้วยกล้าเชื้อ               | 140       |
|                    | เอกสารอ้างอิง                                                                   | 160       |
| <b>ภาคผนวก</b>     |                                                                                 |           |
| ภาคผนวก ก1         | การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของปลาร้า                                  | 165       |
| ภาคผนวก ก2         | การตรวจสอบสมบัติทางจุลชีววิทยาของปลาร้า                                         | 169       |
| ภาคผนวก ข1         | วิเคราะห์องค์ประกอบโดยรวมของสารเมตาโบไลต์ชนิดระเหยง่าย                          | 170       |
| ภาคผนวก ข2         | วิเคราะห์องค์ประกอบโดยรวมของกรดอะมิโน                                           | 171       |

| บทที่      | หัวข้อ                                                                                                                                                                            | หน้า |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ภาคผนวก ค1 | การคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างปลาร้าและการทดสอบคุณสมบัติ                                                                                                                          | 172  |
| ภาคผนวก ค2 | RT-PCR DGGE analysis                                                                                                                                                              | 175  |
| ภาคผนวก ง  | การสร้างสารกลุ่ม Biogenic amine                                                                                                                                                   | 182  |
| ภาคผนวก จ  | สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ในการเตรียมกล้าเชื้อปลาร้า                                                                                                                         | 191  |
| ภาคผนวก ฉ  | แบบสัมภาษณ์ผู้ผลิตปลาร้า                                                                                                                                                          | 192  |
| ภาคผนวก ช  | แบบสำรวจความพึงพอใจต่อกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้                                                                                                                                     | 195  |
| ภาคผนวก ซ  | แบบทดสอบคุณภาพของส้มตำปลาร้า                                                                                                                                                      | 200  |
| ภาคผนวก ฌ  | บทความสำหรับเผยแพร่                                                                                                                                                               | 202  |
| ภาคผนวก ฎ  | กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์                                                                                                                             | 203  |
| ภาคผนวก ฏ  | ตารางเปรียบเทียบ Output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและได้จริง                                                                                                                         | 214  |
| ภาคผนวก ฐ  | การผลิตปลาร้าผงด้วยการทำแห้งแบบลูกกลิ้งคู่                                                                                                                                        | 216  |
| ภาคผนวก ฑ  | การเตรียมปลาร้าสำหรับทดสอบทางประสาทสัมผัส                                                                                                                                         | 221  |
| ภาคผนวก ท  | การวิเคราะห์ข้อมูลโปรไฟล์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในตัวอย่างปลาร้าที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้<br>(accelerated fermentation using selective starter cultures) | 224  |
| ภาคผนวก ฒ  | มผช. ปลาร้าผง                                                                                                                                                                     | 232  |



## สารบัญตาราง

|             | หัวข้อ                                                                                                                                                                            | หน้า |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ตารางที่ 1  | ข้อมูลการผลิตและคุณลักษณะปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดอุดรธานีและหนองคาย                                                                                                          | 38   |
| ตารางที่ 2  | สมบัติทางเคมี กายภาพ และชีวภาพของปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดอุดรธานีและหนองคาย                                                                                                  | 42   |
| ตารางที่ 3  | ข้อมูลการผลิตและคุณลักษณะปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดสกลนครและนครพนม                                                                                                             | 44   |
| ตารางที่ 4  | สมบัติทางเคมี กายภาพ และชีวภาพของปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดสกลนครและนครพนม                                                                                                     | 48   |
| ตารางที่ 5  | ข้อมูลการผลิตและคุณลักษณะปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและชัยภูมิ                                                                                                        | 50   |
| ตารางที่ 6  | สมบัติทางเคมี กายภาพ และชีวภาพของปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและชัยภูมิ                                                                                                | 54   |
| ตารางที่ 7  | เปรียบเทียบสมบัติทางเคมี กายภาพ และชีวภาพของปลาร้าที่ผลิตในทุกพื้นที่                                                                                                             | 57   |
| ตารางที่ 8  | ข้อมูลตัวอย่างปลาร้าตัวแทนจากเขตพื้นที่การผลิตต่าง ๆ ที่คัดเลือกมาเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายด้วยเทคนิค Headspace SPME-GS/MS                                   | 60   |
| ตารางที่ 9  | ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ตรวจพบในปริมาณสัมพันธ์ (relative abundance) รวมมากที่สุด 20 อันดับแรกในตัวอย่างปลาร้าด้วยเทคนิค Headspace SPME-GS/MS                           | 61   |
| ตารางที่ 10 | ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ตรวจพบในปริมาณสัมพันธ์ (relative abundance) รวมมากที่สุด 10 อันดับแรกในตัวอย่างปลาร้าด้วยเทคนิค Headspace SPME-GS/MS จำแนกตามเขตพื้นที่การผลิต | 62   |
| ตารางที่ 11 | ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่นำเข้ามาใช้เป็นตัวแปร (variable) เพื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติและค่าปริมาณสัมพันธ์ (relative abundance)                                             | 63   |
| ตารางที่ 12 | ข้อมูลตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในเขตพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาตามระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก                                                                                          | 74   |
| ตารางที่ 13 | ข้อมูลตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในเขตพื้นที่จังหวัดอุดรธานีตามระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก                                                                                            | 76   |
| ตารางที่ 14 | ข้อมูลตัวอย่างปลาร้าตัวแทนจากเขตพื้นที่การผลิตต่าง ๆ ที่คัดเลือกเพื่อมาวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระด้วยเทคนิค HPLC                                                               | 86   |
| ตารางที่ 15 | ข้อมูลปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิดที่ตรวจพบในปริมาณสัมพันธ์ (relative abundance) รวมมากที่สุด 20 อันดับแรกในตัวอย่างปลาร้าด้วยเทคนิค HPLC จำแนกตามเขตพื้นที่การผลิต               | 87   |
| ตารางที่ 16 | รูปแบบของจุลินทรีย์ในระบบการหมักปลาร้าในพื้นที่จังหวัดอุดรธานีและหนองคาย                                                                                                          | 100  |
| ตารางที่ 17 | รูปแบบของจุลินทรีย์ในระบบการหมักปลาร้าในพื้นที่จังหวัดสกลนครและนครพนม                                                                                                             | 103  |
| ตารางที่ 18 | รูปแบบของจุลินทรีย์ในระบบการหมักปลาร้าในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา-ชัยภูมิ                                                                                                          | 105  |
| ตารางที่ 19 | รูปแบบของจุลินทรีย์ในระบบการหมักปลาร้าในพื้นที่อื่น ๆ                                                                                                                             | 107  |

|             | หัวข้อ                                                                                                                                          | หน้า |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ตารางที่ 20 | จุลินทรีย์ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตจากพื้นที่ต่าง ๆ และความหลากหลายของสมบัติทนเกลือและการย่อยโปรตีน                           | 111  |
| ตารางที่ 21 | จุลินทรีย์ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างเกลือและรำที่ใช้เป็นส่วนผสมของปลาร้าในแต่ละพื้นที่                                                      | 112  |
| ตารางที่ 22 | สมบัติที่บ่งชี้ลักษณะของปลาร้าที่ผลิตในแต่ละพื้นที่                                                                                             | 114  |
| ตารางที่ 23 | จุลินทรีย์ไอโซเลทสำหรับพัฒนาเป็นกล้าเชื้อเร่งหมักปลาร้า                                                                                         | 116  |
| ตารางที่ 24 | การทดสอบความปลอดภัยและสมบัติพิเศษของจุลินทรีย์ไอโซเลทสำหรับพัฒนาเป็นกล้าเชื้อเร่งหมักปลาร้า                                                     | 118  |
| ตารางที่ 25 | สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเซลล์ของไอโซเลท (สภาวะที่เซลล์เจริญได้สูงสุด)                                                                         | 120  |
| ตารางที่ 26 | สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมกล้าเชื้อรอบแห้ง                                                                                                      | 121  |
| ตารางที่ 27 | อายุการเก็บ คุณภาพและแอคติวิตีของกล้าเชื้อ                                                                                                      | 123  |
| ตารางที่ 28 | ผลจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและ Protease activity ในระหว่างกระบวนการหมักปลาร้า                                                                      | 126  |
| ตารางที่ 29 | การเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ และการแสดงออกทางพันธุกรรมในระหว่างกระบวนการหมักปลาร้าแบบ SSF แบบทั่วไป                                    | 127  |
| ตารางที่ 30 | ผลจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและ Protease activity ในระหว่างกระบวนการหมักปลาร้า การหมักแบบ SMF                                                       | 128  |
| ตารางที่ 31 | การเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ และการแสดงออกทางพันธุกรรมในระหว่างกระบวนการหมักปลาร้าแบบ SMF                                              | 129  |
| ตารางที่ 32 | ผลจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและ Protease activity ในระหว่างกระบวนการหมักปลาร้าแบบ SSF แบบใช้เกลือสูง                                                | 130  |
| ตารางที่ 33 | การเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ และการแสดงออกทางพันธุกรรมในระหว่างกระบวนการหมักปลาร้าแบบ SSF แบบเกลือสูง                                  | 131  |
| ตารางที่ 34 | สมบัติทางเคมี กายภาพ และชีวภาพของปลาร้าจาก 3 กระบวนการผลิตที่หมักโดยไม่เติม และเติมกล้าเชื้อ เปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของปลาร้าที่ผลิตแบบดั้งเดิม | 133  |
| ตารางที่ 35 | ค่าการยอมรับต่อลักษณะต่าง ๆ ต่อสัมผัสปลาร้าแต่ละตัวอย่าง จากผู้ทดสอบชิม 50 คน                                                                   | 135  |
| ตารางที่ 36 | ความเข้มข้นของลักษณะตัวอย่างสัมผัสปลาร้า จากผู้ทดสอบชิม 50 คน                                                                                   | 135  |
| ตารางที่ 37 | การผลิตน้ำแกงเห็ดแบบเติมปลาร้าสด                                                                                                                | 136  |
| ตารางที่ 38 | การผลิตน้ำแกงเห็ดแบบเติมปลาร้าผง                                                                                                                | 136  |
| ตารางที่ 39 | คะแนนความชอบของตัวอย่างปลาร้า 9-point hedonic scale                                                                                             | 137  |
| ตารางที่ 40 | คะแนนความชอบของตัวอย่างปลาร้า 9-point hedonic scale                                                                                             | 137  |
| ตารางที่ 41 | จำนวนผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัสที่ให้การยอมรับปลาร้าในน้ำแกงเห็ด                                                                                   | 138  |
| ตารางที่ 42 | คะแนนการยอมรับต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านต่างๆของผลิตภัณฑ์ปลาร้าบอง                                                                            | 139  |
| ตารางที่ 43 | จำนวนผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัสที่ให้การยอมรับปลาร้าในปลาร้าบอง                                                                                    | 139  |
| ตารางที่ 44 | สภาวะที่ศึกษาการทำปลาร้าผง                                                                                                                      | 141  |
| ตารางที่ 45 | ร้อยละของผลผลิตปลาร้าเข้มข้นจากปลาร้าสดในแต่ละสภาวะ                                                                                             | 142  |

|             | หัวข้อ                                                                             | หน้า |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ตารางที่ 46 | สถานะที่ศึกษาการทำปลาร้าง                                                          | 144  |
| ตารางที่ 47 | การวัดสีปลาร้าง                                                                    | 146  |
| ตารางที่ 48 | ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบโดยประมาณ (Proximate Analysis)                             | 146  |
| ตารางที่ 49 | ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของปลาร้างสถานะต่างๆ                                | 147  |
| ตารางที่ 50 | การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (Total plate count) และยีสต์ ราในปลาร้าง         | 148  |
| ตารางที่ 51 | ผลคะแนนความชอบของตัวอย่างปลาร้า 9 point hedonic scale                              | 148  |
| ตารางที่ 52 | ต้นทุนการผลิตปลาร้า                                                                | 149  |
| ตารางที่ 53 | องค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ปลาร้าฟูทรงเครื่อง 100 กรัม                                  | 153  |
| ตารางที่ 54 | ค่าคะแนนการยอมรับต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ปลาร้าฟูทรงเครื่อง | 153  |
| ตารางที่ 55 | จำนวนผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัสที่ให้การยอมรับปลาร้าฟูทรงเครื่อง                      | 154  |
| ตารางที่ 56 | ต้นทุนการผลิตปลาร้าฟูทรงเครื่อง                                                    | 155  |
| ตารางที่ 57 | ต้นทุนการผลิตปลาร้าฟูทรงเครื่องสูตรกล้าเชื้อ                                       | 156  |
| ตารางที่ 58 | ต้นทุนการผลิตปลาร้าฟูทรงเครื่องสูตรมาตรฐาน                                         | 157  |

## สารบัญภาพ

|           | หัวข้อ                                                                                                                                                                            | หน้า |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ภาพที่ 1  | ขั้นตอนการผลิตปลาร้าของพื้นที่อุดรธานีและหนองคาย                                                                                                                                  | 39   |
| ภาพที่ 2  | ลักษณะปรากฏของปลาร้าแบบปลาร้าตัว และปลาร้ารวมที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดอุดรธานีและหนองคาย                                                                                            | 40   |
| ภาพที่ 3  | ขั้นตอนการผลิตปลาร้าโดยสรุปของพื้นที่จังหวัดสกลนครและนครพนม                                                                                                                       | 45   |
| ภาพที่ 4  | ลักษณะปรากฏของปลาร้าแบบปลาร้าหนัง ปลาร้าเกล็ด ปลาร้ารวม และปลาร้าโหน่งที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดสกลนครและนครพนม                                                                      | 46   |
| ภาพที่ 5  | ขั้นตอนการผลิตปลาร้าโดยสรุปของพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและชัยภูมิ                                                                                                                  | 51   |
| ภาพที่ 6  | ลักษณะปรากฏของปลาร้าเดี่ยวที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและชัยภูมิ                                                                                                             | 52   |
| ภาพที่ 7  | กระบวนการผลิตปลาร้าโดยสรุปของแต่ละพื้นที่ที่พบโดยส่วนใหญ่ที่พบในการศึกษา                                                                                                          | 58   |
| ภาพที่ 8  | การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัดอุดรธานี-หนองคาย นครราชสีมา-ชัยภูมิ และสกลนคร-นครพนม                      | 67   |
| ภาพที่ 9  | การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัดอุดรธานี-หนองคาย และนครราชสีมา-ชัยภูมิ                                    | 69   |
| ภาพที่ 10 | การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัดอุดรธานี-หนองคาย และสกลนคร-นครพนม                                         | 71   |
| ภาพที่ 11 | การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด นครราชสีมา-ชัยภูมิ และสกลนคร-นครพนม                                      | 73   |
| ภาพที่ 12 | การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด นครราชสีมา                                                               | 75   |
| ภาพที่ 13 | การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด อุดรธานี                                                                 | 77   |
| ภาพที่ 14 | การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาร้าด้วย PCA จากข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด อุดรธานี-หนองคาย นครราชสีมา-ชัยภูมิ และสกลนคร-นครพนม | 79   |
| ภาพที่ 15 | การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาร้าด้วย PCA จากข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด อุดรธานี-หนองคาย และนครราชสีมา-ชัยภูมิ               | 81   |
| ภาพที่ 16 | การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาร้าด้วย PCA จากข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด อุดรธานี-หนองคาย และสกลนคร-นครพนม                    | 83   |
| ภาพที่ 17 | การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาร้าด้วย PCA จากข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด นครราชสีมา-ชัยภูมิ และสกลนคร-นครพนม                  | 84   |

|           | หัวข้อ                                                                                                                                                                                                    | หน้า |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ภาพที่ 18 | การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัดอุดรธานี-หนองคาย นครราชสีมา-ชัยภูมิ และ สกลนคร-นครพนม                                                | 88   |
| ภาพที่ 19 | การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัดอุดรธานี-หนองคาย และ นครราชสีมา-ชัยภูมิ                                                              | 89   |
| ภาพที่ 20 | การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัดอุดรธานี-หนองคาย และสกลนคร-นครพนม                                                                    | 90   |
| ภาพที่ 21 | การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัดนครราชสีมา-ชัยภูมิ และสกลนคร-นครพนม                                                                  | 91   |
| ภาพที่ 22 | การจัดกลุ่มรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ในตัวอย่าง ปลาร้าที่ผลิตในเขตพื้นที่จังหวัด นครราชสีมา ตามระยะเวลาที่ในกระบวนการหมัก                                                       | 92   |
| ภาพที่ 23 | การจัดกลุ่มรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ในตัวอย่าง ปลาร้าที่ผลิตในเขตพื้นที่จังหวัด อุดรธานี ตามระยะเวลาที่ในกระบวนการหมัก                                                         | 93   |
| ภาพที่ 24 | การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาร้าด้วย PCA จากข้อมูลสารเมตา บอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัดอุดรธานี-หนองคาย นครราชสีมา-ชัยภูมิ และสกลนคร-นครพนม ในรูปแบบ PCA score plot | 94   |
| ภาพที่ 25 | แถบ cDNA ของจุลินทรีย์หลักที่พบในการหมักปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดอุดรธานี และหนองคาย                                                                                                                  | 96   |
| ภาพที่ 26 | โคโลนีของไอโซเลทที่คัดแยกจากตัวอย่างปลาร้าจากสกลนครและนครพนม                                                                                                                                              | 98   |
| ภาพที่ 27 | ลักษณะปรากฏของปลาร้าหมักแบบ SSF ทั้งหมด                                                                                                                                                                   | 126  |
| ภาพที่ 28 | ลักษณะปรากฏของปลาร้าหมักแบบ SMF ทั้งหมด                                                                                                                                                                   | 128  |
| ภาพที่ 29 | ลักษณะปรากฏของปลาร้าหมักแบบ SSF แบบเกลือสูง                                                                                                                                                               | 132  |
| ภาพที่ 30 | การทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสแก่เหตุที่ใช้ปลาร้าชุดควบคุม และปลาร้าที่ เติมกล้าเชื้อ                                                                                                                   | 136  |
| ภาพที่ 31 | วัตถุดิบที่ใช้ปรุงปลาร้าบอง และปลาร้าบองสูตรต่างๆ                                                                                                                                                         | 138  |
| ภาพที่ 32 | ปลาร้าที่หมักด้วยสภาวะต่าง ๆ                                                                                                                                                                              | 141  |
| ภาพที่ 33 | ขั้นตอนการเตรียมปลาร้าเข้มข้น                                                                                                                                                                             | 142  |
| ภาพที่ 34 | ขั้นตอนการทำปลาร้าผงโดยการทำให้แห้งแบบลูกกลิ้งคู่                                                                                                                                                         | 144  |
| ภาพที่ 35 | ปลาร้าผงที่ได้จากสภาวะต่าง ๆ                                                                                                                                                                              | 145  |
| ภาพที่ 36 | ปลาร้าฟูทรงเครื่อง (ก) สูตรกล้าเชื้อ (ข) สูตรมาตรฐาน                                                                                                                                                      | 154  |
| ภาพที่ 37 | เนื้อปลาร้านิ่ง (ก) สูตรกล้าเชื้อ (ข) สูตรมาตรฐาน                                                                                                                                                         | 154  |

# บทที่ 1

---

## บทนำ

## 1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

การผลิตปลาร้าเดิมนั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อเก็บไว้บริโภคในครัวเรือน ต่อมาเมื่อผู้บริโภคส่วนหนึ่งที่เคยผลิตปลาร้าบริโภคเองหันไปซื้อปลาร้ารับประทานมากขึ้น จึงมีการผลิตปลาร้าเพื่อการจำหน่าย ด้วยจึงเป็นที่มาของการขยายการผลิตทำให้มูลค่าการค้าปลาร้าภายในประเทศในระยะ 10 กว่าปีที่ผ่านมามีมูลค่าสูงถึง 800 ล้านบาท และมีการส่งออกเป็นมูลค่ากว่า 20 ล้านบาทต่อปีผลิตภัณฑ์ปลาร้าจึงกลายเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์สินค้าหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์หรือสินค้าโอท็อปที่สำคัญ รวมทั้งการส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศก็เริ่มขยายตัวมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ผู้ผลิตปลาร้าเริ่มมีการพัฒนาสูตร การผลิตปลาร้าจนเป็นที่นิยมของตลาด ปลาร้าจึงพัฒนาจากการเป็นเพียงอาหารพื้นบ้านที่มีการผลิต ในระดับครัวเรือนจนกลายเป็นอุตสาหกรรมขนาดย่อมที่มีระดับการผลิตสูงถึง 40,000 ตันต่อปี (ศูนย์วิจัยกสิกรรมไทย, 2004) การผลิตปลาร้าจะแตกต่างกันในแต่ละท้องถิ่น และผลิตภัณฑ์ปลาร้าก็จะ มีอัตลักษณ์เฉพาะแตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามการผลิตปลาร้าจำเป็นต้องใช้เวลานานเนื่องจาก กระบวนการหมักเนื้อปลาภายใต้สภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสูงนั้นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการหมัก ปลาเพื่อย่อยโปรตีน หรือเพื่อสร้างกลิ่นรสจำเพาะนั้นจะดำเนินกิจกรรมได้อย่างช้า ๆ ดังนั้นจึงพบว่า ปลาร้าที่หมักใช้เวลานาน เช่น 1 ปีขึ้นไปถือว่าเป็นปลาร้าที่มีรสชาติอร่อย แต่โดยทั่วไปปลาร้าที่วางจำหน่ายส่วนมากเป็นปลาร้าที่หมักได้ประมาณ 6-7 เดือน ซึ่งจากกระบวนการผลิตที่ต้องใช้เวลานาน ดังกล่าวเมื่อตลาดปลาร้าขยายขนาดขึ้น กระบวนการผลิตปลาร้าจำเป็นจะต้องเปลี่ยนรูปแบบการผลิต ให้สอดคล้องกับความต้องการ กล่าวคือ การผลิตปลาร้าจะต้องสามารถผลิตด้วยอัตราการผลิตที่ รวดเร็วแต่ยังคงอัตลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ปลาร้าได้เช่นเดิม เพื่อให้ได้ปริมาณผลผลิตปลาร้ามากพอต่อ ความต้องการของตลาดและยังคงคุณภาพตามที่ต้องการ ในขณะเดียวกันเมื่อสามารถผลิตปลาร้าใน ปริมาณมากขึ้นการสร้างผลิตภัณฑ์รูปแบบใหม่เพื่อเป็นทางเลือกให้แก่ผู้ประกอบการจะเป็นการช่วย เพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ปลาร้าและช่วยส่งเสริมให้ตลาดขยายตัวได้มากและรวดเร็วยิ่งขึ้น นอกจากนี้ จะช่วยให้ผู้ประกอบการในกลุ่มวิสาหกิจชุมชนขนาดกลางและขนาดย่อมสามารถผลิตปลาร้าได้เพิ่มขึ้น และมีคุณภาพสม่ำเสมอเป็นที่ต้องการของตลาดแล้วยังส่งผลให้ผลิตภัณฑ์พื้นบ้านที่เป็นอัตลักษณ์ของ ท้องถิ่นไทยถูกยกระดับให้เป็นสินค้าที่มีมูลค่าสูงขึ้น และสามารถนำเข้าสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรม ขนาดใหญ่ขึ้นได้

ดังนั้นทีมงานในเครือข่ายวิจัยนี้จึงต้องการที่จะพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปลาร้าในรูปแบบของการพัฒนากระบวนการหมักที่สามารถควบคุมระยะเวลาการหมักให้สั้นลงโดยยังคงคุณลักษณะของปลาร้า และสุขลักษณะการผลิตที่ดีในรูปแบบของการใช้กล้าเชื้อ (starter culture) ในการเร่ง อัตราการหมัก โดยจะพัฒนาเป็นกล้าเชื้อพร้อมใช้ที่มีความจำเพาะกับปลาร้าที่ผลิตบางพื้นที่ของภาคอีสาน (จังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ อุตรดิตถ์ หนองคาย สกลนครและนครพนม) เพื่อเพิ่มอัตราการผลิต และปริมาณผลผลิตปลาร้าระดับชุมชนและวิสาหกิจชุมชนขนาดกลางและขนาดย่อมทั้งเพื่อการบริโภค ในท้องถิ่นและเพื่อเป็นวัตถุดิบสำหรับนำไปแปรรูปในระดับอุตสาหกรรม และเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ รูปแบบใหม่จากปลาร้าที่ได้จากกระบวนการผลิตที่พัฒนาขึ้นใหม่ในขั้นต้นเพื่อเป็นทางเลือกให้แก่

ผู้ประกอบการและเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ปลาร้าที่ผลิตระดับชุมชนและในเชิงอุตสาหกรรม โดยโครงการวิจัยนี้เป็นการต่อยอดองค์ความรู้ที่ได้จากการทำวิจัยเบื้องต้นจากการศึกษาจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักและพัฒนาเป็นกล้าเชื้อสำหรับเร่งอัตราการหมักปลาร้าในจังหวัดสระบุรีพบว่ากล้าที่เตรียมได้สามารถเร่งอัตราการหมักจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการสามารถเร่งอัตราการหมัก ได้เร็วขึ้นถึงประมาณ ร้อยละ 40 ของระยะเวลาการหมักแบบเดิม นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาแนวทาง การเตรียมผลิตภัณฑ์เชื้อพร้อมใช้ในทางการค้า จึงมีองค์ความรู้พื้นฐานและวิธีการดำเนินการวิจัยเพียงพอที่จะใช้เป็นแนวทางในการดำเนินโครงการวิจัยนี้ให้สำเร็จและลุล่วงได้ในกรอบเวลาที่เสนอไว้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาข้อมูลกรรมวิธีผลิตปลาร้า คุณลักษณะของปลาร้า ที่ผลิตในระดับวิสาหกิจชุมชน และวิสาหกิจชุมชนขนาดกลางและขนาดย่อมเพื่อให้ได้ฐานข้อมูลการผลิตรวมถึงเส้นทางการผลิต ตลอดห่วงโซ่การผลิตปลาร้า เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และสังเคราะห์สำหรับใช้ในการหาเอกลักษณ์เฉพาะของปลาร้าในแต่ละพื้นที่และเพื่อพัฒนากระบวนการผลิต
- 2) เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปลาร้าโดยการเร่งกระบวนการหมัก ในรูปแบบของการใช้ กล้าเชื้อพร้อมใช้ที่มีความจำเพาะกับปลาร้าที่ผลิตในแต่ละพื้นที่ของภาคอีสาน เพื่อเพิ่มอัตราการผลิต และปริมาณผลผลิตปลาร้าระดับระดับวิสาหกิจชุมชนและวิสาหกิจชุมชนขนาดกลางและขนาดย่อมทั้ง เพื่อการบริโภคในท้องถิ่นและเพื่อเป็นวัตถุดิบสำหรับนำไปแปรรูปในระดับอุตสาหกรรม
- 3) เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์รูปแบบใหม่จากปลาร้าที่ได้จากกระบวนการผลิตที่พัฒนาขึ้นใหม่ใน ขั้นตอนเพื่อเป็นทางเลือกให้แก่ผู้ประกอบการและเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ปลาร้าที่ผลิตระดับชุมชน และในเชิงอุตสาหกรรม

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การดำเนินงานวิจัยครอบคลุมเรื่อง เอกลักษณ์เฉพาะของผลิตภัณฑ์ปลาร้าในแต่ละพื้นที่การผลิตประเมินโดยการศึกษาข้อมูล วัตถุดิบกระบวนการผลิตและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสมบัติทางชีวภาพกายภาพเคมีและคุณภาพ ทางประสาทสัมผัสของปลาร้าที่ผลิตในระดับวิสาหกิจชุมชนและวิสาหกิจชุมชนขนาดกลาง และขนาดย่อมในพื้นที่ภาคอีสานตอนกลางและตอนบน (จังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ อุตรธานี หนองคาย สกลนครและนครพนม) จัดทำฐานข้อมูลกระบวนการผลิตและข้อมูลทางชีวโมเลกุลของสารเมตาบอไลต์ที่เป็นองค์ประกอบสำหรับเป็นแหล่งข้อมูลเพื่อใช้ในการพัฒนากระบวนการผลิต และผลิตภัณฑ์การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตกระบวนการผลิตโดยการศึกษาและคัดแยกจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง กับและกระบวนการหมักปลาร้าในแต่ละพื้นที่เพื่อพัฒนาเป็นกล้าเชื้อสำหรับการเร่งการหมักและการสร้างสารที่ให้กลิ่นรสจำเพาะ ทดสอบคุณสมบัติการหมักของกล้าเชื้อ และ คุณภาพของผลิตภัณฑ์ปลาร้าที่ได้พัฒนาวิธีการผลิตกล้าเชื้อพร้อมใช้อย่างน้อย 1 ชนิด กำหนดและพัฒนา



กระบวนการหมักการพัฒนาผลิตภัณฑ์รูปแบบใหม่จากปลาร้าที่ได้จากกระบวนการผลิตที่พัฒนาขึ้นใหม่ โดย การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาร้า ทั้งในรูปแบบเครื่องปรุง และ/หรือผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภค พร้อม พัฒนาบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสม ประเมินความนิยมและการยอมรับในผลิตภัณฑ์สร้างเป็น ผลิตภัณฑ์ ต้นแบบ อย่างน้อย 1 ชนิด

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากโครงการ

การดำเนินการวิจัยเมื่อเสร็จสิ้นโครงการ รวมถึงข้อตกลงในการเสนอขอรับทุนจะเกิดผลผลิตจากการวิจัย คือ

- 1) กล้าเชื้อพร้อมใช้ 3 ชนิด พร้อมกรรมวิธีการผลิต
- 2) กระบวนการผลิตปลาร้าโดยใช้กล้าเชื้อที่พัฒนาได้พร้อมคู่มือกระบวนการผลิตเพื่อถ่ายทอดแก่ผู้ประกอบการในแต่ละพื้นที่
- 3) ผลิตภัณฑ์ปลาร้ารูปแบบใหม่ 2 ชนิด พร้อมกรรมวิธีการผลิต
- 4) แผนธุรกิจของกล้าเชื้อและผลิตภัณฑ์ปลาร้าที่พัฒนาได้

#### 1.5 กรอบแนวความคิดของการวิจัยและขั้นตอนการวิจัย

การหมักปลาร้าโดยทั่วไปนั้นต้องใช้เวลาอย่างน้อย 5-6 เดือน เพื่อให้เกิดการย่อยสลาย สารประกอบอินทรีย์ ในเนื้อปลา โดยเอนไซม์จากปลาและจุลินทรีย์ทำให้เกิดคุณลักษณะเฉพาะ เช่น การพัฒนากลิ่นรสและสีของเนื้อปลาร้า (นันทา, 2549) โดยขั้นตอนในกระบวนการหมักปลาร้า นั้นจะทำให้ โดยผสมปลากับเกลือ ที่มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 10 มีผลทำให้เกิดการย่อยของสารประกอบ อินทรีย์ต่าง ๆ เช่น โปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น โดยกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตจากเนื้อ ปลาและจุลินทรีย์ เป็นผลให้เกิดการพัฒนาเนื้อสัมผัส กลิ่นรสและรสชาติของปลาร้าที่มีลักษณะ เฉพาะตัว มีรายงานเรื่องจุลินทรีย์ที่พบในปลาร้าที่ผลิตขายในท้องตลาด จาก Tanasupawat และคณะ (2000) พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในปลาร้า ได้แก่ *Lactobacillus farciminis*, *L. acidopiscis* และ *Weissella thailandensis* ในขณะที่จากการศึกษาของ Juthong และคณะ (2000) จุลินทรีย์ทั่วไปที่พบในปลาร้าเกือบทั้งหมดเป็นแบคทีเรียชอบเกลือ ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Micrococcus* sp., *Pediococcus* sp. *P. halophilus* และ *Staphylococcus* sp. และ *S. epidermis* โดยพบว่า *Staphylococcus* sp. และ *S. epidermis* พบตั้งแต่เริ่มหมักจนกระทั่งถึง 3-5 เดือน และอาจแสดงบทบาทในเรื่องของการย่อยโปรตีน *P. halophilus* เป็นจุลินทรีย์หลักที่พบในปลาร้าหมักช่วง 3-5 เดือน *Micrococcus* sp., *Bacillus subtilis* และ *B. licheniformis* น่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนเป็นหลัก ส่วน

*Pediococcus* sp. เป็นจุลินทรีย์ที่พบปริมาณน้อยในระหว่างการหมักแต่น่าจะสัมพันธ์กับการสร้างสารให้กลิ่นรสหลักในปลาร้า และเมื่อผู้วิจัยในโครงการนี้ คือ ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา และ ศานต์ เศรษฐชัยมงคล (2558) ได้ศึกษาคัดแยกจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักปลาร้าที่ผลิตในจังหวัดสระบุรีในช่วงการหมักระยะต่าง ๆ พบว่าจุลินทรีย์หลักที่พบมีความแตกต่างจากรายงานข้างต้น กล่าวคือ *Bacillus licheniformis* คัดแยกได้ในช่วง 1-2 เดือนแรกของการหมัก *Virgibacillus halodenitrificans* คัดแยกได้ในเดือนที่ 4 *Staphylococcus nepalensis* คัดแยกได้ในเดือนที่ 8 และพบ *Tetragenococcus halophilus* เป็นจุลินทรีย์หลักที่พบตั้งแต่เดือนที่ 2 ไปจนถึงเดือนที่ 6 โดยจุลินทรีย์ดังกล่าวแสดงคุณสมบัติในการสร้างโปรตีนและน่าจะเกี่ยวข้องกับการสร้างสารที่ให้กลิ่นรสเฉพาะตัวของปลาร้า และเมื่อผู้วิจัยได้ทดลองได้ประเมินวิธีการเตรียมกล้าเชื้อจากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ โดยการฝักฝนให้สามารถเจริญในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสูง และนำไปทดสอบการหมักปลาร้า พบว่าสามารถเร่งกระบวนการหมักปลาร้าได้อย่างมีนัยสำคัญ

การศึกษาเชิงลึกที่เกี่ยวข้องกับ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก ปลาร้า เช่น ชนิดของปลาที่ใช้สภาวะการหมัก และปัจจัยอื่นๆ เช่น ปัจจัยทางภูมิศาสตร์ที่มีอิทธิพล ต่อจุลินทรีย์ท้องถิ่นในระบบนิเวศของการหมักปลาร้า ตลอดจนทราบคุณสมบัติการหมักและเมตาบอไลต์ที่เกิดจากการหมักของจุลินทรีย์แต่ละชนิดในปลาร้าที่ผลิตในแต่ละพื้นที่ ผลการศึกษาดังกล่าวจะทำให้สามารถบ่งชี้อัตลักษณ์และคุณสมบัติพิเศษของปลาร้าในแต่ละพื้นที่ตลอดจนพัฒนา กระบวนการหมักที่มีความจำเพาะกับการผลิตปลาร้าที่สามารถลดระยะเวลาการผลิตได้และยังคงอัตลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ได้จะทำให้สามารถพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อยกระดับคุณภาพการผลิต และผลิตภัณฑ์ปลาร้าที่ผลิตในระดับวิสาหกิจชุมชนและวิสาหกิจชุมชนขนาดกลางและขนาดย่อมได้เป็นอย่างดี

## 1.6 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

กระบวนการผลิตปลาร้าประกอบด้วยขั้นตอนการเลือกปลาวัตถุดิบที่มีขนาดใกล้เคียงกันในการหมัก การทำความสะอาด และการเติมเกลือที่ต้องคำนวณปริมาณเกลือให้เหมาะสม และบรรจุในภาชนะปิด ปล่อยให้เกิดการหมักย่อยเนื้อปลาประมาณ 5 เดือน จนถึง 1 ปี ส่วนมากปลาที่ใช้ทำเป็นปลาน้ำจืดที่หาได้ในท้องถิ่น และเป็นปลาประเภทที่ไม่มีเกล็ด การผลิตปลาร้าจะแตกต่างกันในแต่ละท้องถิ่น ซึ่งอาจแบ่งตามกรรมวิธีการผลิต ได้ดังนี้

- ปลาร้าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปลาร้าที่ผลิตในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีสีน้ำตาลปนดำ นิยมเรียกกันว่าปลาร้าดำ ซึ่งเป็นการเรียกตามกรรมวิธีการผลิตที่มีการใส่รำข้าวระหว่างการหมัก วัตถุดิบในการผลิตปลาร้าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือนิยม

ใช้ปลาเบญจพรรณ คือ ปลาเล็กๆ หลายชนิดนำมาผสมคลุกเคล้ารวมกัน แหล่งผลิตปลาร้าที่มีชื่อเสียงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบได้ในเขตพื้นที่จังหวัด กาฬสินธุ์ อุบลราชธานี ขอนแก่น และนครราชสีมา

- ปลาร้าในภาคกลาง ปลาร้าที่นิยมผลิตในภาคกลางนิยมเรียกกันว่าปลาร้าข้าวคั่ว ซึ่งมีสีเหลืองนวล ส่วนปลาที่ใช้ในการทำปลาร้านั้นจะมีการแบ่งตามชนิดปลา และเรียกปลาร้าที่ได้ตามชนิดของปลา เช่น ปลาร้าปลากะตัก ปลาร้าปลาช่อน ปลาร้าปลาตะเพียน เป็นต้น แหล่งผลิตปลาร้าที่มีชื่อเสียงในภาคกลาง พบได้ในเขตพื้นที่จังหวัด อ่างทอง ชัยนาท นครสวรรค์ สุพรรณบุรี อโยธยา สิงห์บุรี และลพบุรี

ปริมาณการผลิตปลาร้าในแต่ละปีจะมีประมาณ 40,000 ตัน โดยโรงงานที่ผลิตปลาร้าแบ่งออกเป็น 2 ขนาด คือ โรงงานขนาดใหญ่กำลังการผลิตปีละ 500-1,000 ตัน ปัจจุบันมีประมาณ 10-15 แห่ง และโรงงานขนาดกลางและเล็ก กำลังการผลิตปีละ 100-500 ตัน ปัจจุบันมีประมาณ 100-200 แห่ง (ศูนย์วิจัยกสิกรรมไทย, 2004)

การหมักปลาร้าโดยทั่วไปนั้นต้องใช้เวลาอย่างน้อย 5-6 เดือน เพื่อให้เกิดการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ในเนื้อปลา โดยเอนไซม์จากปลาและจุลินทรีย์ ทำให้เกิดคุณลักษณะเฉพาะ เช่น การพัฒนากลิ่นรสและสีของเนื้อปลาร้า (นันทา, 2549) โดยขั้นตอนในกระบวนการหมักปลาร้านั้นจะทำให้โดยผสมปลากับเกลือ ที่มีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 10 มีผลทำให้เกิดการย่อยของสารประกอบอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น โปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น โดยกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตจากเนื้อปลาและจุลินทรีย์ เป็นผลให้เกิดการพัฒนาเนื้อสัมผัส กลิ่นรสและรสชาติของปลาร้าที่มีลักษณะเฉพาะตัว หากกระบวนการย่อยเนื้อปลาร้าเกิดได้ในระยะเวลาน้อยกว่า 5 เดือน ปลาร้าที่ผลิตได้อาจไม่มีกลิ่นรสปลาร้า มีรายงานเรื่องจุลินทรีย์ที่พบในปลาร้าที่ผลิตขายในท้องตลาดจาก Tanasupawat และคณะ (2000) พบว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในปลาร้า ได้แก่ *Lactobacillus farciminis*, *L. acidopiscis* และ *Weissella thailandensis* ในขณะที่จากการศึกษาของ Juthong และคณะ (2000) จุลินทรีย์ทั่วไปที่พบในปลาร้าเกือบทั้งหมดเป็นแบคทีเรียชอบเกลือ ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Micrococcus* sp., *Pediococcus* sp. *P. halophilus* และ *Staphylococcus* sp. และ *S. epidermis* โดยพบว่า *Staphylococcus* sp. และ *S. epidermis* พบตั้งแต่เริ่มหมักจนกระทั่งถึง 3-5 เดือน และอาจแสดงบทบาทในเรื่องของการย่อยโปรตีน *P. halophilus* เป็นจุลินทรีย์หลักที่พบในปลาร้าหมักช่วง 3-5 เดือน *Micrococcus* sp. *Bacillus subtilis* และ *B. licheniformis* น่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนเป็นหลัก ส่วน *Pediococcus* sp. เป็นจุลินทรีย์ที่พบปริมาณน้อยในระหว่างหมักแต่จะสัมพันธ์กับการสร้างสารให้กลิ่นรสหลักในปลาร้า จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่มีบทบาทหลักในการหมักปลาร้ามักจะเป็นแบคทีเรียชอบเค็ม (halophilic bacteria) เป็นจุลินทรีย์หลักที่สามารถเจริญและดำเนินกระบวนการหมักปลาร้า (Sánchez-Porro, 2003) แบคทีเรียชอบเค็มเจริญได้ดีในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ

สูง มีค่า water activity ( $a_w$ ) ต่ำสุดที่แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้คือ 0.75 แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสีย (microbial spoilage) ของอาหารที่มีเกลือสูง เช่น ซีอิ๊ว กะปิ น้ำปลา ปลาเค็ม เต้าเจี้ยว มิโซ (miso) แบคทีเรียชอบเค็ม แบ่งตามความเข้มข้นของเกลือที่ต้องการใช้ในการเจริญได้เป็น 4 พวก ได้แก่ กลุ่มชอบเค็มเล็กน้อย (slightly halophilic bacteria) แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือ ความเข้มข้น ร้อยละ 0.5-3 แหล่งที่พบคือจากปลาและอาหารทะเล กลุ่มชอบเค็มปานกลาง (moderate halophilic bacteria) เจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือ ร้อยละ 3-15 อาหารที่พบแบคทีเรียกลุ่มนี้คือปลาเค็ม เนื้อเค็ม และผักดอง กลุ่มชอบเค็มสูง (extreme halophiles) เจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือ ร้อยละ 15-30 กลุ่มสุดท้ายคือกลุ่มทนเค็ม (halotolerant) สามารถเจริญได้ทั้งสภาพมีเกลือและไม่มีเกลือ โดยทั่วไปแบคทีเรียพวกนี้สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือร้อยละ 5 หรือมากกว่า (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนานนท์, 2557)

การเร่งอัตราการย่อยสลายเนื้อปลาเป็นกระบวนการที่ลดระยะเวลาหมักปลาร้าให้สั้นลง โดยการเร่งนั้นจะต้องทำให้ปริมาณโปรตีนที่ถูกย่อยมีค่าใกล้เคียงกับปลาร้าที่หมักตามกรรมวิธีปกติ ซึ่งปลาร้าต้องประกอบด้วยโปรตีนละลายได้ (soluble protein) ไม่น้อยกว่าร้อยละ 50 ของโปรตีนทั้งหมด (นันทา, 2549) ปัจจุบันยังไม่มีรายงานวิธีเร่งการย่อยเนื้อปลาร้า มีเพียงรายงานวิธีเร่งการย่อยเนื้อปลาเพื่อการผลิตน้ำปลา วิธีเร่งการย่อยเนื้อปลาที่ทำได้ง่ายและใช้ต้นทุนไม่สูงนัก เช่น การการสับหรือบดเพื่อลดขนาดของหัวปลา, การลดปริมาณเกลือเพื่อให้จุลินทรีย์เจริญและดำเนินกิจกรรมได้เร็วขึ้น และรวมถึงการเร่งการย่อยเอนไซม์ protease เพื่อย่อยสลายเนื้อปลาโดยตรง เป็นต้น การลดขนาดของหัวปลาโดยการบด อาจเร่งการย่อยเนื้อปลาได้ ในผลิตภัณฑ์ปลาหมักนิยมบดชิ้นปลาจนมีขนาด 3-4 มิลลิเมตร เนื่องจากการย่อยเนื้อปลาจะเกิดได้เร็วกว่าการใช้ปลาทั้งตัว (Tatterson and Windsor, 2010) แนวทางการการลดปริมาณเกลือเพื่อเร่งการย่อยเนื้อปลา ได้รับความสนใจในการนำไปใช้ปรับปรุงกระบวนการผลิตน้ำปลา เนื่องจากการผลิตน้ำปลาใช้เกลือปริมาณมากระหว่างการหมักทำให้การทำงานของเอนไซม์ย่อยเนื้อปลา กลุ่ม protease ที่มาจากกล้ามเนื้อและทางเดินอาหารของปลา มีประสิทธิภาพลดลง เมื่อเอนไซม์ขาดประสิทธิภาพการย่อยสลายเนื้อปลาจึงเกิดได้ช้า ทำให้ระยะเวลาในการหมักน้ำปลาจึงยาวนานถึง 12-18 เดือน ในการผลิตน้ำปลาการใช้เกลือปริมาณมากกว่าร้อยละ 5 ของน้ำหนักปลา ทำให้การทำงานของเอนไซม์ protease มีประสิทธิภาพลดลง แต่การลดปริมาณเกลือให้ต่ำกว่าร้อยละ 5 เพื่อให้เอนไซม์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ อาจทำให้เนื้อปลาเน่าเสียจากแบคทีเรีย (Gildberg et al., 1984) การใช้เกลือปริมาณร้อยละ 10 สามารถหยุดการเน่าเสียของปลาได้อย่างสมบูรณ์ (Beddows and Ardeshtir, 1979) ในการเร่งการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลาโดยการเติม protease เพื่อเร่งการย่อยเนื้อปลาร้านั้น ยังไม่มีรายงานการศึกษาที่ชัดเจนการศึกษาแต่อย่างใด แต่มีรายงานว่าแหล่งของ protease ที่ใช้เร่งการย่อยปลา ควรมาจากพืชที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น เช่น สับปะรดซึ่งมีเอนไซม์กลุ่ม protease คือ bromelain และมะละกอ มี protease คือ papain (Potter and Hotchkiss, 1998)

แนวทางที่น่าสนใจอีกแนวทางหนึ่งคือ การใช้ล้าเชื้อจุลินทรีย์ในการเร่งการหมักเนื้อปลา โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติการหมักที่เหมาะสม เช่น ทนเกลือสูง สร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนได้มากและหรือสร้างสารให้กลิ่นรสของปลาหมักได้ดี โดยเทคโนโลยีล้าเชื้อ (Starter culture technology) มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องและประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ทั้งประเภทเครื่องดื่ม เช่น เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ผลิตภัณฑ์นมหมัก ตลอดจนอาหารกลุ่มธัญพืช และผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ทั้งนี้เนื่องจากการหมักอาหารด้วยการเติมล้าเชื้อ ทำให้สามารถควบคุมกระบวนการหมัก และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้อย่างสม่ำเสมอ และสามารถพัฒนาต่อเนื่องในเรื่องของการหมักเพื่อเพิ่มคุณภาพด้านกลิ่นรส โดยการใช้พัฒนาล้าเชื้อให้อยู่ในรูปแบบของ multi-starter เพื่อให้ล้าเชื้อมีความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่อย่างจำเพาะในกระบวนการหมักได้ (Fleet, 2003) ในส่วนของอาหารไทยที่มีการพัฒนาเรื่องการใช้เทคโนโลยีดังกล่าวคือ แหนมไปโอเทค โดย ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไปโอเทค) แต่ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานเรื่องการนำเทคโนโลยีดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการหมักปลาร้าแต่อย่างใด

เครื่องปรุงรสอาหารต่าง ๆ เช่น น้ำปลา ปลาร้า และซอสต่าง ๆ เป็นวัตถุดิบสำคัญในการประกอบอาหารในทุกครัวเรือน เพื่อเพิ่มกลิ่นและรสชาติของอาหารให้มีเอกลักษณ์และดึงดูดผู้บริโภค น้ำปลา ปลาร้า และซอสปรุงรสต่าง ๆ จะเป็นแหล่งโปรตีนและกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายเนื่องจากการย่อยสลายของเนื้อปลาจะได้โปรตีนสายสั้น ๆ กรดอะมิโนอิสระที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย และสารให้กลิ่นรส การย่อยสลายของเนื้อปลาในกระบวนการแปรรูปน้ำปลา และปลาร้า เกิดจากกระบวนการย่อยโดยเอนไซม์ภายในตัวปลาและจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในวัตถุดิบซึ่งจำเป็นต้องใช้เกลือปริมาณมากเพื่อป้องกันการเน่าเสียและเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ต้องการ จึงจำเป็นต้องใช้ระยะเวลา 10-12 เดือนในการแปรรูป ปัจจุบันมีงานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนากระบวนการหมักอาหารหมักต่าง ๆ เพื่อลดระยะเวลาในการหมัก และเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ เช่น การใช้เอนไซม์เพื่อเร่งการย่อยสลายเนื้อปลาในการหมักน้ำปลา การเพิ่มอุณหภูมิการหมักเพื่อลดเวลาในการหมักซีอิ๊วจากถั่วเหลืองและการใช้จุลินทรีย์เพื่อเร่งกระบวนการหมักอาหารหมักประเภทต่าง ๆ โดยมีการใช้วัตถุดิบทางการเกษตร ไม่ว่าจะเป็น ข้าว ถั่ว และธัญพืชต่าง ๆ เพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตล้าเชื้อเร่งกระบวนการหมักหรือที่เรียกว่า “โคจิ” คำว่าโคจิเป็นคำรวมสามารถจำแนกชนิดของโคจิออกตามชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต เช่น Kome (rice) Koji หมายถึง โคจิที่ทำจากข้าว muji (barley) Koji หมายถึง โคจิที่ทำจากข้าวบาร์เลย์ Soy bean koji เป็นโคจิที่ทำจากถั่วเหลือง โคจิอาจมีชื่อเรียกตามสีของสปอร์หรือเม็ดสี (pigment) ที่เชื้อราสร้างขึ้น เช่น Ki Koji (สีดำ) เป็นโคจิจากเชื้อรา *Aspergillus awamori* และ

beni-koji (สีแดง) เป็นโคจิจากเชื้อรา *Monascus purpurens* นอกจากนี้ โคจิอาจมีชื่อเรียกตามผลิตภัณฑ์ที่ได้เช่น miso-koji, shoyu-koji และ sake – koji เป็นต้น (Hui *et al.*, 2004) ระหว่างการผลิตโคจิ เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตโคจิจะผลิตเอนไซม์ (enzyme) หลายชนิด เช่น อะไมเลส (amylase) amyloglucosidase และ โปรติเอส (protease) เพื่อย่อยโมเลกุลสายยาวของสตาร์ช (starch) ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการหมัก (Murakami. 1971; Narahara *et al.*, 1982) เชื้อราในการผลิตโคจิ หรือ *Aspergillus oryzae* ถูกค้นพบเมื่อปี 1876 เป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในกระบวนการหมักชีว นอกจากนี้ยังเป็นเชื้อราที่มีความปลอดภัยเนื่องจากไม่มีการตรวจพบยีนส์ที่ใช้ในการสร้างสารพิษอฟลาทอกซิน (Aflatoxin) (Machida *et al.*, 2005). โคจิจึงเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารหมักหลายชนิด เนื่องจากโคจิเป็นแหล่งของเอนไซม์เพื่อย่อยวัตถุดิบให้เกิดเป็นสารอาหารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและเปลี่ยนเป็นสารให้กลิ่นรสต่างๆ ดังนั้น การประยุกต์ใช้ข้าวซึ่งเป็นอาหารที่บริโภคอย่างแพร่หลายในประเทศ และเป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่ายนำมาผลิตโคจิ และใช้ในการเร่งกระบวนการหมักสำหรับการผลิตอาหารหมักชนิดต่างๆ จะเป็นทางเลือกในการลดระยะเวลาการหมัก ลดต้นทุนด้านระยะเวลาในการผลิต เพิ่มมูลค่าของสินค้า และถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชนเพื่อเป็นทางเลือกในการสร้างรายได้จากอาชีพเสริมให้แก่เกษตรกร และเป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่

แนวทางสำคัญในกระบวนการพัฒนากล้าเชื่อนั้น ต้องเริ่มต้นจากแหล่งในการคัดแยกกล้าเชื้อ ซึ่งมีรายงานการวิจัยจากหลายแหล่งที่พบว่ากล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีควรเป็นจุลินทรีย์กลุ่มออโตโคโนส (autochthonous) ซึ่งหมายถึงจุลินทรีย์ที่มีแหล่งกำเนิดหรือคัดแยกจากอาหารที่ต้องการผลิต เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้มีความคุ้นเคยกับ สารอาหาร สมบัติทางกายภาพและเคมี และสภาวะของอาหารเหล่านั้นทำให้เมื่อนำมาพัฒนาเป็นกล้าเชื้อจึงสามารถปรับตัวให้เจริญและดำเนินกิจกรรมการหมักได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กล้าเชื้อที่มีแหล่งกำเนิดหรือคัดแยกจากแหล่งอื่นที่เรียกว่า อัลโลโคโนส (allochthonous) นอกจากนี้การที่จุลินทรีย์ออโตโคโนสสามารถดำเนินการหมักได้อย่างสมบูรณ์จึงช่วยลดความเสี่ยงในการสร้างสารเมตาบอไลต์ที่ไม่ปลอดภัยได้ดี (Degre, 1993, Chanprasartsuk and Prakitchaiwattana 2015) ดังนั้นหากในการพัฒนาระบบการหมักปลาร้าโดยใช้เทคโนโลยีกล้าเชื่อนั้นจึงจำเป็นต้องเริ่มศึกษาตั้งแต่จุลินทรีย์ในระบบการหมักของปลาร้าในแต่ละท้องถิ่นเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีบทบาทหลักในการหมักปลาร้า ศึกษาคุณสมบัติการหมัก เพื่อพัฒนาให้เป็นกล้าเชื้อจำเพาะกับการหมักปลาร้าที่มีอัตลักษณ์ของแต่ละพื้นที่ได้

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีโอมิิกส์ (Omics sciences) ได้แก่ จีโนมิกส์ (genomics) ทรานสคริปโตมิิกส์ (transcriptomics) โปรตีโอมิกส์ (proteomics) และเมตาโบโลมิิกส์ (metabolomics) นับว่ามีบทบาทสำคัญอย่างมากในการศึกษาองค์ประกอบทางชีวเคมีของพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ นับตั้งแต่ระดับพันธุกรรม การแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ การสังเคราะห์โปรตีน รวมถึงการวิเคราะห์หาสารเมตาโบไลต์ที่เกี่ยวข้องกับคุณลักษณะที่สนใจ ในปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีโอมิิกส์มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิจัยทางด้านการเกษตรและอาหาร (foodomics) (Ibáñez and Cifuentes, 2014) โดยเฉพาะการนำเทคโนโลยีเมตาโบโลมิิกส์มาใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เช่น ไส้กรอกหมัก ซาลามี ขนมหังจากแป้งหมัก นมเปรี้ยว เนยแข็ง ไวน์ ผักดอง เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เมล็ดโกโก้ ผลิตภัณฑ์จากถั่ว เป็นต้น (Mozzi et al., 2013) โดยผลที่ได้จะอยู่ในรูปแบบข้อมูลการวิเคราะห์สารเมตาโบไลต์โดยรวม เรียกว่า “เมตาโบโลม” (metabolome) เปรียบเสมือนลายพิมพ์ระดับโมเลกุล (molecular fingerprint) ซึ่งมีความสัมพันธ์จำเพาะกับกิจกรรมของจุลินทรีย์กล้ำเชื้อ ทั้งในระหว่างกระบวนการหมัก การบ่ม และการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์เหล่านั้น (Mozzi et al., 2013) อย่างไรก็ตามการนำเทคโนโลยีนี้มาใช้ในการศึกษาวิจัยด้านวิทยาศาสตร์การอาหารในประเทศไทยนั้นยังค่อนข้างจำกัด เนื่องด้วยเป็นศาสตร์ที่ค่อนข้างใหม่ และต้องอาศัยการบูรณาการกับนักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญในต่างสาขา โดยเฉพาะทางด้านเคมีวิเคราะห์ ด้วยเครื่องมือขั้นสูง (high-throughput chemical analysis) เพื่อให้ได้ข้อมูล metabolome ตามที่ต้องการ และการประมวลผลข้อมูลที่ได้ด้วยเทคนิคทางเคโมเมตริกซ์ (chemometrics) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์หารูปแบบ และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูล metabolome ระหว่างตัวอย่างด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร (multivariate statistical analysis) เช่น การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis) หรือการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (cluster analysis) (Skov et al., 2014) โดยข้อมูลที่ได้จะช่วยพัฒนาองค์ความรู้ใหม่ เพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของผลิตภัณฑ์อาหาร และกลไกการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเหล่านั้นในระหว่างกระบวนการหมัก การเก็บรักษา และคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ (Settachaimongkon et al., 2014b; Mozzi et al., 2013) อีกทั้งสามารถประยุกต์ใช้ข้อมูลจากการวิเคราะห์หารูปแบบของ metabolome ร่วมกับการประเมินผลด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร เพื่อระบุหาสารที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (potential biomarker) สำหรับใช้ระบุอัตลักษณ์ (food authentication) หรือตรวจสอบแหล่งที่มาของวัตถุดิบและส่วนผสม (traceability) สัมพันธ์กับทำเลที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ (geographic identity) ของแหล่งผลิตในเขตพื้นที่เฉพาะ หรือกระบวนการแปรรูปเฉพาะของผลิตภัณฑ์ (Cubero-Leon et al., 2014) รวมถึงการตรวจหาสารเมตาโบไลต์ที่มีผลต่อความปลอดภัยของผู้บริโภคได้

การบริโภคปลาร้าจำกัดอยู่ในวงแคบ เนื่องจากผู้บริโภคไม่ชอบกลิ่น และไม่มั่นใจในเรื่องความสะอาดทั้งในขั้นตอนการผลิตและการจัดจำหน่าย เนื่องจากเชื่อว่าทั้งผู้ผลิตและผู้จำหน่ายนั้นไม่ค่อย

พิถีพิถันในเรื่องความสะอาดมากนัก บริษัท ศูนย์วิจัยกสิกรไทย จำกัดได้ทำการสำรวจพฤติกรรมผู้บริโภคพบว่าเกือบร้อยละ 60 ของผู้ที่ตอบแบบสอบถามไม่รับประทานปลาร้า เนื่องจากไม่ชอบกลิ่นและไม่แน่ใจในเรื่องความสะอาด อย่างไรก็ตามปัจจุบันการจำหน่ายปลาร้าในประเทศมีการพัฒนาในเรื่องบรรจุภัณฑ์ให้มีความสะอาด ถูกสุขอนามัย และนำรับประทานมากขึ้น เช่น การใส่ขวดแก้วติดฉลากแยกประเภทปลา หรือทำเป็นผลิตภัณฑ์ปลาร้าสำเร็จรูปบรรจุหีบห่ออย่างสวยงาม เป็นต้น รวมทั้งมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาร้ามาเป็น “น้ำปลาร้าต้มสุก” ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นเครื่องปรุงรสอาหารได้ เช่นเดียวกับน้ำปลา และมีการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตโดยอาศัยเครื่องจักรในการผลิตที่ทันสมัยมากขึ้นในการทำปลาร้าผง ซึ่งนอกจากจะช่วยอำนวยความสะดวกให้กับผู้บริโภค เนื่องจากสามารถนำไปละลายกับน้ำอุ่นและเติมน้ำมันมะนาวก็สามารถบริโภคได้ทันทีแล้ว ยังสามารถกำจัดจุดอ่อนของผลิตภัณฑ์ปลาร้าคือลดกลิ่น ซึ่งทำให้สามารถขนส่งและเก็บรักษาได้สะดวกมากยิ่งขึ้นด้วย ทำให้ผู้บริโภคยอมรับปลาร้ามากขึ้นซึ่งเท่ากับเป็นการขยายฐานลูกค้า โดยสามารถขยายสถานที่วางจำหน่ายเข้าสู่ห้างสรรพสินค้าได้สำเร็จ ดังนั้นหากสามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์แปรรูปปลาร้ารูปแบบใหม่ๆ ที่น่าสนใจ รสชาติอร่อย รูปลักษณ์สวยงาม และมีความหลากหลายได้ จะช่วยเปลี่ยนทัศนคติของผู้บริโภคที่มีต่อปลาร้าให้ดีขึ้นได้จะเป็นการเพิ่มโอกาสทางตลาดของปลาร้าได้เป็นอย่างดี ปัจจัยเอื้อในการขยายตัวของการผลิตปลาร้าที่สำคัญอีกข้อหนึ่ง คือ การส่งเสริมการลงทุนการแปรรูปผลิตภัณฑ์ปลาร้าเพื่อเพิ่มมูลค่าให้หลากหลาย เช่น การทำปลาร้ากระป๋องหรือปลาร้าผงทั้งเพื่อการจำหน่ายในประเทศและเพื่อการส่งออก เป็นต้น ผลิตภัณฑ์แปรรูปรูปแบบใหม่จากปลาร้านี้จะส่งเสริมให้มีการขยายตัวของการผลิตผลิตภัณฑ์ปลาร้าที่มีคุณภาพที่ได้มาตรฐานสากลมากยิ่งขึ้น เท่ากับจะเป็นการส่งเสริมให้ฐานลูกค้าของผลิตภัณฑ์ปลาร้าเพิ่มขึ้น และใช้เป็นมาตรการในการส่งเสริมการส่งออก ทำให้ลูกค้าในต่างประเทศมีความมั่นใจในผลิตภัณฑ์ปลาร้ามากขึ้น

## 1.7 วิธีการดำเนินการวิจัย

1.7.1 ศึกษาข้อมูลกรรมวิธีผลิตปลาร้า คุณลักษณะของปลาร้า ที่ผลิตในระดับวิสาหกิจชุมชน และ วิสาหกิจชุมชนขนาดกลางและขนาดย่อมในพื้นที่จังหวัด นครราชสีมา ชัยภูมิ อุตรธานี หนองคาย สกลนคร และนครพนม เพื่อประเมินอัตลักษณ์ของปลาร้าและพัฒนากระบวนการผลิต

1.7.1.1 สํารวจข้อมูลการผลิตปลาร้าและการเก็บตัวอย่าง สํารวจและเก็บตัวอย่างปลาร้าโดยเลือกจากจังหวัดละ 2 อำเภอ สุ่มเก็บตัวอย่างจากผู้ผลิตวิสาหกิจและวิสาหกิจชุมชน ขนาดกลางและขนาดย่อม

ปัจจัยควบคุมที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการการคัดเลือกตัวอย่างปลาร้าในแต่ละพื้นที่หลัก (จังหวัด) มีดังต่อไปนี้

- แหล่งน้ำที่ใช้ในการผลิตปลาร้าวัตถุดิบแหล่งเดียวกัน อย่างน้อย 3 ตัวอย่าง



- แหล่งเกลือที่ใช้ในการหมักแหล่งเดียวกัน อย่างน้อย 3 ตัวอย่าง
- ชนิดปลาที่ใช้ในการหมักชนิดเดียวกัน อย่างน้อย 3 ตัวอย่าง
- ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักที่เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย อย่างน้อย 3 ตัวอย่าง

รวบรวมข้อมูลกระบวนการผลิต ได้แก่ แหล่งและชนิดของวัตถุดิบการขนส่งการเตรียมวัตถุดิบและส่วนผสม สภาวะการหมักและระยะเวลาวัสดุอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการผลิต โดยการสัมภาษณ์และใช้แบบสอบถาม (ภาคผนวก ฉ) รวมจำนวนตัวอย่างที่เป็นตัวแทนประชากรในการศึกษาเพื่อนำไปวิเคราะห์สมบัติทั่วไปในห้องปฏิบัติการ มีค่า  $n$  เท่ากับ 36 ตัวอย่าง จำนวนประชากรเพื่อนำไปศึกษาสารระเหยในตัวอย่างปลาร้า มีค่า  $n$  เท่ากับ 62 ตัวอย่าง

#### 1.7.1.1.1 ศึกษาคุณสมบัติทั่วไปของตัวอย่างปลาร้า ได้แก่

- คุณสมบัติทั่วไป ได้แก่ น้ำหนักรวมและน้ำหนักเนื้อ ลักษณะปรากฏ สี กลิ่นรสเนื้อสัมผัส
- คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ ได้แก่ proximate analysis ปริมาณเกลือ ค่าความ เป็นกรดต่าง (ภาคผนวก ก1)
- คุณสมบัติทางจุลชีววิทยา ได้แก่ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนยีสต์ และรา และ *Staphylococcus aureus* (ภาคผนวก ก2)

ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปรับสัดส่วนตัวอย่างเนื้อปลาร้าต่อน้ำในอัตราส่วน 60:40

#### 1.7.1.1.2 ศึกษาอัตลักษณ์และวิเคราะห์หาสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย

ศึกษาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุลของปลาร้า โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางเมตาโบโลมิกส์ (metabolomics analysis) วิเคราะห์หาสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Bio-markers) สำหรับตรวจสอบอัตลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ปลาร้า

- วิเคราะห์องค์ประกอบโดยรวมของสารเมตาโบไลต์ชนิดระเหยง่าย (volatile metabolites) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาร้า โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย Headspace Solid Phase Micro-Extraction coupled with Gas chromatography /Mass spectrometry (headspace SPME-GC/MS) (ภาคผนวก ข1)
- วิเคราะห์องค์ประกอบโดยรวมของกรดอะมิโน ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาร้า โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (ภาคผนวก ข2)

เปรียบเทียบข้อมูล metabolome ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาร้า โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร (multivariate analysis) เช่น การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis) หรือการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (cluster analysis) เพื่อหาข้อมูลแบบแผนทางชีวโมเลกุล (Biomolecular profile) ร่วมกับผลการวิเคราะห์สมบัติของปลาร้าจากข้อ 1.7.1.1.1 และข้อมูลกระบวนการผลิต เพื่อบ่งชี้อัตลักษณ์ของปลาร้าในแต่ละรูปแบบ และ/หรือแต่ละเขตพื้นที่ และคัดเลือกสารหลัก (key compounds) ที่จะใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Bio marker) อัตลักษณ์ของปลาร้าที่ผลิตจากเขตพื้นที่ที่แตกต่างกัน และใช้สำหรับติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารดังกล่าวในระหว่างกระบวนการผลิต (dynamic change)

#### 1.7.1.2 จัดทำฐานข้อมูลเรื่องกระบวนการผลิตสมบัติและอัตลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ปลาร้า

รวบรวมข้อมูลการผลิต สมบัติทั่วไป ได้แก่ สมบัติทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยา ของผลิตภัณฑ์ปลาร้า ที่ได้จากข้อ 1.7.1.1.1 ข้อมูล metabolome ที่ได้จากข้อ 1.7.1.1.2 จัดทำ flavor note (ชื่อสาร ลักษณะกลิ่นเฉพาะ partway ที่สร้าง) และกำหนดอัตลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ปลาร้าที่ผลิตในระดับวิสาหกิจชุมชนและวิสาหกิจชุมชนขนาดกลางและขนาดย่อม ในเขตพื้นที่ภาคอีสานตอนบนและตอนกลางของประเทศไทย ร่วมกับข้อมูลเรื่อง ลักษณะปรากฏ สี และเนื้อสัมผัส

### 1.7.2 ศึกษารูปแบบการหมักและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักปลาร้าเพื่อการพัฒนาเทคโนโลยี การผลิตโดยการเร่งกระบวนการหมัก

#### 1.7.2.1 ศึกษาชุมชนของจุลินทรีย์ในระบบการหมักปลาร้า

ตรวจสอบรูปแบบของจุลินทรีย์และบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการหมักในแต่ละช่วงของการหมักด้วยเทคนิค cultural independent (ภาคผนวก ค1) และเทคนิค cultural independent ด้วยวิธี Reverse Transcriptase PCR Denaturing gradient gel electrophoresis (RT-PCR-DGGE) (ภาคผนวก ค2) ระบุสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยาและจัดทำ culture collection ของสายพันธุ์จุลินทรีย์

ประเมินข้อมูลรูปแบบจุลินทรีย์ที่พบในระบบการหมักปลาร้า ร่วมกับข้อมูลสมบัติทั่วไป ได้แก่ สมบัติทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยา ของผลิตภัณฑ์ปลาร้า ที่ได้จากข้อ 1.7.1.1.1 และข้อมูล metabolome ที่ได้จากข้อ 1.7.1.1.2 และ 1.7.2.2 เพื่อประเมินบทบาทของจุลินทรีย์ที่พบที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักและการสร้างสารเมตาบอไลต์ที่ใช้เป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพของปลาร้า รวมจำนวนตัวอย่างที่เป็นตัวแทนประชากรในการศึกษา

เพื่อนำไปศึกษาจุลินทรีย์ในระบบการหมัก มีค่า  $n$  เท่ากับ 62 ตัวอย่าง

#### 1.7.2.2 คัดเลือกจุลินทรีย์สำหรับนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อ

คัดแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่พบระหว่างกระบวนการหมักปลาร้าที่มีคุณสมบัติ ดังนี้

- คุณสมบัติในการทนเกลือ (ภาคผนวก ค1)
- ความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส (ภาคผนวก ค1)
- คุณสมบัติพิเศษบางประการ เช่น สร้างสารต้านจุลินทรีย์ (ภาคผนวก ค1)  
การสร้างสารให้สีแดง (ภาคผนวก ค1)
- ระบุสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยาและจัดทำ culture collection ของสายพันธุ์จุลินทรีย์ (ภาคผนวก ค1)
- ระบุสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วยการตรวจสอบสมบัติทางชีวเคมีด้วย Vitek system (ภาคผนวก ค1)

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสม ที่คัดแยกจากปลาร้าที่มีอัตลักษณ์แต่ละรูปแบบ โดยพิจารณาจากข้อมูลจากผลการทดลองการทดสอบคุณสมบัติทั้ง 4 ข้อ เพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติการหมักปลาร้าเบื้องต้น

ประเมินคัดเลือกจุลินทรีย์สำหรับนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นกล้าเชื้อพร้อมใช้สำหรับหมักปลาร้าที่มีอัตลักษณ์ในแต่ละรูปแบบ ทดสอบการเจริญร่วมกัน สมบัติด้านความปลอดภัยของจุลินทรีย์ โดยการประเมินสมบัติการสร้างสารกลุ่ม Biogenic amine ด้วยวิธีการตรวจการมี Biogenic amine gene ประเภท JV16/JV17, HD3/HD4 และ TD2/TD5 ในการสร้างสาร Histamine, Petrescine และ Tyramine ทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ โดยการทดสอบการทำลายเซลล์ไลน์ชนิด CaCo2 (ภาคผนวก ง) เพื่อจัดทำกล้าเชื้อสำหรับหมักปลาร้าที่เป็นอัตลักษณ์ของปลาร้าใน 3 รูปแบบ และ/หรือ ในเขตพื้นที่

#### 1.7.3 การพัฒนากล้าเชื้อพร้อมใช้สำหรับเร่งกระบวนการหมักปลาร้า

ประเมินวิธีการผลิตกล้าเชื้อพร้อมใช้ แบบ active dried ในรูปแบบของ “ก้อนกล้าเชื้อราแห้ง”

##### 1.7.3.1 ประเมินสภาวะในการเตรียมราและการอบแห้ง

ประเมินปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมราเพื่อใช้ในการเป็น matrix สำหรับกักเก็บและปกป้องเซลล์จุลินทรีย์ระหว่างทำแห้งและเก็บรักษา โดยแปรปัจจัย ที่เกี่ยวข้องดังนี้

- ชนิดของรา ได้แก่ ราสด และ ราคั่ว

- อัตราส่วนรำและน้ำสำหรับขึ้นรูปก้อนรำ ได้แก่ อัตราส่วน รำ 5 ส่วนต่อน้ำ 6 ส่วน (5:6) และอัตราส่วน รำ 5 ส่วนต่อน้ำ 10 ส่วน (5:10)
- การขึ้นรูปก้อนรำ ได้แก่ รำผง รำรูปก้อนกลม และ รำรูปก้อนแบน

#### 1.7.3.2 ประเมินสภาวะในการเตรียมเซลล์แบคทีเรีย

นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากข้อ 1.7.2.2 มาประเมินรูปแบบการเตรียมกล้าเชื้อให้สามารถดำเนินการหมักปลาร้าภายใต้ภาวะการหมักที่มีเกลือสูง ทำการทดลอง 2 ข้าง โดยการแปรปัจจัยดังต่อไปนี้

- องค์ประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ ได้แก่ แปรปริมาณเกลือและส่วนผสม แบ่งออกเป็น สูตร A, B และสูตร C
- รูปแบบการแปรลำดับในการเลี้ยงในอาหาร เพื่อฝึกฝนเซลล์ให้พร้อมกับการเจริญในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง ได้แก่ รูปแบบที่ 1 และรูปแบบที่ 2

รายละเอียดของสูตรอาหาร และรูปแบบการแปรลำดับในการเลี้ยง แสดงในภาคผนวก ฉ ที่ซึ่งได้นำไปใช้เป็นข้อถ้อยสิทธิในการยื่นจดสิทธิบัตรตรวจสอบอัตราการเจริญ

เลือกภาวะที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ผสมกับรำเพื่อเตรียมเป็นกล้าเชื้อในก้อนรำแห้ง

#### 1.7.3.3 ประเมินสภาวะในการทำแห้ง

โดยประเมินปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่างๆ ดังนี้

- ประเมินวิธีผสมกล้าเชื้อและรำ จากข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากข้อ 1.7.3.1 และ 1.7.3.2 ขึ้นรูปและทำแห้ง
- ประเมินผลการเติมสารปกป้องเซลล์ ได้แก่ ไม่เติม และเติมสารกลีเซอรอล
- ประเมินอุณหภูมิเวลา และ รูปแบบในการทำแห้ง ได้แก่ การทำแห้งแบบ single step (แปรอุณหภูมิ 2 ระดับ คือ 40 และ 60 °C อบอุ่นกระทั่งความชื้นคงที่) และ two step (ขั้นที่ 1 70 °C, 30 ขั้นที่ 2 60 °C โดยแปรเวลาในการอบ 60 °C เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง)

ตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์โดยการ spread plate บน NA ที่มีเกลือร้อยละ 5 และตรวจสอบแอกติวิตีของเชื้อในก้อนรำโดยการประเมินอัตราการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ และการเจริญในน้ำปลาร้า

#### 1.7.3.4 ตรวจสอบแอกติวิตีของกล้าเชื้อและอายุการเก็บ

บรรจุก้อนกล้าเชื้อในถุงที่ป้องกันการซึมผ่านของน้ำและออกซิเจนเก็บที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ในก้อนรำ และตรวจสอบแอกติวิตีของเชื้อในก้อนรำโดยการประเมินอัตราการเจริญในอาหารน้ำปลาร้าทุก 1 เดือน เพื่อประเมินอายุการเก็บของก้อนกล้าเชื้อ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

ผลิตก้อนกล้าเชื้อจากวิธีที่พัฒนาได้ โดยผลิตเป็นกล้าเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่

- กล้าเชื้อชนิดที่ 2 คือ กล้าเชื้อสำหรับหมักปลาร้าที่ผลิตตามวิธีการผลิต ปลาร้าในพื้นที่จังหวัดสกลนครและนครพนม
- กล้าเชื้อชนิดที่ 2 คือ กล้าเชื้อสำหรับหมักปลาร้าที่ผลิตตามวิธีการผลิต ปลาร้าในพื้นที่จังหวัดสกลนครและนครพนม
- กล้าเชื้อชนิดที่ 3 คือ กล้าเชื้อสำหรับหมักปลาร้าที่ผลิตตามวิธีการผลิต ปลาร้าในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและชัยภูมิ

1.7.3.5 ทดสอบคุณสมบัติการหมักและคุณภาพของกล้าเชื้อในปลาร้าทั้ง 3 ชนิด ตามวิธี ของแต่ละพื้นที่พื้นที่ละ 1 ตัวอย่าง ทดลองหมัก 2 ระดับ ได้แก่ การหมักระดับ 2 และ 10 กิโลกรัม ทำการทดลอง 2 ซ้ำ (วิธีการจะจัดทำในรูปของคู่มือการผลิตเมื่อสิ้นสุดโครงการ) ติดตามและตรวจสอบสมบัติและเอกลักษณ์ของปลาร้า ทุกเดือนเป็นเวลา 3 เดือน หรือจนกว่าปลาร้าจะมีอัตลักษณ์ใกล้เคียงกับปลาร้าที่ผลิตแบบดั้งเดิม (ประเมินโดยผู้ผลิตปลาร้าในพื้นที่) ดังนี้

- คุณสมบัติทั่วไป ได้แก่ คุณสมบัติทางเคมี กายภาพ และจุลชีววิทยา
- วิเคราะห์องค์ประกอบโดยรวมของสารเมตาโบไลต์ชนิดระเหยง่าย (volatile metabolites)
- วิเคราะห์องค์ประกอบโดยรวมของกรดอะมิโน โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography
- กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส
- ประเมินทางประสาทสัมผัสเบื้องต้นโดยผู้ผลิตปลาร้า

นำปลาร้าที่ได้จากกระบวนการหมักด้วยกล้าเชื้อ ทดสอบคุณภาพของปลาร้าที่หมักได้โดยการนำไปประกอบอาหารที่เป็นที่นิยม ในแต่ละพื้นที่และทดสอบทางประสาทสัมผัส

- ปลาร้าจากกล้าเชื้อชนิดที่ 1 ทดสอบโดยการทำเป็นปลาร้าบองและประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส
- ปลาร้าจากกล้าเชื้อชนิดที่ 2 ทดสอบโดยการเตรียมเป็นน้ำปลาร้าปรุง

ล้มดำ ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

- ปลาร้าจากกล้าเชื้อชนิดที่ 3 ทดสอบโดยการผสมในแกงลาวและประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ทำการทดลองเปรียบเทียบกับ ปลาร้าที่หมักโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ (ตัวอย่างควบคุม) และปลาร้าที่ผลิตแบบดั้งเดิม (ปลาร้าจังหวัดอุดรธานี ใช้ปลาร้าดั้งเดิมที่หมักแล้ว 1 ปี ปลาร้าจังหวัดสกลนคร ใช้ปลาร้าดั้งเดิมที่หมักแล้ว 2 ปี ปลาร้าจังหวัดนครราชสีมา ใช้ปลาร้าดั้งเดิมที่หมักแล้ว 1 เดือน

#### 1.7.4 การพัฒนาผลิตภัณฑ์รูปแบบใหม่จากปลาร้าที่ได้จากการหมักด้วยกล้าเชื้อ

ศึกษาการสร้างผลิตภัณฑ์รูปแบบใหม่โดยนำปลาร้าที่หมักได้จากหัวข้อ 1.7.3.4 โดยการพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาร้ารูปแบบใหม่ในรูปแบบเครื่องปรุงและ/หรือผลิตภัณฑ์ พร้อมบริโภคนั้น คือ ปลาร้าผงพร้อมปรุง และปลาร้าฟูทรงเครื่อง ประเมินวิธีการผลิต ศึกษากระบวนการผลิต พัฒนาสูตร ทดสอบคุณภาพ และคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ ทำการทดลองเปรียบเทียบกับ ปลาร้าที่หมักโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ (ตัวอย่างควบคุม) และปลาร้าที่ผลิตแบบดั้งเดิม

- ทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส เพื่อประเมินการยอมรับของผู้บริโภค (Preferrent test)
- สร้างผลิตภัณฑ์รูปแบบใหม่ต้นแบบ ตรวจสอบมาตรฐานผลิตภัณฑ์

## 1.8 แผนงานโครงการ

ตารางที่ 1 ระยะเวลาในการทำวิจัย ผู้รับผิดชอบโครงการวิจัย

| กิจกรรม*                                                 | เดือนที่ |     |     |       | ผู้รับผิดชอบ  |
|----------------------------------------------------------|----------|-----|-----|-------|---------------|
|                                                          | 1-3      | 4-6 | 7-9 | 10-12 |               |
| 3.1 สํารวจข้อมูลการผลิตปลาร้าและการเก็บตัวอย่าง          |          |     |     |       |               |
| -การศึกษากรรมวิธีผลิตปลาร้า คุณลักษณะของปลาร้า ในพื้นที่ | ←→       |     |     |       | ผศ.ดร.ปรรัตน์ |
| จังหวัด นครราชสีมาและชัยภูมิ                             |          |     |     |       | อ.อัจฉริยา/อ. |
| -การศึกษากรรมวิธีผลิตปลาร้า คุณลักษณะของปลาร้า ในพื้นที่ | ←→       |     |     |       | ดร.ชินจิต     |
| จังหวัด อุตรธานีและหนองคาย                               |          |     |     |       |               |
| -การศึกษากรรมวิธีผลิตปลาร้า คุณลักษณะของปลาร้า ในพื้นที่ | ←→       |     |     |       | อ.ดร.ชินจิต   |
| จังหวัด สกลนครและนครพนม                                  |          |     |     |       |               |
| -การศึกษาอัตลักษณ์และวิเคราะห์หาสารที่สามารถใช้เป็นตัว   | ←→       |     |     |       | อ.ดร.ศานต์/   |
| บ่งชี้ทางชีวภาพ (Bio-markers) และจัดทำฐานข้อมูล          |          |     |     |       | รศ.ดร.ชินจิต  |
| 3.2 ศึกษารูปแบบการหมักและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการ   | ←→       |     |     |       | รศ.ดร.ชินจิต/ |
| หมักปลาร้าเพื่อการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตโดยการเร่ง        |          |     |     |       | อ.ดร.ชินจิต   |
| กระบวนการหมัก                                            |          |     |     |       |               |
|                                                          |          |     |     |       | รศ.ดร.ชินจิต/ |
| 3.3 การพัฒนากล้าเชื้อปลาร้าเพื่อใช้เร่งกระบวนการหมัก     |          | ←→  |     |       | อ.            |
|                                                          |          |     |     |       | ดร.ชินจิต/อ.  |
|                                                          |          |     |     |       | ดร.ศานต์      |
| 3.4 การพัฒนาผลิตภัณฑ์รูปแบบใหม่จากปลาร้าที่ได้จากการ     |          |     | ←→  |       | ผศ.ดร.ปร      |
| หมักด้วยกล้าเชื้อ                                        |          |     |     |       | รัตน์/        |
|                                                          |          |     |     |       | อ.อัจฉริยา    |

## บทที่ 2

---

### ผลการวิจัย



## 2.1 ศึกษาข้อมูลกรรมวิธีผลิตปลาร้า คุณลักษณะของปลาร้า เพื่อประเมินอัตลักษณ์ของปลาร้า

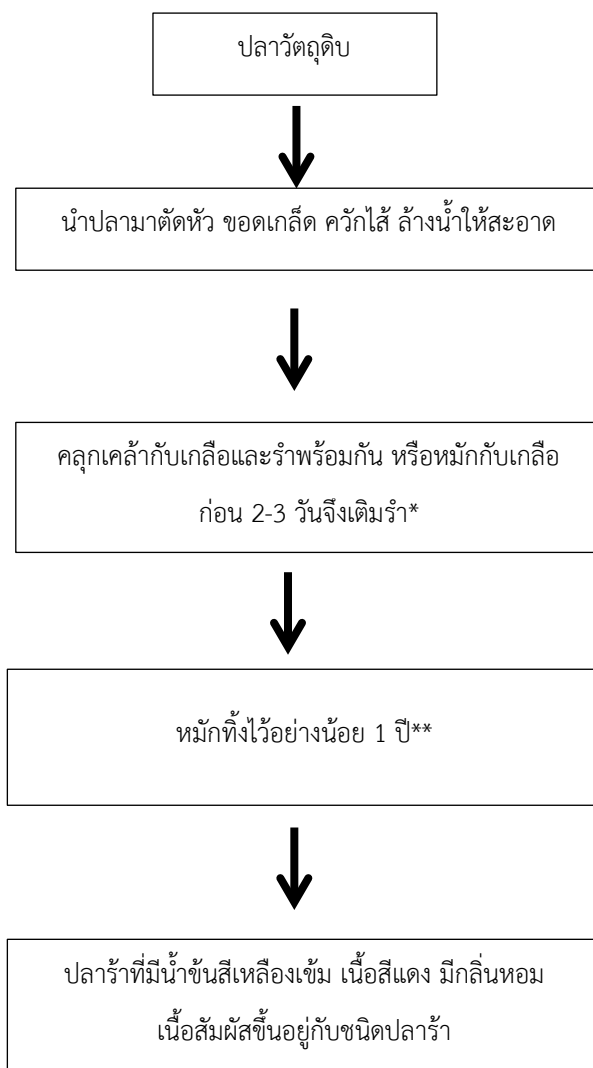
### 2.1.1 การผลิตปลาร้าและคุณลักษณะปลาร้าในพื้นที่จังหวัดอุดรธานีและหนองคาย

จากการสำรวจข้อมูลโดยการสัมภาษณ์ พร้อมกับเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ พบว่า กระบวนการผลิตส่วนใหญ่ในพื้นที่ 2 จังหวัดนี้มีความคล้ายคลึงกันทั้งในเรื่องของแหล่งปลาวัตถุดิบ แหล่งเกลือ และ ขั้นตอนการผลิต ปลาร้ามีสองรูปแบบ คือ ปลาร้าปลาตัว (มักจะใช้ปลาที่มีขนาดใหญ่) และปลาร้าปลารวม (นิยมใช้ปลาขนาดเล็ก) วัตถุดิบปลามาจากสองแหล่งหลัก คือ ปลานิลตกเกรดจากกระชังปลาแม่น้ำโขง และจากเขื่อนห้วยหลวงซึ่งนิยมนำมาผลิตเป็นปลาร้าตัว ส่วนปลาในพื้นที่อ่างเก็บน้ำและ/หรือหนองน้ำที่ใกล้เคียงกับแหล่งผลิตจะนำมาผลิตเป็นปลาร้ารวม ซึ่งส่วนใหญ่ ได้แก่ ปลาขาวสร้อย ปลาตะเพียน และปลาแขยง ถ้าปลามีขนาดเล็กและมีความหลากหลายของชนิดปลามากจะหมักเป็นปลาร้าโหนดหรือปลาร้าเนาเพื่อส่งขายโรงงานทำน้ำปลาร้าส้มตำ เกลือที่ใช้ในการหมักในพื้นที่สองจังหวัดนี้มาจากแหล่งหลักคือ เกลือสินเธาว์ที่ผลิตจากอำเภอบ้านดุง จังหวัดอุดรธานี ซึ่งเป็นเกลือจากน้ำหน้าดินระเหยแห้ง โดยส่วนใหญ่ปลาร้าในพื้นที่นี้มีขั้นตอนการผลิต (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1) ประกอบด้วยการทำความสะอาดปลาควักไส้ล้างน้ำ แล้วจึงนำมาคลุกกับเกลือและรำ หากปลามีปริมาณมากจะโรยเกลือและรำสลับกับปลาเป็นชั้นๆ บางรายอาจเติมน้ำเล็กน้อยเพื่อช่วยละลายเกลือ บางรายอาจหมักปลากับเกลือก่อนประมาณ 2-5 วันแล้วจึงเติมรำภายหลังซึ่งส่วนใหญ่วิธีการผลิตแบบนี้จะเป็นการผลิตของรายที่ผลิตในปริมาณมาก ทั้งนี้เพื่อชะลอการเน่าเสียของปลาในช่วงที่มีปลาวัตถุดิบมาก ระยะเวลาในการหมักส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงนานกว่า 6 เดือน และ 12 เดือนขึ้นไป การหมักส่วนใหญ่หมักในโอ่งมังกร บางพื้นที่หมักในไหดินเผาขนาดใหญ่ และมักจะใช้ไม้ไผ่สานปิดปากโอ่งเพื่อป้องกันปลาลอยในระหว่างการหมัก ในช่วง 1-2 เดือนแรกจะมีน้ำล้นออกจากโอ่งซึ่งเกิดจากผลของเกลือ รวมถึงกิจกรรมการย่อยโปรตีนของจุลินทรีย์ทำให้เกิดเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนของเนื้อปลาส่งผลให้น้ำหลุดออกจากเส้นใยโปรตีน บางรายจึงเติมน้ำเกลือเพิ่มเพื่อช่วยรักษาคุณภาพการหมัก คุณลักษณะของปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่ ดังแสดงในภาพที่ 2 พบว่าปลาร้าตัวที่มีคุณภาพตามที่คุณผลิตต้องการจะต้องมีเนื้อแน่น เนื้อต้องไม่ยุบ และมีสีแดง ต้องมีกลิ่นหอมที่เกิดจากการหมัก นิยมนำไปจำหน่ายเป็นปลาร้าชิ้นหรือแปรรูปเป็นปลาร้าบองซึ่งต้องการเนื้อปลาร้ามาก ส่วนปลาร้ารวมถ้าเป็นปลาที่มีขนาดเล็กนิยมนำไปใช้เป็นเครื่องปรุงรสอาหารและ/หรือเตรียมเป็นน้ำปรุงรสส้มตำ

ตารางที่ 1 ข้อมูลการผลิตและคุณลักษณะปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดอุดรธานีและหนองคาย

| รหัส<br>ตัวอย่าง | ชนิดปลาร้า | พื้นที่ผลิต              | ปลา/แหล่งน้ำ                         | ชนิดแหล่งเกลือ     | ส่วนผสม*<br>(ปลา:เกลือ:<br>รำ) (kg) | ระยะเวลา<br>ในการหมัก<br>(เดือน) |
|------------------|------------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| 1UN-S            | ปลาร้าตัว  | อุดร/เมือง               | นิล/กระซังน้ำโขง                     | สินเธาว์/บ้านดุง   | 10:2:1                              | >8                               |
| 2UN-S            | ปลาร้าตัว  | หนองคาย/ศรี<br>เชียงใหม่ | นิล/กระซังน้ำโขง                     | สินเธาว์/บ้านดุง   | N                                   | >6                               |
| 3UN-S            | ปลาร้าตัว  | หนองคาย/ศรี<br>เชียงใหม่ | นิล/กระซังน้ำโขง                     | สินเธาว์/บ้านดุง   | 10:3:1                              | >6                               |
| 4UN-S            | ปลาร้าตัว  | หนองคาย/ศรี<br>เชียงใหม่ | นิล/กระซังน้ำโขง                     | สินเธาว์/บ้านดุง   | N                                   | >6                               |
| 5UN-S            | ปลาร้าตัว  | อุดร/เมือง               | นิล/เขื่อนห้วยหลวง                   | สินเธาว์/บ้านดุง   | 10:1:1                              | >12                              |
| 6UN-S            | ปลาร้าตัว  | อุดร/เมือง               | สร้อย/เขื่อนห้วยหลวง                 | สินเธาว์/บ้านดุง   | 20:1.5:1                            | >8                               |
| 7UN-M            | ปลาร้ารวม  | อุดร/สร้างคอม            | สร้อย ขาวหัวแข็ง/อ่างน้ำ<br>พาน      | สินเธาว์/บ้านดุง   | 10:1.5:1                            | >6                               |
| 8UN-M            | ปลาร้ารวม  | อุดร/สร้างคอม            | ชีว ตะเพียน/อ่างน้ำพาน               | สินเธาว์/บ้านดุง   | 10:2.5:1                            | >6                               |
| 9UN-M            | ปลาร้ารวม  | อุดร/สร้างคอม            | แขยง ตะเพียน อ่างน้ำพาน              | สินเธาว์/บ้านดุง   | 10:2:0.1                            | >6                               |
| 10UN-M           | ปลาร้ารวม  | โพนพิสัย/<br>หนองคาย     | แขยง ตะเพียน ชีว/หนองน้ำ<br>ธรรมชาติ | สินเธาว์/บ้านเข็มี | N                                   | >12                              |
| 11 UN-M          | ปลาร้ารวม  | โพนพิสัย/<br>หนองคาย     | แขยง ตะเพียน ชีว/หนองน้ำ<br>ธรรมชาติ | สินเธาว์/บ้านเข็มี | N                                   | >12                              |
| 12 UN-M          | ปลาร้ารวม  | โพนพิสัย/<br>หนองคาย     | คั่ว ชีว/หนองน้ำธรรมชาติ             | สินเธาว์/บ้านเข็มี | N                                   | >12                              |

\*สัดส่วนโดยประมาณจากการให้สัมภาษณ์ N คือ ไม่สามารถให้ข้อมูลได้



\*หากใช้ปลาปริมาณมากการโรยเกล็ดและรำจะโรยเป็นชั้นสลับกับชั้นปลาเพื่อให้ทั่วถึง การหมักปลากับเกล็ดก่อน ส่วนใหญ่จะเป็นการผลิตของรายที่ผลิตในปริมาณมาก บางรายอาจเติมน้ำเล็กน้อยเพื่อให้เกล็ดละลายเร็ว

\*\*บางรายอาจเติมน้ำเกล็ดในช่วง 1-2 เดือนแรก

**ภาพที่ 1** ขั้นตอนการผลิตปลาร้าของพื้นที่อุดรธานีและหนองคาย



(ก) ปลาร้าตัว จากปลานิล แม่น้ำโขง



(ข) ปลาร้ารวม ปลาจากอ่างน้ำพาน

## ภาพที่ 2 ลักษณะปรากฏของปลาร้าแบบปลาร้าตัว และปลาร้ารวม ที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดอุดรธานีและหนองคาย

นอกจากนี้ทางผู้วิจัยได้ออกสำรวจพื้นที่ผลิตปลาร้าในพื้นที่อื่นๆ เช่น การผลิตปลาร้าในพื้นที่อำเภอบ้านดุง จังหวัดอุดรธานี พบว่าเนื่องจากแหล่งปลาวัดฤดูบ คือแหล่งน้ำธรรมชาติในพื้นที่ จึงไม่สามารถเลือกชนิดปลาและขนาดปลา ดังนั้นปลาร้าส่วนใหญ่จึงผลิตในรูปแบบปลาร้ารวมเป็นหลัก ส่วนผสมและเกลือที่ใช้ รวมถึงระยะเวลาที่ใช้ในการหมักและรูปแบบการหมักมีความคล้ายคลึงกับการผลิตปลาร้ารวมของพื้นที่อื่นๆของทั้งสองจังหวัด ซึ่งน่าจะบ่งชี้ถึงภาพรวมของการผลิตปลาร้าภายในพื้นที่ของทั้งสองจังหวัดนี้ได้ ดังนั้นจึงเลือกตัวอย่างปลาร้าจากตารางที่ 1 เป็นตัวแทนในการศึกษา สมบัติของทาง เคมี กายภาพ และชีวภาพของปลาร้า เพื่อหาอัตลักษณ์ของปลาร้าในพื้นที่ของทั้งสองจังหวัดนี้ ผลการวิเคราะห์สมบัติ ดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อพิจารณาสมบัติต่าง ๆ ที่ตรวจวัดได้และเปรียบเทียบกับสูตรส่วนผสมในการผลิตปลาร้าที่ผู้ผลิตปลาร้าให้ข้อมูลนั้นพบว่าไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน บ่งชี้ได้ว่าผู้ประกอบการผลิตปลาร้าจากความเคยชิน โดยเตรียมส่วนผสมด้วยการประมาณโดยไม่มีสูตรตายตัว เช่น ตัวอย่างรหัส 6UN-M ข้อมูลสัดส่วนปลาร้าที่ให้สัมภาษณ์ คือ การใช้สัดส่วน ปลา:เกลือ:รำ เท่ากับ 20:1.5:1 ซึ่งน่าจะเป็นสูตรที่มีใช้เกลือน้อยที่สุด แต่เมื่อตรวจวัดปริมาณเกลือกลับพบว่าปลาร้าจากผู้ผลิตรายนี้มีความเข้มข้นเกลือสูงที่สุด ซึ่ง

แสดงให้เห็นว่าการพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาร้าให้มีอัตลักษณ์ได้นั้น จะต้องเริ่มจากการพัฒนาสูตรส่วนผสมให้คงที่และต้องชั่งตวงวัดให้ถูกต้องเป็นเบื้องต้นก่อน อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาค่าที่ได้จากการตรวจวัดสมบัติของปลาร้า จะเห็นได้ว่าปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดอุดรธานีและหนองคายทั้งปลาร้าตัวและปลาร้ารวม มีสมบัติทางเคมี กายภาพ เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ค่าความเข้มข้นเกลือของปลาร้าจากทั้งสองจังหวัดมีค่าใกล้เคียงกันที่ค่าเฉลี่ยร้อยละ 24.53 โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (STDVE) เพียง 1.35 ซึ่งค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานน้อยนี้แสดงให้เห็นถึงความใกล้เคียงกันของข้อมูลที่ตรวจวัดได้ จึงแสดงให้เห็นว่าสัดส่วนของปลาและเกลือที่ผู้ผลิตใช้ในสูตรของพื้นที่สองจังหวัดนี้น่าจะใกล้เคียงกัน ปัจจัยหนึ่งน่าจะเกิดจากความคุ้นเคยในเรื่องของรสชาติปลาร้าของคนในพื้นที่โดยเฉพาะในเรื่องของรสเค็มและวัฒนธรรมการกิน จึงก่อให้เกิดกระบวนการผลิตแบบในรูปแบบที่ใกล้เคียงกัน ค่า pH ของปลาร้าทั้งหมดมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.44 โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.44 และค่า TTA มีความสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นถึงระยะเวลาการหมักของปลาร้าได้ดีเนื่องจาก ค่า pH ของปลาร้าที่ลดต่ำลงเกิดจากการมีสารเมตาบอไลต์ กลุ่มกรดอินทรีย์เพิ่มมากขึ้นเมื่อหมักเป็นเวลานาน เมื่อพิจารณาถึงผลการวิเคราะห์ Proximate analysis พบว่าปริมาณเถ้าและไขมันมีค่าเบี่ยงเบนจากค่ากลางสูงกว่าด้านอื่น ๆ ทั้งนี้ น่าจะเกิดจากชนิดของปลาและแหล่งของปลาวัตถุดิบ โดยพบแนวโน้มว่าปลาร้าผลิตจากปลาจากเขื่อนหรืออ่างเก็บน้ำจะมีปริมาณไขมันสูงกว่าปลาจากหนองน้ำธรรมชาติ ในทำนองเดียวกันปลาร้าที่ผลิตจากปลาร้ารวมตัวเล็กที่หลากหลายจะมีค่าเถ้าที่มีแนวโน้มสูงกว่าปลาร้าชนิดอื่น ๆ ในส่วนของค่าไฟเบอร์พบว่าในปลาร้าทุกตัวอย่างมีค่าใกล้เคียงกันซึ่งค่าไฟเบอร์นี้สามารถบ่งชี้ถึงปริมาณรำที่ผสมในปลาร้า ซึ่งผลจากการตรวจวัดปลาร้าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการผลิตปลาร้าในพื้นที่ที่มีการใช้สูตรการผลิตที่ใกล้เคียงกันทั้งในเรื่องของปริมาณเกลือและรำที่ใช้ รวมถึงระยะเวลาการหมัก และค่าดังกล่าวเป็นหนึ่งในพารามิเตอร์ที่สามารถใช้ในการกำหนดอัตลักษณ์ของปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่นี้ได้ และเมื่อพิจารณาถึงคุณภาพทางจุลินทรีย์ของปลาร้า พบว่าจำนวนประชากรที่มีชีวิตของจุลินทรีย์โดยรวม (total viable count) คงอยู่ในระบบปลาร้าไม่สูงมากนัก ทั้งนี้ อาจเนื่องจากปลาร้าเหล่านี้หมักเป็นเวลานานกว่าครึ่งปีหรือเกินปีนั้นกระบวนการย่อยโปรตีนน่าจะสิ้นสุดลงแล้ว ดังนั้นจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนซึ่งเป็นจุลินทรีย์หลักในระบบการหมักปลาร้าจะมีจำนวนลดลง จุลินทรีย์ที่ยังคงอยู่ น่าจะเป็นกลุ่มที่ทำหน้าที่สร้างสารให้กลิ่นรสเป็นหลักซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะดำเนินกิจกรรมการหมักอย่างช้า ๆ ผลการตรวจสอบยังพบว่า มีปลาร้าบางตัวอย่างมีการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคเพียงชนิดเดียวที่สามารถอยู่รอดและหรือ/เจริญได้ภายใต้สภาวะที่มีเกลือสูง เมื่อพิจารณาตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนทั้งสามตัวอย่างพบว่า เป็นปลาร้าที่โดยผู้ประกอบการที่ผลิตปลาร้าสำหรับจำหน่ายที่มีปริมาณการผลิตมากกว่ารายอื่น ๆ ปลาร้าจึงมีโอกาสปนเปื้อนจุลินทรีย์ดังกล่าวมากกว่าโดยเฉพาะจากผู้ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตที่มีสุขลักษณะส่วนบุคคลไม่เหมาะสม

ตารางที่ 2 สมบัติทางเคมี กายภาพ และชีวภาพ ของปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดอุดรธานีและหนองคาย

| รหัส<br>ตัวอย่าง | pH        | TTA       | Salt<br>(%) | Proximate Analysis<br>(% by weight) |            |            |           |            | Microbial population<br>(Approx. LogCFU/g) |      |     |
|------------------|-----------|-----------|-------------|-------------------------------------|------------|------------|-----------|------------|--------------------------------------------|------|-----|
|                  |           |           |             | MS                                  | ash        | fiber      | fat       | protein    | TVC                                        | Y&M  | SA  |
| 1UN-S            | 5.62±0.01 | 1.44±0.06 | 24.20±0.04  | 62.65±0.18                          | 10.17±0.21 | 8.86±0.20  | 4.75±0.05 | 10.71±0.12 | 4.98                                       | 4.20 | 1.5 |
| 2UN-S            | 5.41±0.05 | 1.45±0.04 | 26.59±0.04  | 68.67±0.10                          | 7.17±0.21  | 6.26±0.37  | 6.48±0.04 | 9.40±0.24  | 4.48                                       | 4.00 | ND  |
| 3UN-S            | 5.37±0.01 | 1.26±0.07 | 25.26±0.04  | 65.90±0.08                          | 6.00±0.02  | 10.47±0.07 | 3.58±0.23 | 12.60±0.36 | 4.30                                       | 4.18 | ND  |
| 4UN-S            | 5.42±0.05 | 1.55±0.07 | 25.63±0.12  | 67.26±0.7                           | 5.10±0.11  | 9.28±0.32  | 2.78±0.05 | 11.10±0.68 | 4.65                                       | 4.00 | ND  |
| 5UN-S            | 5.19±0.00 | 1.04±0.01 | 24.04±0.08  | 61.49±0.42                          | 9.20±0.07  | 9.86±0.01  | 5.73±0.02 | 10.47±0.22 | 4.90                                       | 4.18 | ND  |
| 6UN-S            | 5.56±0.06 | 1.46±0.01 | 25.08±0.06  | 59.42±0.29                          | 9.44±0.58  | 10.32±0.43 | 6.80±0.08 | 11.73±0.11 | 5.33                                       | 4.35 | 2.0 |
| 7UN-M            | 5.93±0.01 | 1.22±0.04 | 24.00±0.00  | 60.27±0.22                          | 6.04±0.02  | 11.05±0.00 | 5.73±0.02 | 13.33±0.18 | 4.40                                       | 4.20 | ND  |
| 8UN-M            | 4.93±0.04 | 1.97±0.02 | 22.80±0.01  | 64.06±0.06                          | 8.06±0.05  | 11.44±0.59 | 4.06±0.07 | 9.11±1.05  | 4.60                                       | 4.70 | 4.0 |
| 9UN-M            | 5.88±0.02 | 1.18±0.06 | 24.91±0.08  | 68.89±0.44                          | 5.06±0.06  | 9.74±0.16  | 4.18±0.01 | 11.60±0.08 | 4.81                                       | 3.90 | ND  |
| 10UN-M           | 6.25±0.01 | 1.46±0.01 | 24.91±0.04  | 64.48±0.53                          | 10.06±0.23 | 6.07±0.09  | 5.77±0.03 | 9.73±0.08  | 4.60                                       | 4.00 | ND  |
| 11 UN-M          | 4.95±0.01 | 1.98±0.02 | 25.62±0.08  | 65.15±0.07                          | 4.10±0.12  | 8.03±0.10  | 5.85±0.15 | 12.00±0.07 | 4.00                                       | 4.18 | ND  |
| 12 UN-M          | 4.76±0.05 | 1.86±0.08 | 21.30±0.08  | 67.24±0.31                          | 10.10±0.14 | 5.11±0.13  | 3.78±0.05 | 10.97±0.40 | 4.00                                       | 3.70 | ND  |
| ค่าเฉลี่ย        | 5.44      | 1.49      | 24.53       | 64.62                               | 7.54       | 8.85       | 4.98      | 11.06      |                                            |      |     |
| STDVE            | 0.44      | 0.31      | 1.35        | 3.03                                | 2.14       | 2.02       | 1.24      | 1.22       |                                            |      |     |

TPC = Total viable count, Y&M = Yeast & mold count, SA = *Staphylococcus aureus* MS = moisture content, TTA = Titratable acidity (based lactic acid)

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่อุดรธานีและหนองคาย รายเดียวกับที่แสดงในตารางที่ 1 อีก 8 ตัวอย่าง (รวมตัวอย่างจากอำเภอบ้านดุง) ซึ่งเป็นตัวอย่างปลาร้าที่อยู่ในระหว่างกระบวนการหมัก เพื่อนำไปตรวจสอบรูปแบบการหมัก การเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักและการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี เพื่อตรวจสอบกลไกการหมัก รวมถึงวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้บ่งชี้อัตลักษณ์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกจุลินทรีย์สำหรับใช้ผลิตกล้าเชื้อและรูปแบบกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อไป

### 2.1.2 การผลิตปลาร้าและคุณลักษณะปลาร้าในพื้นที่จังหวัดสกลนครและนครพนม

จากการสำรวจข้อมูลการผลิตปลาร้าในพื้นที่จังหวัดสกลนครและนครพนม พบว่า กระบวนการผลิตส่วนใหญ่ในพื้นที่ 2 จังหวัดนี้มีความคล้ายคลึงกันทั้งในเรื่องของแหล่งปลาวัดฤดูบิ แหล่งเกลือ และขั้นตอนการผลิต แหล่งปลาวัดฤดูบิได้จากแหล่งน้ำในพื้นที่ของทั้งสองจังหวัดเป็นหลัก ได้แก่ แม่น้ำสงคราม เขื่อนน้ำอูน และหนองน้ำธรรมชาติในพื้นที่การผลิต ส่วนแม่น้ำโขงที่ซึ่งเป็นแหล่งน้ำใหญ่ของพื้นที่จังหวัดนครพนมนั้นไม่นิยมนำมาผลิตปลาร้ามากนัก เนื่องจากเป็นปลาวัดฤดูบิที่มีราคาสูง หากต้องขนส่งปลาสดวัดฤดูบิข้ามจังหวัดเพื่อทำปลาร้า เช่น ปลาจากแม่น้ำสงครามจากจังหวัดสกลนคร ไปยังอำเภอดุพนมจังหวัดนครพนม ปลาจะถูกหมักเกลือมาแล้วเบื้องต้นเพื่อเก็บรักษา ระหว่างการขนส่งและรอผลิต เกลือที่ใช้เป็นหลักคือ เกลือสินเธาว์ที่ผลิตในพื้นที่ใกล้เคียงกับการผลิตปลาร้า ได้แก่ เกลือบ้านท่าสะอาด อำเภอสว่างแดนดิน และบ้านกุดเรือคำ อำเภอวานรนิวาส จังหวัดสกลนคร ส่วนพื้นที่ที่ติดกับจังหวัดอุดรธานี จะใช้เกลือจาก อำเภอบ้านดุง จังหวัดอุดรธานี ดังนั้นเกลือวัดฤดูบิที่ใช้ในพื้นที่นี้จึงได้จากแหล่งที่หลากหลายกว่าเมื่อเทียบกับพื้นที่อุดรและหนองคาย ปลาร้าที่ผลิตส่วนใหญ่เป็นปลาร้าประเภทปลาร้ารวม แต่ปลาร้าพื้นที่นี้นิยมเรียกว่า ปลาร้าหน่ง ซึ่งหมายถึงปลาร้าที่ผลิตจากปลาชนิดที่ไม่มีเกล็ดเป็นหลัก เช่น ปลากด ปลาแขยง ปลาเชือก ปลาตุ๊ก และปลาร้าเกล็ดที่ซึ่งผลิตจากปลาชนิดที่มีเกล็ดเป็นหลัก เช่น ปลาขาว ปลาสวาย ปลาชิว ปลาก่า ปลากระดี่ และปลานิล นอกจากนี้ยังมีปลาร้ารวม คือปลาร้าที่ผลิตจากปลาทั้งสองชนิด และปลาร้าโหนดที่เกิดจากการหมักปลารวมที่หมักให้เป็นปลาร้าน้ำสีดำและกลิ่นฉุนแรงกว่าปลาร้าทั่วไป สูตรการผลิตในเรื่องของส่วนผสมของปลาร้าในพื้นที่นี้พบแนวโน้มการใช้เกลือในปริมาณสูงกว่าพื้นที่อุดรธานีและหนองคาย ส่วนผสมอื่น คือ ร้าข้าว จะมีทั้งแบบที่ใช้ร้าข้าวดิบและข้าวสารคั่ว (ตารางที่ 3) ขั้นตอนการหมักในพื้นที่นี้จะเริ่มจากหมักปลากับเกลือก่อนเป็นเวลาอย่างน้อย 1 วัน ถึง 1 เดือน แล้วจึงนำมาคลุกกับร้าจึงปล่อยให้หมักต่อ การหมักจะใช้เวลาโดยส่วนใหญ่นานกว่าพื้นที่จังหวัดอุดรธานีและหนองคาย คือต้องนานกว่า 8 เดือน หรือ 1 ปี ขึ้นไป ปลาร้าที่ผลิตส่วนใหญ่เนื้อนิ่มและยุ่ยกว่า (ภาพที่ 3 และ 4) นิยมนำไปใช้ในการเป็นเครื่องปรุงรสตำ ปรุงเป็นน้ำปลาร้ารสตำ และใส่แกง เช่น ทำน้ำขมจิ้น ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเนื่องจากปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่นี้ผสมเกลือในปริมาณมากจึงต้องหมักโดยใช้เวลานานกว่า 1 ปีเป็น

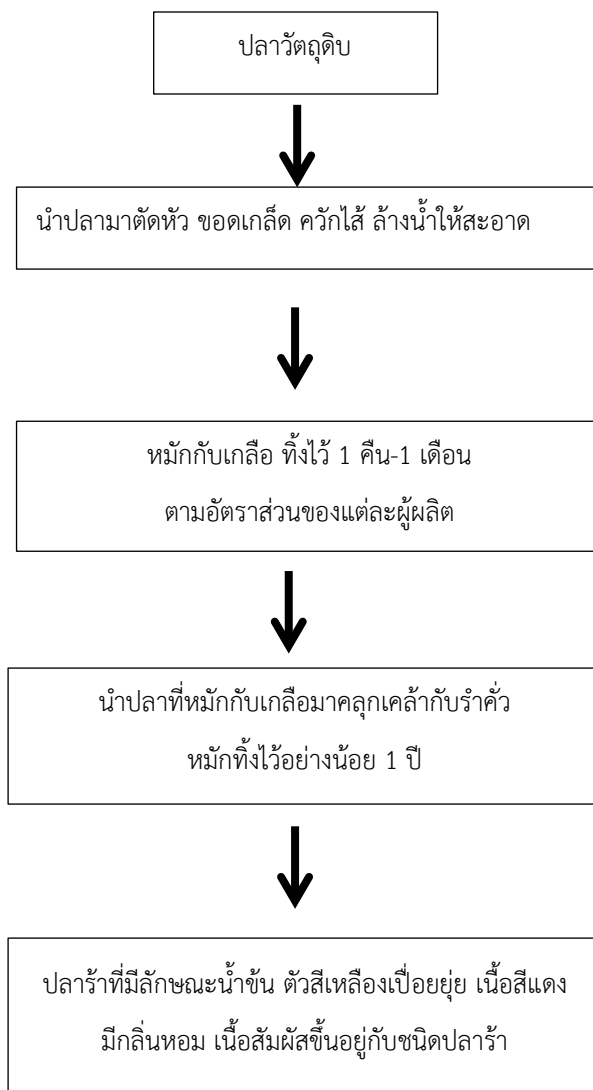
ส่วนใหญ่ จึงจะได้ปลาร้าที่มีปลาร้าที่มีกลิ่นหอมและมีน้ำมากเพียงพอสำหรับนำไปใช้เป็นเครื่องปรุงอาหารดังที่กล่าวข้างต้น

**ตารางที่ 3** ข้อมูลการผลิตและคุณลักษณะปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดสกลนครและนครพนม

| รหัส<br>ตัวอย่าง | ชนิดปลาร้า  | พื้นที่ผลิต            | ปลา/แหล่งน้ำ                             | ชนิดแหล่งเกลือ                   | ส่วนผสม*<br>(ปลา:เกลือ:<br>รำหรือข้าว<br>คั่ว*) (kg) | ระยะเวลา<br>ในการหมัก<br>(เดือน) |
|------------------|-------------|------------------------|------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------|
| 1SN-S            | ปลาร้าเกล็ด | นครพนม/ศรี<br>สงคราม   | ปลาเกล็ดตัวใหญ่/แม่น้ำ<br>สงคราม         | สินเธาว์/ทำสะอาด/<br>สว่างแดนดิน | 2:1:N                                                | >12                              |
| 2SN-M            | ปลาร้ารวม   | นครพนม/ศรี<br>สงคราม   | ปลาเกล็ดตัวเล็กหลายชนิด<br>/แม่น้ำสงคราม | สินเธาว์/ทำสะอาด/<br>สว่างแดนดิน | 3:1:N                                                | >12                              |
| 3SN-M            | ปลารวม      | สกลนคร/อากาศ<br>อำนวย  | ปลาหลากหลายชนิด/แม่น้ำ<br>สงคราม         | สินเธาว์/กุดเรือคำ/<br>วานรนิวาส | 10:4:1                                               | >12                              |
| 4SN-M            | ปลารวม      | สกลนคร/อากาศ<br>อำนวย  | ปลาหลากหลายชนิด/แม่น้ำ<br>สงคราม         | สินเธาว์/กุดเรือคำ/<br>วานรนิวาส | 18:5:0.5                                             | >6                               |
| 5SN-M            | ปลาร้าแห้ง  | นครพนม/ธาตุ<br>พนม     | แซ่/แม่น้ำสงคราม                         | สินเธาว์/ทำสะอาด/<br>สว่างแดนดิน | 6:2:1                                                | >12                              |
| 6SN-M            | ปลาร้ารวม   | สกลนคร/เมือง           | ปลาหลายชนิด/เขื่อนน้ำอูน                 | สินเธาว์/ทำสะอาด/<br>สว่างแดนดิน | 30:3:1                                               | >6                               |
| 7SN-M            | ปลาร้าโหน่ง | สกลนคร/เมือง           | ปลาหลายชนิด/เขื่อนน้ำอูน                 | สินเธาว์/ทำสะอาด/<br>สว่างแดนดิน | 16:1:N                                               | >6                               |
| 8SN-S            | ปลาร้าเกล็ด | นครพนม/ธาตุ<br>พนม     | ปลาเกล็ดหลายชนิด/แม่น้ำ<br>โขง           | สินเธาว์/ทำสะอาด/<br>สว่างแดนดิน | N                                                    | >12                              |
| 9SN-M            | ปลาร้าแห้ง  | นครพนม/ธาตุ<br>พนม     | ปลาแห้งหลายชนิด/แม่น้ำ<br>โขง            | สินเธาว์/ทำสะอาด/<br>สว่างแดนดิน | N                                                    | >12                              |
| 10SN-M           | ปลาร้าแห้ง  | สกลนคร/อากาศ<br>อำนวย  | ปลาแห้งหลายชนิด/หนอง<br>น้ำธรรมชาติ      | สินเธาว์/ทำสะอาด/<br>สว่างแดนดิน | 3:1:N**                                              | >8                               |
| 11SN-M           | ปลาร้าโหน่ง | สกลนคร/อากาศ<br>อำนวย  | ปลาแห้งหลายชนิด/หนอง<br>น้ำธรรมชาติ      | สินเธาว์/ทำสะอาด/<br>สว่างแดนดิน | 3:1:N**                                              | >8                               |
| 12SN-M           | ปลาร้ารวม   | สกลนคร/สว่าง<br>แดนดิน | ปลาขาวเป็นหลัก/หนองน้ำ<br>ธรรมชาติ       | สินเธาว์/บ้านดุง                 | 10:3:0.5                                             | >12                              |

\*สัดส่วนโดยประมาณจากการให้สัมภาษณ์ N คือ ไม่สามารถให้ข้อมูลได้ \*\*ข้าวคั่ว





ภาพที่ 3 ขั้นตอนการผลิตปลาร้าโดยสรุปของพื้นที่จังหวัดสกลนครและนครพนม



(ก) ปลา ร้าเกล็ด

(ข) ปลา ร้าหนัง



(ค) ปลา ร้ารวม

(ง) ปลา ร้าโหน่ง

**ภาพที่ 4** ลักษณะปรากฏของปลาร้าแบบ ปลาร้าหนัง ปลาร้าเกล็ด ปลาร้ารวม และปลาร้าโหน่ง ที่ผลิตในพื้นที่ จังหวัดสกลนครและนครพนม

ผลการวิเคราะห์สมบัติทาง เคมี กายภาพ และชีวภาพ ดังแสดงในตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่าปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดสกลนครและนครพนม มีสมบัติที่มีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือ ปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่ทั้งสองจังหวัดนี้มีค่าความเข้มข้นเกลือเฉลี่ยร้อยละ 32.43 ด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเพียง 1.35 และพบว่าค่าความเข้มข้นเกลือของปลาร้าในพื้นที่นี้มีค่าสูงกว่าปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดอุดรและหนองคายอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ proximate พบว่าค่าความชื้นและเถ้าของปลาในพื้นที่สกลนครและนครพนมที่มีค่าความชื้นต่ำกว่าและเถ้าสูงกว่าปลาในพื้นที่อุดรธานีและหนองคายอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นผลจากการใช้เกลือในการหมักปลาร้าในปริมาณที่มากกว่า เมื่อพิจารณาจากเวลาที่ใช้ในการหมักพบว่า การหมักปลาในพื้นที่นี้จะใช้เวลาในการหมักยาวนานกว่า โดยส่วนใหญ่ต้องใช้เวลาในการหมักกว่า 12 เดือน จึงจะได้ปลาร้าที่มีคุณลักษณะและกลิ่นรสตามที่ต้องการ ทั้งนี้ อาจเป็นผลเนื่องมาจากการใช้เกลือในปริมาณสูงทำให้จุลินทรีย์ดำเนินกิจกรรมได้ช้ากว่าการหมักที่มีเกลือในระบบน้อยกว่า ในทำนองเดียวกันปริมาณไขมันในปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่นี้มีแนวโน้มใกล้เคียงกันและพบว่ามีค่าโดยเฉลี่ยสูงกว่าในพื้นที่จังหวัดอุดรธานีและหนองคาย ส่วนปริมาณไฟเบอร์ปลาร้าโดยเฉลี่ยมีค่าต่ำกว่าทั้งนี้เนื่องจากการผลิตปลาร้าในพื้นที่นี้จะใช้รำเป็นส่วนผสมในปริมาณน้อยดังแสดงในตารางที่ 3 นอกจากใช้รำต่อสัดส่วนปลาในปริมาณ

น้อยแล้ว ยังพบว่าปริมาณรำที่ระบุเป็นค่า N นั้นส่วนใหญ่หมายถึงผู้ผลิตไม่สามารถระบุสัดส่วนที่แท้จริงได้เนื่องจากใช้วิธีเติมลงไปเล็กน้อยแค่พอคลุกเคล้าตัวปลาได้ทั่วถึง เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนของปลาร้าในพื้นที่นี้พบว่ามีความแปรปรวนสูงโดยพบแนวโน้มว่าปลาร้าที่ผลิตจากปลาร้าเกล็ดจะสูงกว่าปลาร้าแห้ง และพบว่าปลาจากแม่น้ำโขงจะมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าปลาจากแหล่งอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ (>10%) ทั้งนี้จะเกิดจากการปลาเกล็ดส่วนใหญ่ที่ใช้จะมีขนาดใหญ่กว่าปลาแห้งที่ ในขณะที่เดียวกันปลาแห้งแม่น้ำโขงจะเป็นปลาที่มีขนาดใหญ่กว่าปลาจากแหล่งน้ำอื่น ๆ ดังนั้นการทำปลาร้าจากปลาที่มีขนาดใหญ่ทำให้ปริมาณเนื้อปลาโดยรวมมีมากกว่าการใช้ปลาขนาดเล็กเพียงอย่างเดียว ในส่วนของคุณภาพด้านจุลินทรีย์พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ในช่วงประมาณ 4-5 log CFU/g และตรวจพบการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* เกือบครึ่งหนึ่งของตัวอย่างทั้งหมด และส่วนใหญ่พบในตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนสูง จากที่อภิปรายข้างต้นว่าตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนสูงนั้นได้จากการหมักที่มีส่วนผสมของปลาเกล็ด ดังนั้นในขั้นตอนการเตรียมปลาจะต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมปลา เช่น การทอดเกล็ดซึ่งอาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดนี้ได้หากผู้ผลิตมีการจัดการเรื่องสุขลักษณะการผลิตไม่ดีพอ

ตารางที่ 4 สมบัติทางเคมี กายภาพ และชีวภาพของปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดสกลนครและนครพนม

| รหัส<br>ตัวอย่าง | pH        | TTA       | Salt<br>(%) | Proximate Analysis<br>(% by weight) |            |            |           |            | Microbial population<br>(Approx. LogCFU/g) |      |      |
|------------------|-----------|-----------|-------------|-------------------------------------|------------|------------|-----------|------------|--------------------------------------------|------|------|
|                  |           |           |             | MS                                  | ash        | fiber      | fat       | protein    | TVC                                        | Y&M  | TVC  |
| 1SN-S            | 4.63±0.02 | 1.96±0.01 | 34.64±0.12  | 60.93±0.10                          | 9.74±0.21  | 8.33±0.23  | 2.35±0.47 | 13.01±0.04 | 4.8                                        | 1.3  | 4.8  |
| 2SN-M            | 6.91±0.01 | 1.32±0.00 | 34.33±0.00  | 57.88±0.36                          | 11.12±0.19 | 10.02±0.33 | 5.99±0.69 | 10.78±0.61 | 4.5                                        | 1.0  | 4.5  |
| 3SN-M            | 6.44±0.00 | 0.93±0.02 | 29.44±0.08  | 68.99±0.63                          | 19.45±0.34 | 9.85±0.00  | 4.22±0.15 | 8.70±0.38  | 4.42                                       | 1.78 | 4.42 |
| 4SN-M            | 5.38±0.01 | 1.21±0.02 | 28.71±0.04  | 64.66±.25                           | 10.39±0.01 | 8.42±0.07  | 3.93±0.09 | 6.00±0.17  | 4.25                                       | 1.62 | 4.25 |
| 5SN-M            | 5.29±0.04 | 1.40±0.00 | 32.46±0.00  | 65.06±0.06                          | 13.76±0.14 | 10.26±0.36 | 4.00±0.00 | 6.38±0.24  | 5.6                                        | 1.6  | 5.6  |
| 6SN-M            | 4.96±0.06 | 1.57±0.02 | 35.20±0.08  | 65.53±0.25                          | 9.86±0.00  | 8.30±0.27  | 3.32±0.28 | 10.85±0.24 | 6.3                                        | 3.1  | 6.3  |
| 7SN-M            | 5.63±0.02 | 1.96±0.04 | 29.64±0.04  | 65.63±0.21                          | 10.79±0.07 | 9.69±0.26  | 2.04±0.02 | 7.43±0.25  | 5.2                                        | 1.7  | 5.2  |
| 8SN-S            | 3.45±0.00 | 2.02±0.01 | 34.06±0.12  | 50.37±0.36                          | 15.53±0.18 | 8.13±0.03  | 3.13±0.11 | 16.09±0.18 | 5.4                                        | 1.5  | 5.4  |
| 9SN-M            | 4.54±0.06 | 1.52±0.01 | 33.83±0.04  | 50.82±0.24                          | 14.56±0.43 | 9.60±0.56  | 6.06±0.08 | 15.00±0.03 | 5.4                                        | 1.3  | 5.4  |
| 10SN-M           | 6.72±0.01 | 1.90±0.01 | 31.91±0.04  | 55.87±0.12                          | 17.43±0.01 | 9.64±0.20  | 3.13±0.10 | 8.21±0.34  | 6.3                                        | 1.9  | 6.3  |
| 11SN-M           | 5.58±0.04 | 1.27±0.00 | 31.04±0.04  | 68.93±0.32                          | 10.54±0.12 | 9.15±0.07  | 3.33±0.07 | 6.55±0.49  | 6.4                                        | 2.3  | 6.4  |
| 12SN-M           | 5.22±0.00 | 1.52±0.03 | 33.89±0.04  | 61.13±1.42                          | 10.06±0.08 | 9.37±0.14  | 3.82±0.23 | 8.14±0.89  | 3.86                                       | 1.25 | 3.86 |
| ค่าเฉลี่ย        | 5.40      | 1.54      | 32.43       | 61.32                               | 12.77      | 9.23       | 3.79      | 9.76       |                                            |      |      |
| STDVE            | 0.98      | 0.34      | 2.25        | 6.40                                | 3.31       | 0.75       | 1.21      | 3.41       |                                            |      |      |

TPC = Total viable count, Y&M = Yeast & mold count, SA = Staphylococcus aureus MS = moisture content, TTA = Titratable acidity (based lactic acid)

เมื่อเปรียบจำนวนผู้ผลิต และแหล่งผลิตปลาร้าในพื้นที่สองจังหวัดนี้กับพื้นที่จังหวัดอุดรธานีและหนองคาย พบว่าการผลิตจะมีน้อยกว่าและมักจะเป็นผู้ผลิตรายเล็ก หรือผลิตในระดับครัวเรือน สาเหตุหลักคือ หาปลาวัดฤติบได้ยากและมีความไม่แน่นอน ดังนั้นในการหาตัวอย่างเพิ่มเติมสำหรับทำวิจัยจึงมีข้อจำกัด

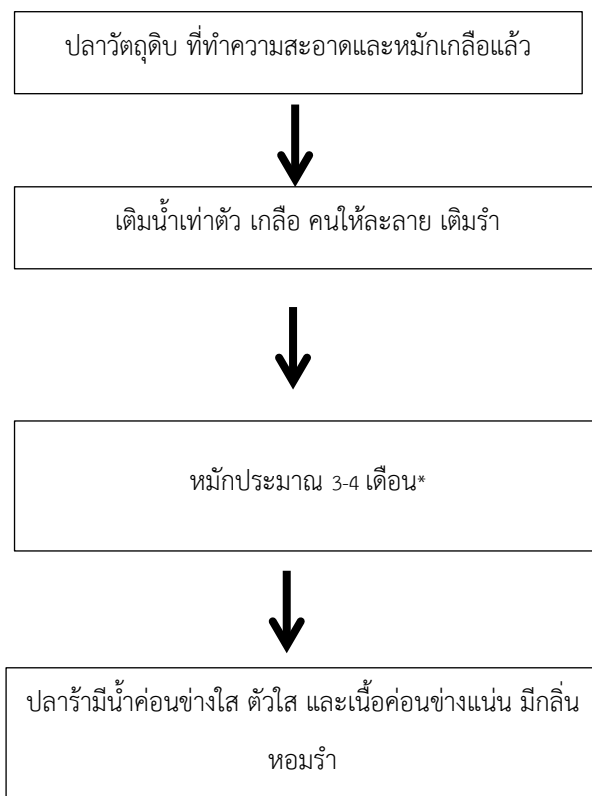
### 2.1.3 การผลิตปลาร้าและคุณลักษณะปลาร้าในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและชัยภูมิ

เนื่องจากพื้นที่ของสองจังหวัดนี้โดยเฉพาะจังหวัดนครราชสีมา เป็นพื้นที่ที่มีอาณาเขตกว้างขวาง ประกอบด้วยพื้นที่ของหลายอำเภอ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้สำรวจปลาร้าในพื้นที่หลายอำเภอมากกว่าพื้นที่อื่นๆ โดยสำรวจการผลิตในพื้นที่ทั้งหมด 6 อำเภอ ผลการสำรวจพบว่าการผลิตปลาร้าของผู้ผลิตในทั้งสองจังหวัดเกือบทั้งหมดใน 5 อำเภอที่สำรวจทั้งในจังหวัดนครราชสีมา และชัยภูมิ ใช้ปลาวัดฤติบส่วนใหญ่จากเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ จังหวัดลพบุรี ขนส่งมาในรูปของปลาที่ตัดแต่งทำความสะอาดและหมักเกลือเพื่อป้องกันการเน่าเสีย ปลาที่ใช้ส่วนใหญ่คือปลาสร้อย ปลาขาว และปลากระดี่ และผลิตปลาร้าในรูปของปลาร้าเดี่ยว (ใช้ปลาชนิดเดียว) เป็นส่วนใหญ่ (ภาพที่ 6) โดยเมื่อรับปลาหมักเกลือมาแล้วผู้ผลิตจะนำมาผลิตเป็นปลาร้าตามรูปแบบของตนเอง มีเพียงการผลิตปลาร้าในพื้นที่อำเภอพิมาย ที่พบการผลิตโดยใช้ปลาจากแหล่งน้ำในพื้นที่ คือปลาจากแม่น้ำมูล แต่ปลาที่ใช้ยังเป็นชนิดที่ใกล้เคียงกับปลาที่ได้จากเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์และเลือกใช้ปลาเพียงชนิดเดียวในการหมักเช่นเดียวกัน (ปลาร้าเดี่ยว) สูตรการผลิตในพื้นที่นี้จะมีแตกต่างจาก 4 จังหวัดแรกคือ ในการหมักปลาร้าจะมีการเติมน้ำในสัดส่วนเท่ากับน้ำหนักปลาที่ใช้โดยประมาณ และนิยมใช้ถุงพลาสติกปิดฝาโองโดยไม่ใช้น้ำหนักกดทับปลาร้า โดยในระหว่างการหมักถุงจะพองลมและเมื่อถุงยุบจะถือว่าปลาร้าเริ่มหมักได้ที่ (ภาพที่ 5 และ 6) ในการผลิตปลาร้าของทั้งสองจังหวัดมีการใช้เกลือชนิดที่ต่างกันอย่างเห็นได้ชัด แต่ทั้งนี้ผู้ประกอบการไม่ให้ข้อมูลเรื่องสัดส่วนเกลือต่อปลาร้าที่ใช้ในแต่ละครั้งเนื่องจากปลาที่ใช้ส่วนใหญ่หมักเกลือมาแล้วจึงมีการเติมเกลือโดยประมาณโดยที่ไม่ต้องกังวลเรื่องเกลือไม่ถึงปลา (ปลาเน่า) แต่หากการประมาณการผิดพลาดปลาร้าที่ได้จะมีลักษณะเป็นปลาร้าเน่าหรือปลาร้าโหน่งซึ่งสามารถขายเป็นน้ำปลาร้าเพื่อปรุงรสได้ เกลือที่ใช้ ได้แก่ เกลือสินเธาว์ที่ผลิตในพื้นที่ บางพื้นที่ใช้เฉพาะเกลือทะเล ในขณะที่บางพื้นที่ใช้เกลือทั้งสองชนิดผสมกัน แต่สิ่งที่คล้ายกันของการผลิตปลาร้าของทั้งสองจังหวัดนี้คือ การหมักจะใช้เวลานานเมื่อเปรียบเทียบกับหมักปลาร้าใน 4 จังหวัดแรก คือใช้เวลาเพียง 2-6 เดือน โดยผู้ผลิตให้ข้อมูลว่าเนื่องจากปลาร้าที่หมักด้วยระยะเวลาเพียงเท่านั้น ปลาร้าที่ได้มีคุณลักษณะที่ผู้บริโภคยอมรับที่จะซื้อนำไปปรุงอาหาร และการผลิตปลาร้าในพื้นที่นี้หากเป็นผู้ผลิตรายใหญ่ส่วนใหญ่จะหมักด้วยเวลาที่สั้นกว่ามากและนำออกจำหน่ายหลังหมักได้ไม่ถึง 1 เดือนแต่ผู้ผลิตมักจะไม่ให้ข้อมูลการผลิต แต่ทั้งนี้อาจเนื่องจากการหมักปลาร้าในพื้นที่ดังกล่าวมีการเติมน้ำในสูตรดังนั้นปลาร้าจึงมีสัดส่วนของน้ำมาก สูงจุลินทรีย์จึงเพิ่มจำนวนได้เร็วทำให้เกิดการหมักได้เร็วขึ้น จึงสามารถผลิตปลาร้าที่จะขายเป็นปลาร้าได้ในเวลาอันรวดเร็ว จากการสำรวจข้อมูลผู้วิจัยได้เลือกข้อมูลการผลิตปลาร้าที่สามารถใช้เป็นตัวแทนของปัจจัยหลัก ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตคือ แหล่งที่สามารถใช้บั้งซื้อเรื่องแหล่งปลาวัดฤติบและชนิดของเกลือที่ใช้ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ข้อมูลการผลิตและคุณลักษณะปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและชัยภูมิ

| รหัส<br>ตัวอย่าง | ชนิดปลาร้า   | พื้นที่ผลิต              | ปลา/แหล่งน้ำ                             | ชนิดแหล่งเกลือ                                                   | ส่วนผสม<br>(ปลา:เกลือ:<br>รำ:น้ำ) (kg) | ระยะเวลา<br>ในการหมัก<br>(เดือน) |
|------------------|--------------|--------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------|
| 1NC-S            | ปลาร้าเดี่ยว | นครราชสีมา/พิ<br>มาย     | ปลากระดี่/แม่น้ำมูล                      | สินเฑาะว์/อำเภอบัวชุม<br>อำเภอนนทบุรี                            | N                                      | 3-6                              |
| 2NC-S            | ปลาร้าเดี่ยว | นครราชสีมา/พิ<br>มาย     | ปลาหมอ/แม่น้ำมูล                         | สินเฑาะว์/อำเภอบัวชุม<br>อำเภอนนทบุรี                            | 5:1:N:N                                | 3-6                              |
| 3NC-S            | ปลาร้าเดี่ยว | นครราชสีมา/พิ<br>มาย     | ปลาขาว หรือปลา<br>สร้อย/แม่น้ำมูล        | เกลือทะเล                                                        | 5:1:N:N                                | 3-6                              |
| 4NC-M            | ปลาร้ารวม    | นครราชสีมา/ด่าน<br>ขุนทด | ปลาสร้อย ปลาจวด/<br>เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ | เกลือทะเล                                                        | 4:N:1:4                                | 2-4                              |
| 5NC-S            | ปลาร้าเดี่ยว | นครราชสีมา/ด่าน<br>ขุนทด | ปลากระดี่/เขื่อนป่าสัก<br>ชลสิทธิ์       | เกลือทะเล                                                        | N                                      | 3-4                              |
| 6NC-S            | ปลาร้าเดี่ยว | นครราชสีมา/ด่าน<br>ขุนทด | ปลาสร้อย/เขื่อนป่าสัก<br>ชลสิทธิ์        | เกลือทะเล                                                        | N                                      | 1-2                              |
| 7NC -S           | ปลาร้าเดี่ยว | นครราชสีมา/ปัก<br>ธงชัย  | ปลาสร้อย/เขื่อนป่าสัก<br>ชลสิทธิ์        | เกลือทะเล                                                        | 70:N:1:1.5                             | 2-4                              |
| 8NC -S           | ปลาร้าเดี่ยว | นครราชสีมา/ปัก<br>ธงชัย  | ปลาสร้อย/เขื่อนป่าสัก<br>ชลสิทธิ์        | เกลือทะเล                                                        | N                                      | 2-4                              |
| 9NC -S           | ปลาร้าเดี่ยว | นครราชสีมา/ปัก<br>ธงชัย  | ปลาสร้อย/เขื่อนป่าสัก<br>ชลสิทธิ์        | เกลือทะเล                                                        | N                                      | 2-4                              |
| 10NC-M           | ปลาร้ารวม    | จัสตุรัส/ชัยภูมิ         | ปลารวม/เขื่อนป่าสัก<br>ชลสิทธิ์          | เกลือเม็ดบ้านตาล/<br>ชัยภูมิ และ เกลือหุง<br>บ้านดุง/ นครราชสีมา | N                                      | 3-4                              |
| 11NC-M           | ปลาร้ารวม    | จัสตุรัส/ชัยภูมิ         | ปลารวม/เขื่อนป่าสัก<br>ชลสิทธิ์          | เกลือเม็ดบ้านตาล/<br>ชัยภูมิ และ เกลือหุง<br>บ้านดุง/ นครราชสีมา | N                                      | 3-4                              |
| 12NC-M           | ปลาร้ารวม    | จัสตุรัส/ชัยภูมิ         | ปลารวม/เขื่อนป่าสัก<br>ชลสิทธิ์          | เกลือเม็ดบ้านตาล/<br>ชัยภูมิ และ เกลือหุง<br>บ้านดุง/ นครราชสีมา | N                                      | 3-4                              |

\*สัดส่วนโดยประมาณจากการให้สัมภาษณ์ N คือ ไม่สามารถให้ข้อมูลได้ \*\*ข้าวคั่ว



\*การหมักมีเวลาสั้น บางรายจะถือว่าปลาร้าได้ที่เมื่อถุงพลาสติกที่ปิดฝาบวมและยุบลง

**ภาพที่ 5** ขั้นตอนการผลิตปลาร้าโดยสรุปของพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและชัยภูมิ



(ก) ปลาร้าที่หมักจากปลาจากแม่น้ำมูล อำเภอพิมาย



(ข) ปลาร้าที่หมักจากปลาจากเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ อำเภอปักธงชัย

#### ภาพที่ 6 ลักษณะปรากฏของปลาร้าเดี่ยว ที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและชัยภูมิ

ผลการวิเคราะห์สมบัติทาง เคมี กายภาพ และชีวภาพ ดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่าปลาร้าในพื้นที่นี้มีเกลือเป็นส่วนผสมโดยเฉลี่ยในปริมาณที่ใกล้เคียงกับพื้นที่จังหวัดอุดรธานีและหนองคาย ถึงแม้ว่าพื้นที่นี้จะใช้ปลาที่หมักนั้น ปลาที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นปลาจากเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ที่มีการดองเกลือหรือหมักเกลือในปริมาณสูง ที่ซึ่งคล้ายกับปลาร้าที่ผลิตในจังหวัดสกลนครและนครพนมที่จะต้องหมักปลากับเกลือก่อนเป็นเวลา 1 วันถึง 1 เดือน และถึงแม้ว่าผู้ผลิตเติมเกลือเพิ่มแต่เนื่องจากในกระบวนการผลิตมีการเติมน้ำเท่าตัวจึงทำให้เกลือน้อยลงมากกว่าปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่



อื่น ๆ ส่วนผลการวิเคราะห์ proximate สิ่งสังเกตได้ชัดเจนคือ ปลาธำที่ผลิตจากปลาแม่น้ำมูล จะมีค่าไขมันที่ต่ำกว่า ปลาธำที่ใช้ปลาจากเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์อย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณไฟเบอร์ของปลาธำในพื้นที่นี้โดยรวมมีปริมาณสูงกว่า ปลาธำจาก 4 จังหวัดแรกอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าสูตรปลาธำในพื้นที่นี้มีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกันคือ มีการใช้รำในปริมาณสูง ซึ่งผลจากการสำรวจการผลิตพบว่าผู้ผลิตจะให้ความสำคัญกับแหล่งผลิตรำมาก บางรายจะมีการติดตั้งอุปกรณ์คั่วรำสดเพื่อเตรียมรำคั่วในปริมาณที่เพียงพอกับความต้องการใช้ เป็นที่น่าสังเกตว่าค่า pH และ TTA ของปลาธำในพื้นที่นี้มีความแปรปรวนสูงเมื่อเทียบกับสองพื้นที่แรก โดยพบว่าปลาธำหลายตัวอย่างมีค่า pH อยู่ที่ 7 ค่าดังกล่าวบ่งชี้ให้เห็นถึง stage การหมักของปลาธำ ซึ่งหมายถึงปลาธำยังอยู่ในช่วงต้นของการหมัก เมทตาโบไลต์ เช่น กรดอินทรีย์ จึงยังมีปริมาณน้อย เมื่อพิจารณาจำนวนประชากรจุลินทรีย์พบว่ามีแนวโน้มสูงกว่าแหล่งอื่น และสูงถึง ประมาณ 7 log ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณจุลินทรีย์ในปลาธำจาก 4 จังหวัดแรกที่ซึ่งได้อภิปรายแล้วว่าปลาธำอยู่ในช่วงปลายของการหมักทำให้จุลินทรีย์เหลืออยู่ในปริมาณน้อย จึงช่วยยืนยันได้ว่าปลาธำพร้อมจำหน่ายในพื้นที่จังหวัดสกลนครและนครพนมยังอยู่ในช่วงต้นของการหมัก ทั้งนี้จุลินทรีย์ในระบบการหมักปลาธำนั้นจุลินทรีย์จะเริ่มต้นการหมักโดยการย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนและสารดังกล่าวจะถูกนำไปเป็นสารตั้งต้นในการสร้างกลีนิรส ซึ่งกิจกรรมการสร้างกลีนิรสดังกล่าวจะเกิดมากขึ้นหลังการย่อยโปรตีนสมบูรณ์ซึ่งเป็นช่วงปลายของการหมักโดยปกติซึ่งน่าจะอยู่ในช่วงหลัง 6, 8 หรือ 12 เดือนซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณเกลือและชนิดของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในระบบการหมัก นอกจากนี้ยังตรวจพบการปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* ในปลาธำที่ใช้ปลาจากเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ ซึ่งนอกเหนือจากกรณีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์นี้ในปลาธำวัตถุดิบในระหว่างขนส่งแล้วอีกปัจจัยหนึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับสุขลักษณะการผลิตเป็นหลัก

ตารางที่ 6 สมบัติทางเคมี กายภาพ และชีวภาพของปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและชัยภูมิ

| รหัส<br>ตัวอย่าง | pH        | TTA       | Salt<br>(%) | Proximate Analysis<br>(% by weight) |           |            |            |            | Microbial population<br>(Approx. LogCFU/g) |      |      |
|------------------|-----------|-----------|-------------|-------------------------------------|-----------|------------|------------|------------|--------------------------------------------|------|------|
|                  |           |           |             | MS                                  | ash       | fat        | fiber      | protein    | TVC                                        | Y&M  | SA   |
| 1NC-S            | 7.14±0.02 | 0.79±0.03 | 24.15±0.04  | 63.99±0.57                          | 6.52±0.79 | 4.12±0.20  | 12.40±0.01 | 12.97±0.01 | 6.70                                       | 2.45 | ND   |
| 2NC-S            | 7.63±0.02 | 0.52±0.02 | 20.74±0.13  | 63.71±0.59                          | 6.49±0.89 | 7.65±0.63  | 8.64±0.01  | 13.53±0.06 | 6.38                                       | 2.30 | ND   |
| 3NC-S            | 5.25±0.01 | 1.08±0.04 | 23.42±0.18  | 66.04±6.40                          | 6.64±2.98 | 6.73±0.32  | 8.89±0.36  | 11.68±0.03 | 6.08                                       | 2.22 | ND   |
| 4NC-M            | 4.40±0.01 | 1.03±0.00 | 21.23±0.00  | 64.23±1.19                          | 6.67±0.22 | 5.52±0.53  | 11.58±0.72 | 12.05±0.05 | 6.88                                       | 3.88 | ND   |
| 5NC-S            | 6.18±0.02 | 0.43±0.09 | 21.14±0.03  | 63.66±1.65                          | 6.55±1.38 | 5.92±1.63  | 9.84±0.01  | 14.01±0.00 | 6.74                                       | 3.83 | 2.04 |
| 6NC-S            | 7.40±0.02 | 0.99±0.05 | 23.52±0.16  | 61.20±5.74                          | 6.73±2.60 | 5.68±8.56  | 13.90±0.00 | 12.49±0.00 | 6.30                                       | 1.00 | 2.15 |
| 7NC -S           | 5.32±0.01 | 0.52±0.00 | 22.12±0.01  | 66.30±4.02                          | 6.70±1.66 | 5.52±6.06  | 11.38±0.00 | 10.10±0.03 | 6.28                                       | 1.00 | ND   |
| 8NC -S           | 4.95±0.00 | 0.53±0.02 | 22.62±0.08  | 66.64±3.21                          | 6.74±0.99 | 5.86±2.24  | 10.06±0.00 | 10.69±0.02 | 6.70                                       | 1.00 | 1.00 |
| 9NC -S           | 4.80±0.01 | 0.99±0.05 | 17.57±0.10  | 63.99±5.14                          | 6.42±1.60 | 6.49±0.08  | 9.49±0.01  | 13.61±0.02 | 6.48                                       | 2.42 | ND   |
| 10NC-M           | 6.50±0.01 | 0.32±0.01 | 21.04±0.07  | 64.70±5.16                          | 6.80±3.61 | 5.44±0.33  | 11.23±0.00 | 11.83±0.05 | 5.76                                       | 2.18 | ND   |
| 11NC-M           | 5.48±0.01 | 0.28±0.00 | 22.67±0.00  | 64.51±2.32                          | 6.52±2.20 | 4.39±20.39 | 13.88±0.01 | 10.70±0.00 | 6.59                                       | 2.63 | ND   |
| 12NC-M           | 6.23±0.01 | 0.51±0.00 | 21.67±0.00  | 65.85±1.448                         | 6.65±0.48 | 4.27±3.88  | 11.63±0.01 | 11.59±0.06 | 6.74                                       | 1.00 | ND   |
| ค่าเฉลี่ย        | 5.89      | 0.67      | 21.67       | 64.57                               | 6.62      | 5.63       | 12.10      | 12.10      |                                            |      |      |
| STDVE            | 1.11      | 0.29      | 1.73        | 1.52                                | 0.11      | 1.04       | 1.06       | 1.26       |                                            |      |      |

TVC = Total viable count, Y&M = Yeast & Mold count, SA = *Staphylococcus aureus*

MS = moisture content, TTA = Titratable acidity (based lactic acid)

จากการการสำรวจกระบวนการผลิตของปลาและวิเคราะห์สมบัติทั่วไปของปลาร้าที่ผลิตจาก 6 จังหวัด พบว่า จังหวัดอุดรธานีและหนองคาย มีรูปแบบของการผลิตและสมบัติของปลาร้าที่คล้ายคลึงกัน เช่นเดียวกับสกลนครที่คล้ายกับนครพนม และนครราชสีมาที่คล้ายกับชัยภูมิ โดยพบว่ารูปแบบการผลิตของพื้นที่จังหวัดอุดรธานีและหนองคายจะมีทั้งการหมักปลาร้าโดยคุกเกลือและร่ำพร้อมกันกับปลาวัตถุดิบ หรือหมักปลากับเกลือประมาณ 2-5 วัน ก่อนแล้วจึงเติมน้ำ การหมักนิยมหมักในโอ่งมังกรที่ปิดทับด้วยไม้ไผ่หรือวัสดุกดทับเพื่อป้องกันปลาลอย และอาจเติมน้ำเกลือในระหว่างการหมักและต้องหมักนานเกิน 6 เดือน หรือเกิน 1 ปี สกลนครและนครพนมจะนิยมหมักปลาด้วยเกลือก่อนอย่างน้อย 1 วันถึง 1 เดือนแล้วจึงเติมน้ำ การหมักต้องใช้เวลานานกว่า 8 เดือน หรือเกิน 1 ปี ส่วนพื้นที่ นครราชสีมาคล้ายกับชัยภูมิ การหมักปลาร้าจะมีการเติมน้ำในสัดส่วนที่เท่ากับปลาพร้อมกับการเติมเกลือและร่ำโดยพื้นที่นี้จะใช้ร่ำเป็นส่วนผสมในปริมาณมาก ซึ่งรูปแบบการผลิตดังกล่าวน่าจะถือเป็นวัฒนธรรมการผลิตของคนในพื้นที่ที่ถ่ายทอดต่อกันมาในพื้นที่ นอกจากนี้ชนิดปลาร้าที่เรียกชื่อแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่แล้ว สมบัติเบื้องต้นที่มีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดคือปริมาณเกลือ กล่าวคือ ปลาร้าจากอุดรธานีและหนองคายจะมีปริมาณโดยเฉลี่ยประมาณ ร้อยละ 25 ในขณะที่ปลาร้าในพื้นที่จังหวัดนครพนมและสกลนครมีเกลือสูงกว่าร้อยละ 30 ซึ่งเป็นการผลิตปลาร้าที่มีการเติมเกลือสูงที่สุดซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้ปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่นี้ต้องใช้เวลาในการหมักนานกว่าพื้นที่อื่น ๆ ส่วน จังหวัดนครราชสีมาที่มีกระบวนการผลิตใกล้เคียงกับจังหวัดชัยภูมิจะมีเกลือโดยเฉลี่ยประมาณร้อยละ 21 เป็นปลาร้าที่มีเกลือต่ำสุดเมื่อเทียบกับพื้นที่อื่น ๆ ซึ่งอาจเกิดจากการเติมน้ำและการมีน้ำสูตรทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีและสามารถดำเนินการหมักได้เร็ว ส่วนคุณลักษณะทางเคมี กายภาพและจุลชีววิทยา ขึ้นอยู่กับสูตรการผลิตและระยะเวลาหมักของพื้นที่นั้น ๆ อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งส่งผลให้ลักษณะปรากฏของปลาร้าในแต่ละพื้นที่การผลิตมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน

นอกเหนือจากคุณทางเคมี กายภาพและจุลชีววิทยา ของปลาร้า ผู้วิจัยยังได้ตรวจสอบสมบัติด้านอื่น ๆ ได้แก่ สี เนื้อสัมผัส และกลิ่น ในเรื่องของสีที่ซึ่งวัดด้วยค่าระบบ  $L^* a^* b^*$  พบว่าปลาร้า (แยกวัด น้ำและเนื้อปลา) ทั้งในส่วน ของน้ำและเนื้อปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่นครราชสีมาและชัยภูมิ มีแนวโน้มของค่า สี  $L^* a^* b^*$  สูงกว่าพื้นที่ อุดรธานีและหนองคาย และสกลนครและนครพนม ตามลำดับ โดยเฉพาะค่าความสว่าง  $L^*$  ของปลาร้ามีค่าสูงกว่าแหล่งอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากหลาย ๆ ปัจจัยพบว่าพื้นที่ปลาร้าในพื้นที่นี้มีค่าความสว่างสูงกว่าพื้นที่อื่น ๆ น่าจะเกี่ยวข้องกับการเติมน้ำและระยะเวลาหมักเป็นหลัก ทั้งนี้เนื่องจากปลาในพื้นที่ใช้เวลาในการหมักโดยเฉลี่ยเพียง 2-6 เดือน แล้วนำออกจำหน่ายในขณะที่ปลายังอยู่ในช่วงต้นของการหมักทำให้โปรตีนยังไม่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์การเกิดของเมตาบอไลต์อื่น ๆ ที่ละลายในน้ำปลาร้าและเนื้อปลา และสารที่เกิดจากปฏิกิริยาทางชีวเคมีอื่น ๆ เคมี เช่น สารสีน้ำตาล ยังไม่มีปริมาณสูงมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับอีก 2 แหล่ง ประกอบกับการเติมน้ำในปลาร้าจึงทำให้การเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อปลาและน้ำปลาร้าน้อยกว่าแหล่งอื่น ๆ ส่วนแนวโน้มของค่าการมีสีแดง  $a^*$  และสีเหลือง  $b^*$  สูงกว่าแหล่งอื่น ๆ ด้วย น่าจะเกี่ยวข้องกับการที่ปลาร้ามีค่าความสว่างสูงกว่าค่าอื่น ๆ จะส่งผลให้การเฉดสีสีอื่น ๆ มีความเด่นชัดมากขึ้นด้วย ส่วนสมบัติด้านเนื้อสัมผัสของปลาร้าในแต่ละพื้นที่นั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของปลาร้า แต่เมื่อ

เปรียบเทียบระหว่างพื้นที่ หากเป็นปลาร้าชนิดเดียวกัน ปลาร้าจากนครราชสีมาและชัยภูมิมีแนวโน้มของค่าความแข็ง (hardness) และแรงดึงดูด (cohesiveness) สูงกว่าแหล่งอื่น ๆ ทั้งนี้ น่าจะเกิดปัจจัยเรื่องเวลาที่ใช้ในการหมักที่สั้นกว่าพื้นที่อื่น ๆ ทำให้เนื้อปลายังไม่ถูกย่อยโดยสมบูรณ์เช่นเดียวกัน ซึ่งน่าจะส่งผลต่อเรื่องกลิ่นของปลาร้า ซึ่งพบว่าปลาร้าที่ผลิตจากหลายรายในพื้นที่ดังกล่าวมีเป็นปลาร้าที่ยังมีกลิ่นคาวของปลาอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับปลาร้าจากอีกสองแหล่ง ที่ซึ่งมีกลิ่นของสารระเหยที่มีความซับซ้อนมากกว่า ดังนั้นในการศึกษาเชิงลึกเรื่องของรูปแบบการหมักและสารที่เกี่ยวข้องกับสารให้กลิ่นรสของปลาร้า ผู้วิจัยจึงได้นำตัวอย่างปลาร้าจากตารางที่ 2, 4 และ 6 รวมทั้งปลาร้าในแต่ละพื้นที่เก็บเพิ่มเติมไปศึกษาเชิงลึก ดังแสดงในหัวข้อที่ 1.4, 2 และ 3 เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาหาสารบ่งชี้ทางชีวภาพและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่จะนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อปลาร้าเพื่อเร่งการหมัก ที่สามารถคงอัตลักษณ์ที่ดีของปลาร้าในพื้นที่นั้นได้

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบสมบัติทาง เคมี กายภาพ และชีวภาพ ของปลาร้าที่ผลิตในทุกพื้นที่

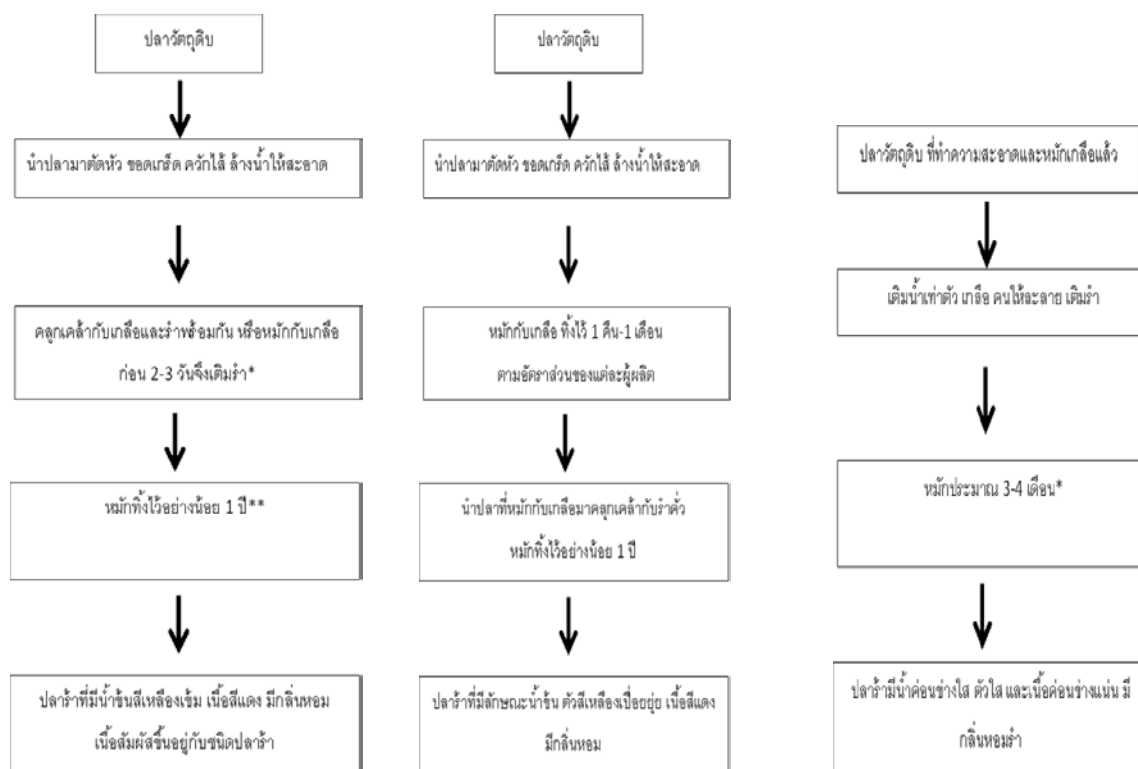
| Areas                | pH   | TTA  | Salt (%) | Proximate analysis (% by weight) |           |      |       |         | Microbial population (approx.Log CFU/g) |                   |      | color |      |           | texture |      |
|----------------------|------|------|----------|----------------------------------|-----------|------|-------|---------|-----------------------------------------|-------------------|------|-------|------|-----------|---------|------|
|                      |      |      |          | MS                               | ash       | fat  | fiber | protein | TVC                                     | Y&M               | SA*  | L*    | a*   | b*        | H       | C    |
| อุดรธานี / หนองคาย   | 5.44 | 1.49 | 24.53    | 64.62                            | 7.54      | 8.85 | 4.98  | 11.06   | 4.00<br>-<br>5.33                       | 3.40<br>-<br>4.70 | 3:12 | 45.44 | 4.34 | 12.0<br>7 | 309.82  | 0.45 |
| STDVE                | 0.44 | 0.31 | 1.35     | 3.03                             | 2.14      | 2.02 | 1.24  | 1.22    |                                         |                   |      | 6.58  | 2.07 | 4.37      | 72.71   | 0.08 |
| สกลนคร/ นครพนม       | 5.40 | 1.54 | 32.43    | 61.32                            | 12.7<br>7 | 9.23 | 3.79  | 9.76    | 3.86<br>-<br>6.30                       | 1.00<br>-<br>2.30 | 5:12 | 47.79 | 5.66 | 10.5<br>8 | 328.55  | 0.49 |
| STDVE                | 0.98 | 0.34 | 2.25     | 6.40                             | 3.31      | 0.75 | 1.21  | 3.41    |                                         |                   |      | 6.43  | 3.29 | 4.17      | 61.23   | 0.13 |
| นครราชสีมา / ชัยภูมิ | 5.89 | 0.67 | 21.67    | 64.57                            | 6.62      | 5.63 | 12.10 | 12.10   | 6.00<br>-<br>6.74                       | 1.00<br>-<br>3.88 | 3:12 | 49.39 | 7.37 | 15.8<br>7 | 233.18  | 0.50 |
| STDVE                | 1.11 | 0.29 | 1.73     | 1.52                             | 0.11      | 1.04 | 1.06  | 1.26    |                                         |                   |      | 5.76  | 2.63 | 4.47      | 90.71   | 0.06 |

TVC = Total viable count, Y&M = Yeast & Mold count, SA = *Staphylococcus aureus*

MS = moisture content, TTA = Tritatable acidity (based lactic acid) H = Hardness, C = Cohesiveness

### สรุปกระบวนการผลิตปลาร้า

ผู้วิจัยได้สำรวจแหล่งผลิตปลาร้าในพื้นที่อื่น ๆ ที่อยู่ใกล้เคียงกับพื้นที่การเก็บตัวอย่างหลัก ได้แก่ อำเภอบ้านดุง จังหวัดอุดรธานี อำเภอสีคิ้ว และอำเภोजักราช จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดมุกดาหาร และที่อยู่นอกเหนือพื้นที่ตัวอย่างหลัก ได้แก่ เมืองเวียงจันทน์ ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว และอำเภอเชียง จังหวัดอุบลราชธานี (ตัวแทนปลาร้าที่ผลิตจากปลาผิวดินในนาข้าว) เพื่อประเมินความหลากหลายของกระบวนการผลิตสามารถสรุปกระบวนการผลิตรูปแบบหลักได้ 3 รูปแบบ คือ การผลิตปลาร้ารูปแบบที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดอุดรธานี และหนองคาย เป็นการผลิตแบบ Solid state fermentation (SSF) ซึ่งเป็นรูปแบบการผลิตที่พบทั่วไปในพื้นที่ที่สำรวจเพิ่มเติม การผลิตแบบจังหวัดนครราชสีมาและชัยภูมิจะพบเฉพาะในพื้นที่ ถือเป็นการผลิตโดยกระบวนการหมักแบบ Submerged state fermentation (MSF) ส่วนในพื้นที่จังหวัดสกลนครและนครพนมเป็นพื้นที่ที่พบการหมักแบบ Solid state fermentation ที่ใช้เกลือสูงเป็นส่วนใหญ่ กระบวนการผลิตโดยสรุปดังแสดงในภาพที่ 7



การหมักแบบ SSF สูตรทั่วไป

(อุตรธานี/หนองคาย)

การหมักแบบ SSF สูตรเกลือสูง

(สกลนคร/นครพนม)

การหมักแบบ MSF

(นครราชสีมา/ชัยภูมิ)

## ภาพที่ 7 กระบวนการผลิตปลาร้าโดยสรุปของแต่ละพื้นที่ที่พบโดยส่วนใหญ่ที่พบในการศึกษานี้

ผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่อื่น ๆ ในจังหวัดนครราชสีมา ได้แก่ อำเภอสีคิ้ว และ อำเภอจักรราช รวมถึงปลาร้าที่อยู่ระหว่างการหมักจากรายเดียวกับที่แสดงในตารางที่ 5 อีก 9 ตัวอย่าง เพื่อนำไปตรวจสอบรูปแบบการหมัก การเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมัก และการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี เพื่อตรวจสอบกลไกการหมักและ วิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้บ่งชี้อัตลักษณ์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกจุลินทรีย์สำหรับใช้ผลิตกล้าเชื้อ รูปแบบกล้าเชื้อที่เหมาะสมกับปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่นี้ต่อไป

#### 2.1.4 ศึกษาอัตลักษณ์โดยการวิเคราะห์หาสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายและกรดอะมิโน

ในส่วนนี้จะนำเสนอผลการวิเคราะห์ข้อมูลโปรไฟล์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายและกรดอะมิโนอิสระในตัวอย่างปลาร้าที่หมักโดยกระบวนการผลิตที่ใช้ในแต่ละพื้นที่ และดำเนินการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลโปรไฟล์ดังกล่าว (molecular pattern recognition) ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร เพื่อหารูปแบบอัตลักษณ์ทางชีวโมเลกุลของปลาร้าในแต่ละกลุ่ม

##### 2.1.4.1 การวิเคราะห์รูปแบบของสารระเหยเมตาบอไลต์ (Volatile metabolite profile)

ผลการทดลองดังอภิปรายในข้อ 1 ถึง 5 ตามลำดับ

ก. รายการตัวอย่างและ analysis codes (ตัวอย่างหลัก 29 samples)

ผู้วิจัยได้ดำเนินการคัดเลือกตัวอย่างปลาร้าโดยพิจารณาจากผลการทดสอบทางกายภาพ เคมี และชีวภาพเบื้องต้น ดังแสดงไปก่อนหน้านี้ โดยคัดเลือกตัวอย่างปลาร้าที่เหมาะสมเพื่อเป็นตัวแทนของแต่ละเขตพื้นที่การผลิต ครอบคลุมทั้งปลาร้าปลาเดี่ยว ปลาร้าปลารวม ปลาร้าปลาตัว ปลาร้าโหนด ปลาร้าหนัง ปลาร้าปลาเกล็ด จำนวนรวมทั้งสิ้น 29 ตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย (volatile metabolite) ดังแสดงในตารางที่ 8

ข. รายการสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ตรวจพบปริมาณสูงสุดในตัวอย่างปลาร้า

จากการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในตัวอย่างปลาร้าด้วยเทคนิค headspace SPME-GC/MS พบว่า รูปแบบข้อมูลทางชีวโมเลกุลของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายได้ที่ตรวจพบในแต่ละตัวอย่างพบได้ในช่วงระหว่าง 30-50 สาร ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของปลาวัตถุดิบและระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก จากการวิเคราะห์รูปแบบข้อมูลเบื้องต้นจากตัวอย่างปลาร้าหลัก 29 ตัวอย่าง สามารถรวบรวมรายการสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่พบในตัวอย่างปลาร้าได้จำนวน 165 สาร โดยมีสารที่พบมากที่สุด 20 อันดับแรก ดังแสดงในตารางที่ 9 ซึ่งสารที่พบมากที่สุดคือกลุ่มกรดอินทรีย์ (organic acid) และเอสเทอร์อนุพันธ์ (organic acid ester) ของกรดอินทรีย์ดังกล่าว สารประกอบซัลเฟอร์ และแอลกอฮอล์

นอกจากนี้ สามารถจัดเรียงรายการสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่พบมากที่สุด 10 อันดับแรก ในตัวอย่างปลาร้าโดยจำแนกตามเขตพื้นที่การผลิตหลัก นั่นคือ กลุ่มจังหวัด (i) อุตรดิตถ์-หนองคาย (ii) สกลนคร-นครพนม และ (iii) นครราชสีมา-ชัยภูมิ ดังแสดงในตารางที่ 10 โดยพบว่าสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายส่วนมากเป็นกลุ่มกรด butanoic และสารประกอบอนุพันธ์ของกรดดังกล่าว สารประกอบซัลเฟอร์ และสารประกอบอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน

ตารางที่ 8 ข้อมูลตัวอย่างปลาร้าตัวแทนจากเขตพื้นที่การผลิตต่าง ๆ ที่คัดเลือกเพื่อมาวิเคราะห์ปริมาณสารเมตาโบไลต์ชนิดระเหยง่ายด้วยเทคนิค Headspace SPME-GC/MS

| รหัส GC/MS                                                   | รหัสตัวอย่าง | จังหวัด*                                  | อำเภอ                | ชนิดปลาร้า/ปลา/แหล่งน้ำ                        |
|--------------------------------------------------------------|--------------|-------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------|
| 1                                                            | 6UN-S        | อุดรธานี                                  | อ.เมือง              | ปลาร้าตัว/สร้อย/เขื่อนห้วยหลวง                 |
| 2                                                            | 1UN-S        |                                           |                      | ปลาร้าตัว/นิล/กระชังน้ำโขง                     |
| 3                                                            | 5UN-S        |                                           |                      | ปลาร้าตัว/นิล/เขื่อนห้วยหลวง                   |
| 4                                                            | 7UN-M        |                                           | อ.สร้างคอม           | ปลาร้ารวม/สร้อย-ขาวหัวแข็ง/อ่างน้ำพาน          |
| 5                                                            | 8UN-M        |                                           |                      | ปลาร้ารวม/ชีว-ตะเพียน/อ่างน้ำพาน               |
| 6                                                            | 9UN-M        |                                           |                      | ปลาร้ารวม/แขยง-ตะเพียน/อ่างน้ำพาน              |
| 7                                                            | 3UN-S        | หนองคาย                                   | อ.ศรีเชียงใหม่       | ปลาร้าตัว/นิล/กระชังน้ำโขง                     |
| 8                                                            | 4UN-S        |                                           |                      | ปลาร้าตัว/นิล/กระชังน้ำโขง                     |
| 9                                                            | 10UN-M       |                                           | อ.โพนพิสัย           | ปลาร้ารวม/แขยง-ตะเพียน-ชีว/หนองน้ำธรรมชาติ     |
| 10                                                           | 11UN-M       |                                           |                      | ปลาร้ารวม/แขยง-ตะเพียน-ชีว/หนองน้ำธรรมชาติ     |
| 11                                                           | 12UN-M       |                                           |                      | ปลาร้ารวม/คั่ว-ชีว/หนองน้ำธรรมชาติ             |
| 12                                                           | 1NC-S        |                                           | นครราชสีมา           | อ.พิมาย                                        |
| 13                                                           | 2NC-S        | ปลาร้าเดี่ยว/ปลาหมอ/แม่น้ำมูล             |                      |                                                |
| 14                                                           | 3NC-S        | ปลาร้าเดี่ยว/ปลาขาวหรือปลาสร้อย/แม่น้ำมูล |                      |                                                |
| 15                                                           | 7NC-S        | อ. ปักธงชัย                               |                      | ปลาร้าเดี่ยว/ปลาสร้อย/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์     |
| 16                                                           | 8NC-S        |                                           |                      | ปลาร้าเดี่ยว/ปลาสร้อย/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์     |
| 17                                                           | 9NC-S        |                                           |                      | ปลาร้าเดี่ยว/ปลาสร้อย/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์     |
| 18                                                           | 4NC-M        | ชัยภูมิ                                   | อ. ด่านขุนทด (โคราช) | ปลาร้ารวม/ปลาสร้อย-ปลาจวด/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ |
| 19                                                           | 5NC-S        |                                           |                      | ปลาร้าเดี่ยว/ปลากระตี่/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์    |
| 20                                                           | 12NC-M       |                                           | อ. จัตุรัส           | ปลาร้ารวม/ปลารวม/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์          |
| 21                                                           | 11NC-M       |                                           |                      | ปลาร้ารวม/ปลารวม/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์          |
| 22                                                           | 10NC-S       |                                           |                      | ปลาร้ารวม/ปลารวม/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์          |
| 23                                                           | 7SN-M        |                                           | สกลนคร               | อ.เมือง                                        |
| 24                                                           | 6SN-M        | ปลาร้าโหนด/ปลาหลายชนิด/เขื่อนน้ำอูน       |                      |                                                |
| 25                                                           | 3SN-M        | อ.อากาศอำนวย                              |                      | ปลาร้ารวม/ปลาหลายชนิด/แม่น้ำสงคราม             |
| 26                                                           | 4SN-M        |                                           |                      | ปลาร้ารวม/ปลาหลายชนิด/แม่น้ำสงคราม             |
| 29                                                           | 8SN-M        | นครพนม                                    | อ.ธาตุพนม            | ปลาร้าเกล็ด/ปลาเกล็ดหลายชนิด/แม่น้ำโขง         |
| 30                                                           | 9SN-M        |                                           |                      | ปลาร้าหนัง/ปลาหนังหลายชนิด/แม่น้ำโขง           |
| 31                                                           | 5SN-M        |                                           |                      | ปลาร้าหนัง/แขยง/แม่น้ำสงคราม                   |
| หมายเหตุ *สีที่ใช้ highlight เพื่อระบุจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง |              |                                           |                      |                                                |



**ตารางที่ 9** ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ตรวจพบในปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) รวมมากที่สุด 20 อันดับแรกในตัวอย่างปลาร้าด้วยเทคนิค Headspace SPME-GC/MS

| ลำดับ | สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย             | Flavor note*                             | วิถีเมตาบอลิซึม**                 |
|-------|----------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------|
| 1     | Butanoic acid                          | Rancid, cheesy, sweet                    | Pyruvate metabolism               |
| 2     | Acetic acid                            | Acidic, vinegar, pungent                 | Pyruvate metabolism               |
| 3     | Butanoic acid, ethyl ester             | Fruity, fresh, greeny                    | Esterification                    |
| 4     | Ethanol                                | Sweet, alcoholic                         | Pyruvate metabolism               |
| 5     | Butanoic acid, 3-methyl-               | Pungent, cheesy                          | Leu metabolism                    |
| 6     | 1-Butanol, 3-methyl-                   | Whiskey, malty, burnt, fuel oil          | Butanal metabolism                |
| 7     | Phenol                                 | Greeny, rubber, phenol, tarry            | Sulfur metabolism                 |
| 8     | Propanoic acid                         | Pungent, rancid, cheesy, acidic          | Pyruvate metabolism               |
| 9     | Benzaldehyde                           | Nutty, almond-like, burnt sugar          | Oxidation of aromatic hydrocarbon |
| 10    | Disulfide, dimethyl                    | Sulfur-like smell, greeny                | Sulfur-AA metabolism              |
| 11    | Pentanoic acid, 4-methyl-              | Sweat                                    | Fatty acid metabolism             |
| 12    | 1-Octen-3-ol                           | Mushroom, corky, earth odor              | Linoleic acid oxidation           |
| 13    | Butanal, 3-methyl-                     | Malty, cheesy, almond                    | Leu metabolism                    |
| 14    | Butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester  | Ether, fruit, sweet                      | Esterification                    |
| 15    | Butanoic acid, propyl ester            | Fruity, cheese, solvent                  | Esterification                    |
| 16    | Indole                                 | Burnt, feces, unpleasant odor            | Tryptophan metabolism             |
| 17    | Pentanoic acid, 4-methyl-, ethyl ester | Fruity, apple, banana                    | Esterification                    |
| 18    | Phenylethyl alcohol                    | Floral, honey, almond, fungal, cigarette | Alcohol derivatives               |
| 19    | 1-Pentanol                             | Balsamic, greeny, burnt, fusel           | Pyruvate metabolism               |
| 20    | 2-Butanone                             | Fresh, greeny, sweet, pungent, acetone   | Riboflavin metabolism             |

หมายเหตุ \*Flavor note และ \*\*วิถีเมตาบอลิซึม อ้างอิงจากระบบฐานข้อมูลออนไลน์ :

The *Escherichia coli* Metabolome Database (ECMDB)

The Yeast Metabolome Database (YMDB)

The Human Metabolome Database (HMDB)

The NCBI PubChem Database

The Food Database (FoodDB)

The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathway Database

ตารางที่ 10 ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ตรวจพบในปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) รวมมากที่สุด 10 อันดับแรกในตัวอย่างปลาร้าด้วยเทคนิค Headspace SPME-GC/MS จำแนกตามเขตพื้นที่การผลิต

| ลำดับ | อุดร-หนองคาย (n=11)            |                                                                      | สกลนคร-นครพนม (n=7)                         |                                                                     | นครราชสีมา-ชัยภูมิ (n = 11 )                     |                                                                    |
|-------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
|       | สารเมตาบอไลต์<br>ชนิดระเหยง่าย | Relative<br>abundance*<br>(log <sub>10</sub> arbitrary<br>unit ± SD) | สารเมตาบอไลต์<br>ชนิดระเหยง่าย              | Relative<br>abundance<br>(log <sub>10</sub> arbitrary<br>unit ± SD) | สารเมตาบอไลต์<br>ชนิดระเหยง่าย                   | Relative<br>abundance<br>(log <sub>10</sub> arbitrary<br>unit ±SD) |
| 1     | Butanoic acid                  | 7.3 ± 0.8                                                            | Disulfide,<br>dimethyl                      | 6.8 ± 1.1                                                           | Butanoic acid                                    | 7.5 ± 0.6                                                          |
| 2     | Butanoic acid,<br>3-methyl-    | 7.0 ± 0.5                                                            | Butanoic acid                               | 6.8 ± 0.9                                                           | Butanoic acid,<br>ethyl ester                    | 7.6 ± 0.6                                                          |
| 3     | Disulfide,<br>dimethyl         | 6.4 ± 0.7                                                            | Butanoic acid,<br>ethyl ester               | 6.9 ± 0.5                                                           | Butanoic acid,<br>butyl ester                    | 7.2 ± 0.6                                                          |
| 4     | Acetic acid                    | 6.6 ± 0.6                                                            | Butanoic acid,<br>3-methyl-                 | 6.4 ± 0.6                                                           | Butanoic acid,<br>3-methyl-                      | 6.9 ± 0.6                                                          |
| 5     | 1-Butanol, 3-<br>methyl        | 6.0 ± 0.4                                                            | Indole                                      | 6.9 ± 0.8                                                           | Disulfide,<br>dimethyl                           | 6.9 ± 0.8                                                          |
| 6     | Dimethyl<br>trisulfide         | 5.7 ± 0.2                                                            | Ethanol                                     | 6.6 ± 0.3                                                           | Phenol                                           | 6.7 ± 0.7                                                          |
| 7     | Benzaldehyde                   | 6.5 ± 0.4                                                            | Dimethyl<br>trisulfide                      | 6.9 ± 0.5                                                           | Indole                                           | 6.9 ± 0.4                                                          |
| 8     | Hexanal                        | 6.3 ± 0.6                                                            | Hexanal                                     | 6.1 ± 0.6                                                           | Acetic acid                                      | 6.6 ± 0.5                                                          |
| 9     | Butanoic acid,<br>ethyl ester  | 6.7 ± 0.2                                                            | Acetic acid                                 | 6.3 ± 0.5                                                           | Pentanoic<br>acid, 4-<br>methyl-                 | 6.4 ± 0.6                                                          |
| 10    | Indole                         | 6.5 ± 0.6                                                            | Butanoic acid,<br>3-methyl-,<br>ethyl ester | 6.2 ± 0.6                                                           | Pentanoic<br>acid, 4-<br>methyl-, ethyl<br>ester | 6.5 ± 0.6                                                          |

หมายเหตุ \*Relative abundance คือค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละสารที่ได้จากการอินทิเกรตโครมาโตแกรม

ค. การคัดเลือกสารเมตาบอไลต์ที่จะนำเข้ามาใช้เป็นตัวแปร (variable) เพื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เนื่องจากสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายทั้งหมด 165 สาร ที่ตรวจพบมีรูปแบบการกระจายตัวค่อนข้างหลากหลายในตัวอย่างปลาร้า จึงต้องมีการคัดเลือกชนิดของสารเมตาบอไลต์ที่จะนำมาใช้วิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร (multivariate statistical analysis) โดยสารเมตาบอไลต์ดังกล่าวจะต้องตรวจพบได้ในตัวอย่างไม่น้อยกว่า 33% ( $n \geq 10$ ) ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด ( $n=29$ ) ซึ่งมีจำนวนทั้งหมด 57 รายการดังแสดงในตารางที่ 11 โดยจะเห็นได้ว่าสารเมตาบอไลต์ที่นำมาเป็นตัวแปร (variable) ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลโปรไฟล์ดังกล่าวประกอบด้วย สารอินทรีย์ในกลุ่ม สารประกอบคาร์บอนิล (15 สาร) แอลกอฮอล์ (11 สาร) สารประกอบเอสเทอร์ของกรดไขมัน (11 สาร) อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (5 สาร) กรดอินทรีย์ (5 สาร) สารประกอบเอสเทอร์ของกรดคาร์บอกซิลิก (5 สาร) คีโตน (2 สาร) สารประกอบซัลเฟอร์ (2 สาร) และสารประกอบเฮเทอโรไซคลิก (1 สาร)

**ตารางที่ 11** ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่นำเข้ามาใช้เป็นตัวแปร (variable) เพื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ และค่าปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance)

| ลำดับ* | สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย | กลุ่มทางเคมีอินทรีย์  | Relative abundance<br>( $\log_{10}$ arbitrary unit $\pm$ SD)<br>(N = 29) | จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ |
|--------|----------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1      | Oxime-, methoxy-phenyl-    | Carbonyl compound     | $6.2 \pm 0.2$                                                            | 29                     |
| 2      | 1-Butanol, 3-methyl        | Alcohol               | $6.4 \pm 0.4$                                                            | 29                     |
| 3      | Butanoic acid              | Organic acid          | $7.2 \pm 0.8$                                                            | 28                     |
| 4      | Butanoic acid, 3-methyl-   | Fatty acid ester      | $6.8 \pm 0.6$                                                            | 28                     |
| 5      | Acetic acid                | Organic acid          | $6.5 \pm 0.5$                                                            | 28                     |
| 6      | 1-Octen-3-ol               | Alcohol               | $6.0 \pm 0.4$                                                            | 26                     |
| 7      | Propanoic acid             | Organic acid          | $6.3 \pm 0.4$                                                            | 25                     |
| 8      | Ethanol                    | Alcohol               | $6.5 \pm 0.4$                                                            | 24                     |
| 9      | Pentanoic acid, 4-methyl-  | Fatty acid ester      | $6.2 \pm 0.4$                                                            | 24                     |
| 10     | Acetone                    | Ketone                | $5.9 \pm 0.2$                                                            | 24                     |
| 11     | Phenylethyl alcohol        | Alcohol               | $6.1 \pm 0.4$                                                            | 23                     |
| 12     | 2-Butanone                 | Ketone                | $5.9 \pm 0.5$                                                            | 23                     |
| 13     | Benzaldehyde               | Carbonyl compound     | $6.3 \pm 0.4$                                                            | 23                     |
| 14     | Butanoic acid, ethyl ester | Fatty acid ester      | $7.1 \pm 0.5$                                                            | 21                     |
| 15     | Pentanal/3-Pentanone       | Carbonyl compound     | $5.8 \pm 0.3$                                                            | 21                     |
| 16     | Ethyl acetate              | Carboxylic acid ester | $6.1 \pm 0.3$                                                            | 20                     |

ตารางที่ 11 (ต่อ)

| ลำดับ* | สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย             | กลุ่มทางเคมีอินทรีย์  | Relative abundance<br>(log <sub>10</sub> arbitrary unit ± SD)<br>(N = 29) | จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ |
|--------|----------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 17     | 1-Pentanol                             | Alcohol               | 6.0 ± 0.4                                                                 | 20                     |
| 18     | Butanoic acid, 3-methylbutyl ester     | Fatty acid ester      | 6.1 ± 0.4                                                                 | 20                     |
| 19     | Phenol                                 | Aromatic hydrocarbon  | 6.4 ± 0.7                                                                 | 20                     |
| 20     | Furan, 2-pentyl-                       | Aromatic hydrocarbon  | 6.0 ± 0.3                                                                 | 20                     |
| 21     | Propanoic acid, 2-methyl-              | Carboxylic acid ester | 6.0 ± 0.4                                                                 | 20                     |
| 22     | Butanoic acid, propyl ester            | Fatty acid ester      | 6.2 ± 0.5                                                                 | 19                     |
| 23     | Hexanal                                | Carbonyl compound     | 6.0 ± 0.6                                                                 | 19                     |
| 24     | Propanoic acid, ethyl ester            | Carboxylic acid ester | 5.8 ± 0.2                                                                 | 18                     |
| 25     | Pentanoic acid, 4-methyl-, ethyl ester | Fatty acid ester      | 6.3 ± 0.6                                                                 | 17                     |
| 26     | 1-Hexanol                              | Alcohol               | 6.0 ± 0.4                                                                 | 17                     |
| 27     | Dodecane, 2,6,11-trimethyl-            | Carbonyl compound     | 5.7 ± 0.2                                                                 | 17                     |
| 28     | Disulfide, dimethyl                    | Sulfur compound       | 6.6 ± 0.8                                                                 | 17                     |
| 29     | Isopropyl alcohol                      | Alcohol               | 6.1 ± 0.5                                                                 | 16                     |
| 30     | Butanoic acid, 1-methylethyl ester     | Fatty acid ester      | 6.3 ± 0.5                                                                 | 16                     |
| 31     | 1-Octanol, 3,7-dimethyl-               | Alcohol               | 5.9 ± 0.2                                                                 | 16                     |
| 32     | Octane                                 | Carbonyl compound     | 5.8 ± 0.4                                                                 | 15                     |
| 33     | Hexanoic acid                          | Organic acid          | 6.0 ± 0.5                                                                 | 15                     |
| 34     | Pyrazine, 2,6-dimethyl-                | Heterocyclic compound | 5.8 ± 0.2                                                                 | 15                     |
| 35     | Butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester  | Fatty acid ester      | 6.2 ± 0.4                                                                 | 14                     |
| 36     | Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester  | Fatty acid ester      | 6.1 ± 0.4                                                                 | 14                     |
| 37     | 1-Butanol                              | Alcohol               | 6.0 ± 0.5                                                                 | 14                     |
| 38     | Butanal, 3-methyl-                     | Carbonyl compound     | 6.2 ± 0.2                                                                 | 14                     |
| 39     | 3-Octanone                             | Carbonyl compound     | 5.9 ± 0.4                                                                 | 14                     |
| 40     | Indole                                 | Aromatic hydrocarbon  | 6.7 ± 0.6                                                                 | 13                     |
| 41     | 1-Propanol, 3-(methylthio)-            | Alcohol               | 5.8 ± 0.2                                                                 | 13                     |
| 42     | Butanal, 2-methyl-                     | Carbonyl compound     | 5.9 ± 0.3                                                                 | 13                     |
| 43     | Furan, 2-ethyl-                        | Aromatic hydrocarbon  | 5.9 ± 0.3                                                                 | 12                     |

ตารางที่ 11 (ต่อ)

| ลำดับ* | สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย               | กลุ่มทางเคมีอินทรีย์  | Relative abundance<br>(log <sub>10</sub> arbitrary unit ± SD)<br>(N = 29) | จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ |
|--------|------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 44     | Propanoic acid, 2-methyl-, pentyl ester  | Carboxylic acid ester | 5.7 ± 0.3                                                                 | 12                     |
| 45     | Heptane                                  | Carbonyl compound     | 5.7 ± 0.3                                                                 | 12                     |
| 46     | 2-Heptenal, (E)-/Pyrazine, 2,5-dimethyl- | Carbonyl compound     | 5.8 ± 0.4                                                                 | 11                     |
| 47     | 2-Furanmethanol                          | Alcohol               | 5.9 ± 0.2                                                                 | 10                     |
| 48     | Styrene                                  | Carbonyl compound     | 5.9 ± 0.2                                                                 | 10                     |
| 49     | Butanoic acid, butyl ester               | Carboxylic acid ester | 6.7 ± 0.8                                                                 | 10                     |
| 50     | Pyrazine, methyl-                        | Aromatic hydrocarbon  | 6.0 ± 0.3                                                                 | 10                     |
| 51     | Hexanoic acid, ethyl ester               | Fatty acid ester      | 6.1 ± 0.5                                                                 | 10                     |
| 52     | Dodecane                                 | Carbonyl compound     | 5.7 ± 0.2                                                                 | 10                     |
| 53     | n-Caproic acid vinyl ester               | Fatty acid ester      | 5.9 ± 0.3                                                                 | 10                     |
| 54     | 3-Ethyl-3-methylheptane                  | Carbonyl compound     | 5.9 ± 0.3                                                                 | 10                     |
| 55     | Undecane, 4,6-dimethyl-                  | Carbonyl compound     | 6.0 ± 0.2                                                                 | 10                     |
| 56     | Dimethyl trisulfide                      | Sulfur compound       | 6.5 ± 0.7                                                                 | 10                     |
| 57     | Pentanoic acid                           | Organic acid          | 6.0 ± 0.3                                                                 | 10                     |

หมายเหตุ \*เรียงลำดับตามจำนวนตัวอย่างที่สามารถตรวจพบสารชนิดนั้นๆ

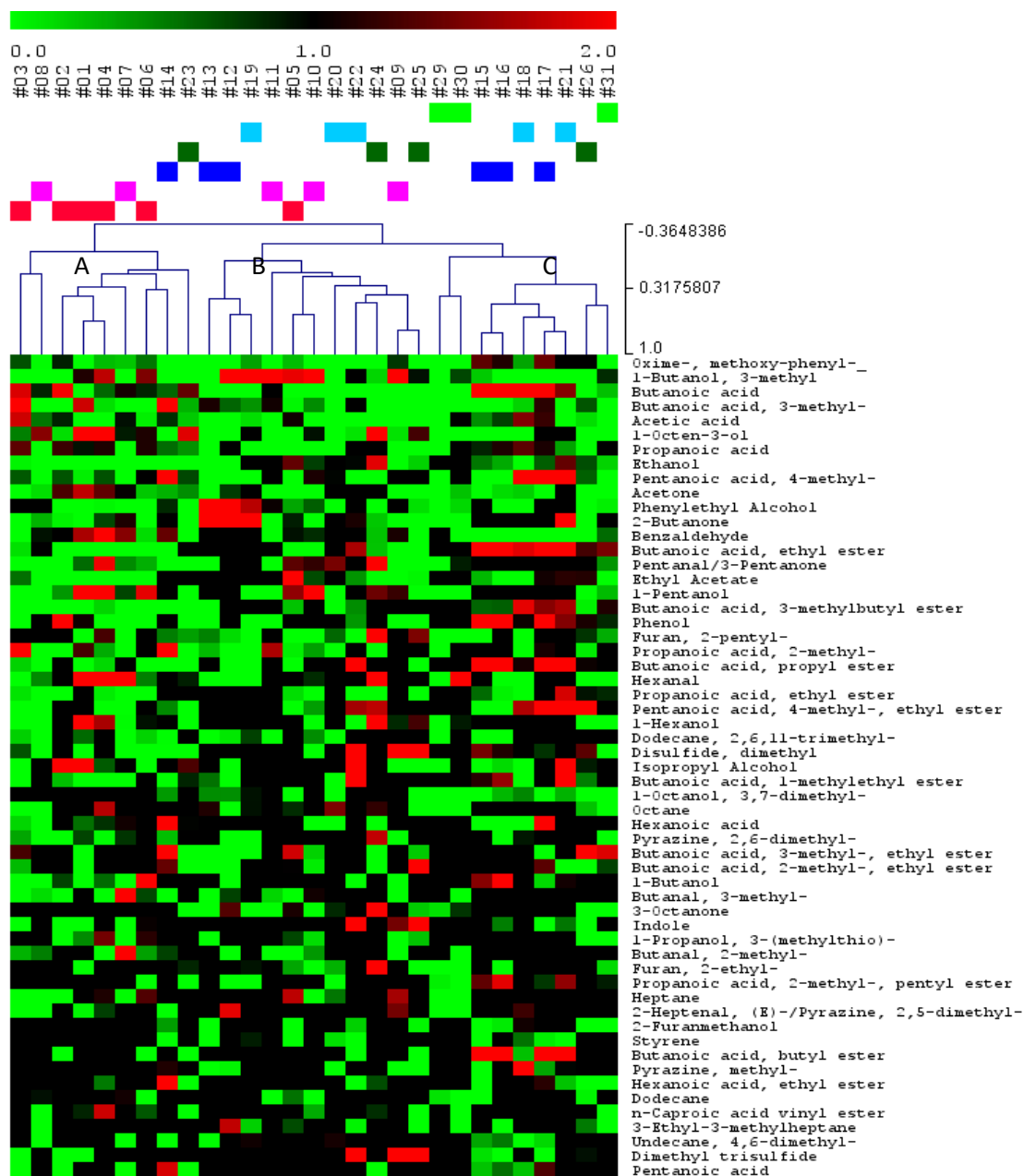
ง. ผลการวิเคราะห์จัดกลุ่มตัวอย่างปลาไร้ตามความเหมือน (overall similarity basis) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย (volatile metabolite profile) ด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) ด้วย Pearson correlation

(1) การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาไร้ตามความเหมือนของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในทุกตัวอย่าง (overall similarity clustering) (n = 29) โดยนำข้อมูลปริมาณสัมพันธ์ (relative abundance) ของสารเมตาโบไลต์ทั้ง 57 สารที่ตรวจพบมาคำนวณเปรียบเทียบและจัดกลุ่มตัวอย่างโดยใช้ค่า Pearson correlation ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าสามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างปลาไร้ออกเป็น 3 cluster หลัก ดังแสดงในภาพที่ 8 ได้แก่

- คลัสเตอร์ A ประกอบด้วยตัวอย่างปลาไร้จากจังหวัดอุดรธานีและหนองคาย (อ.ศรีเชียงใหม่) เป็นส่วนใหญ่

- คลัสเตอร์ B ประกอบด้วยตัวอย่างปลาร้าจากจังหวัดหนองคาย (อ.โพนพิสัย) สกลนคร บางส่วน และนครราชสีมา (อ.พิมาย) เป็นส่วนใหญ่
- คลัสเตอร์ C ประกอบด้วยตัวอย่างปลาร้าจากจังหวัดสกลนคร (อ.อากาศอำนวย) นครราชสีมา (อ.ปักธงชัย) และนครพนม

เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาร้าด้วยวิธีทางสถิติหลายตัวแปรได้ชัดเจนมากขึ้น จึงดำเนินการจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายด้วย HCA ซ้ำอีกครั้ง โดยเปรียบเทียบทีละคู่เขตพื้นที่การผลิต (pairwise clustering)

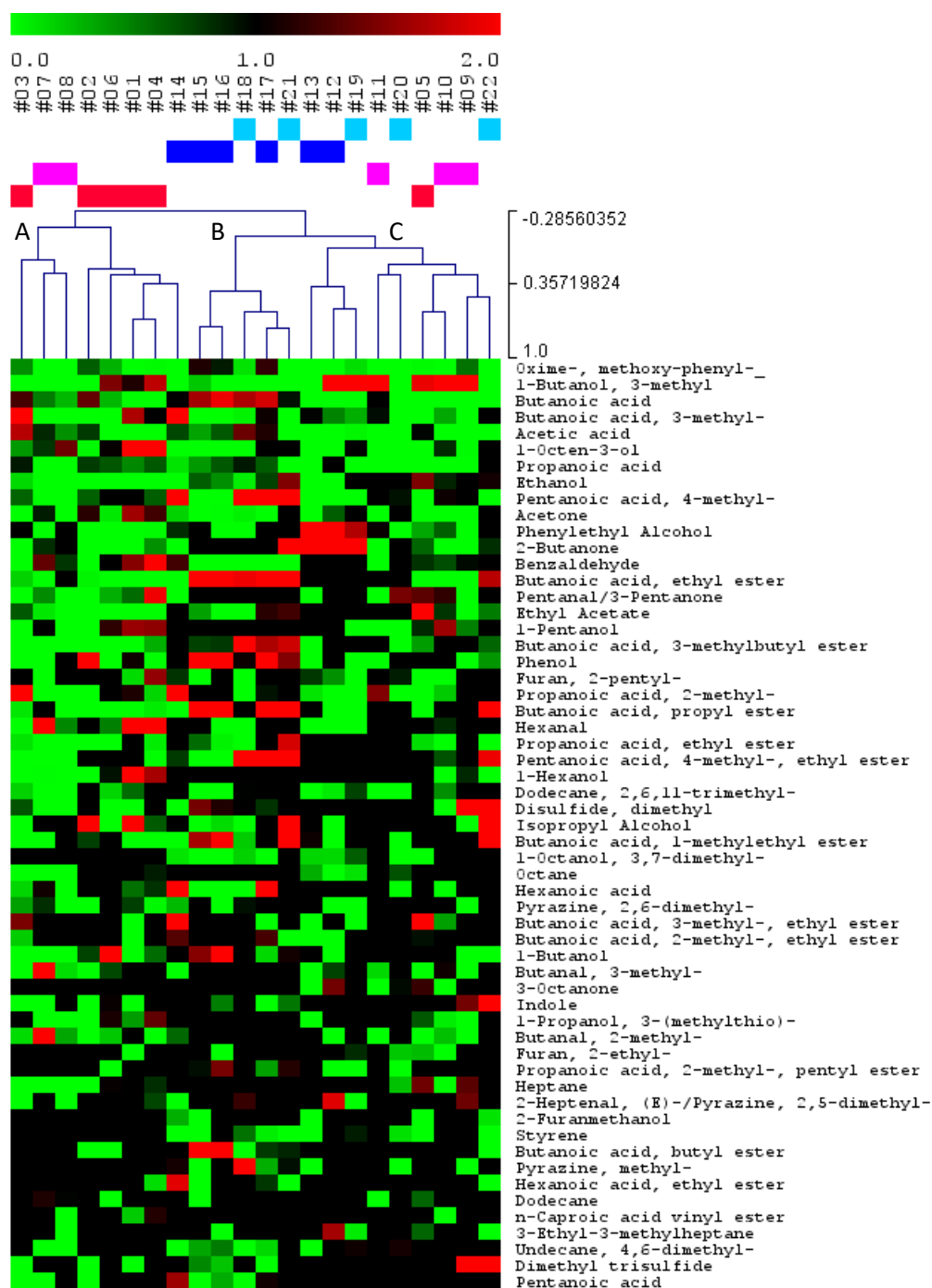


ภาพที่ 8 การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด **อุดรธานี-หนองคาย นครราชสีมา-ชัยภูมิ** และ **สกลนคร-นครพนม** แสดงค่าปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดเดียวกันจากต่ำไปสูงตามลำดับ

(2) การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย โดยเปรียบเทียบทีละคู่เขตพื้นที่การผลิต (pairwise clustering)

(2.1) การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย ระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด **อุดรธานี-หนองคาย** และ **นครราชสีมา-ชัยภูมิ** ( $n = 22$ ) ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างปลาร้าจากจังหวัด นครราชสีมา-ชัยภูมิ มีความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายจากตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในจังหวัดอุดรธานีอย่างชัดเจน ส่วนตัวอย่างปลาร้าจากจังหวัดหนองคายสามารถแยกออกจากกันได้ตามอำเภอที่ตั้งของการผลิต โดยตัวอย่างปลาร้าจาก อ.ศรีเชียงใหม่ (07-08) มีข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายคล้ายคลึงกับตัวอย่างปลาร้าจากจังหวัดอุดรธานี แต่ตัวอย่างปลาร้าจาก อ.โพนพิสัย (09-11) กลับมีข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายคล้ายคลึงกับตัวอย่างปลาร้าจากจังหวัด นครราชสีมา-ชัยภูมิ มากกว่า ดังแสดงในภาพที่ 9

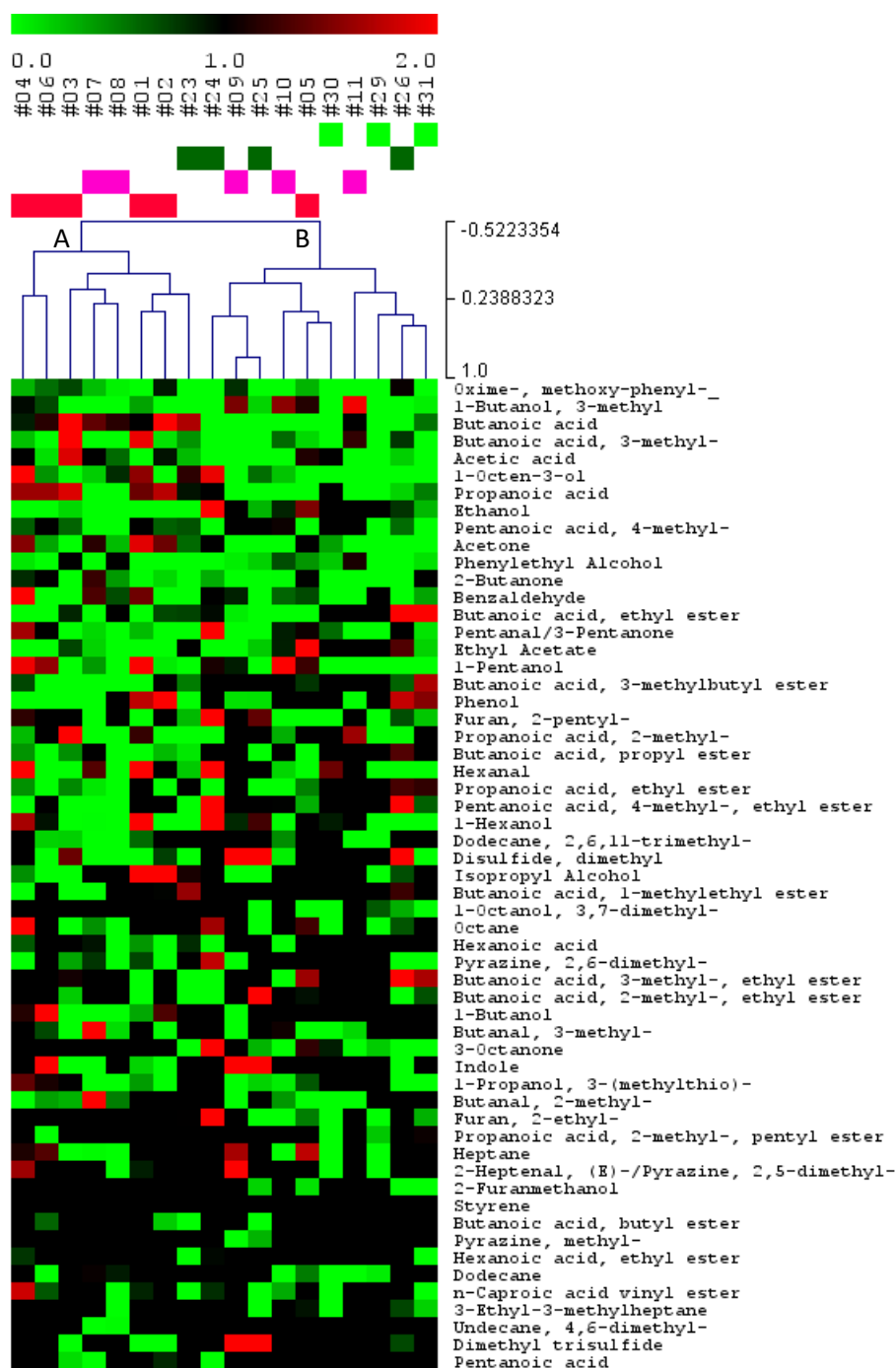




ภาพที่ 9 การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด **อุดรธานี-หนองคาย** และ **นครราชสีมา-ชัยภูมิ** แสดงค่าปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดเดียวกันจากต่ำไปสูงตามลำดับ

(2.2) การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด **อุดรธานี-หนองคาย** และ **สกลนคร-นครพนม** ( $n = 18$ )

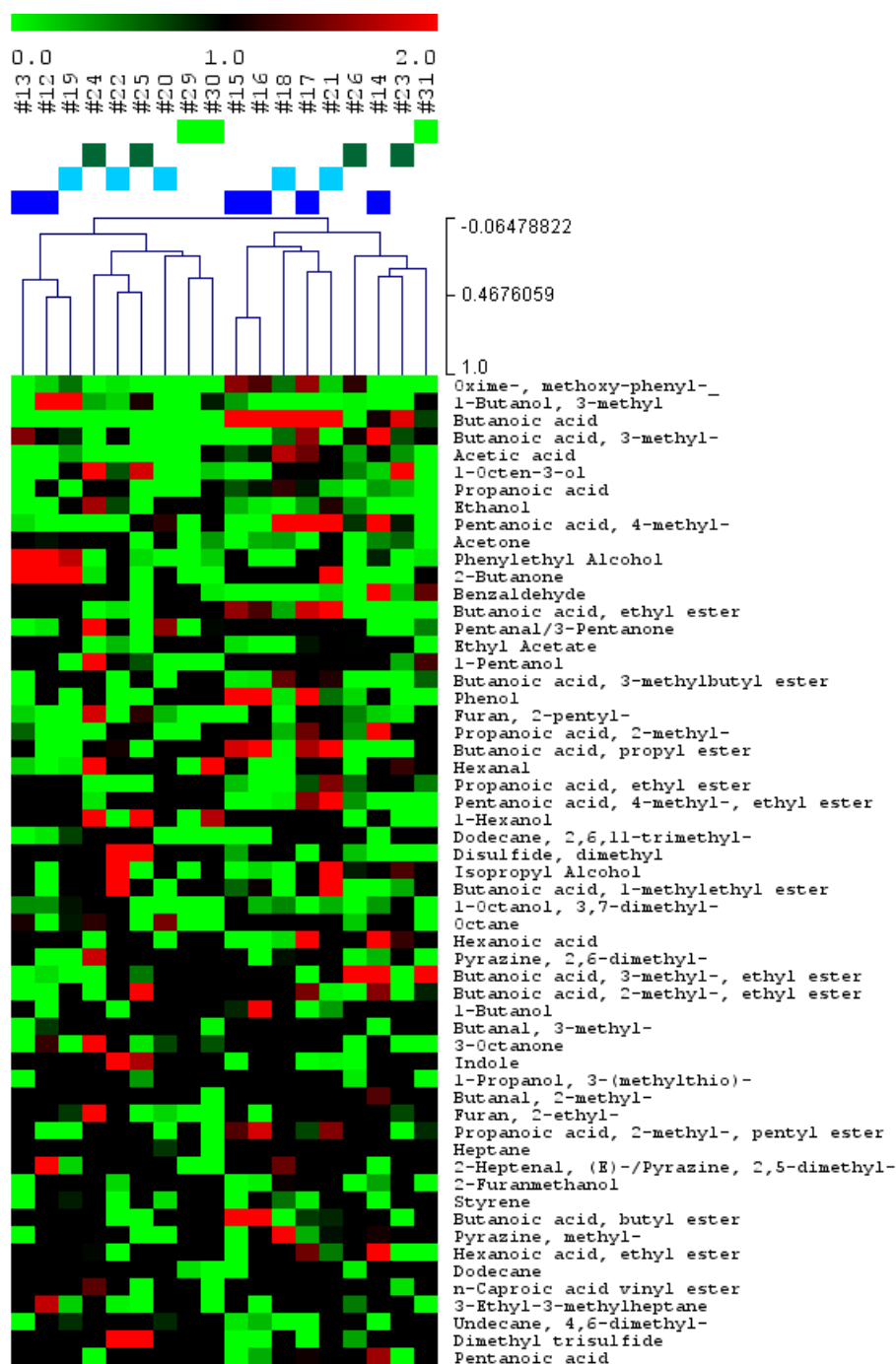
ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างปลาร้าจากจังหวัด สกลนคร-นครพนม มีความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายจากตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในจังหวัดอุดรธานีอย่างชัดเจน ส่วนตัวอย่างปลาร้าจากจังหวัดหนองคายสามารถแยกออกจากกันได้ตามอำเภอที่ตั้งของการผลิต โดยตัวอย่างปลาร้าจาก อ.ศรีเชียงใหม่ (07-08) มีข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายคล้ายคลึงกับตัวอย่างปลาร้าจากจังหวัดอุดรธานี แต่ตัวอย่างปลาร้าจาก อ.โพนพิสัย (09-11) กลับมีข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายไปคล้ายคลึงกับตัวอย่างปลาร้าจากจังหวัด สกลนคร-นครพนม มากกว่า ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด **อุดรธานี-หนองคาย** และ **สกลนคร-นครพนม** แสดงค่าปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดเดียวกันจากต่ำไปสูงตามลำดับ

(2.3) การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด **นครราชสีมา-ชัยภูมิ** และ **สกลนคร-นครพนม** ( $n = 18$ )

ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าจากข้อมูลที่มียังไม่สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างปลาร้าภายในจังหวัดเดียวกันและระหว่าง 2 เขตพื้นที่การผลิตนี้ได้อย่างชัดเจน ยกเว้นตัวอย่างปลาร้าจาก อ.พิมาย (12-13) และ อ.ปักธงชัย (15-17) จ.นครราชสีมา ดังแสดงในภาพที่ 11 ซึ่งผลวิเคราะห์ในส่วนนี้สอดคล้องกับผลในข้อ (2.1) และ (2.2) ที่แสดงให้เห็นว่าข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายของทั้ง 2 เขตพื้นที่การผลิตนี้ มีความคล้ายคลึงร่วมกันกับตัวอย่างปลาร้าจาก อ.โพนพิสัย จ.หนองคาย



ภาพที่ 11 การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด นครราชสีมา-ชัยภูมิ และ สกลนคร-นครพนม แสดงค่าปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดเดียวกันจากต่ำไปสูงตามลำดับ

(3) การจัดกลุ่มรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในตัวอย่างปลา ร้าตามระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมักด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) ด้วย Pearson correlation

(3.1) การจัดกลุ่มรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายใน ตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในเขตพื้นที่จังหวัด นครราชสีมา โดยคัดเลือกตัวอย่างปลาร้า (หลักและเสริม) ตาม ระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก ดังแสดงในตาราง 12 โดยสารเมตาบอไลต์ที่จะนำเข้ามาใช้เป็นตัวแปร (variable) เพื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติจะต้องตรวจพบในปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) รวมมาก ที่สุด 50 อันดับแรกในกลุ่มตัวอย่างปลาร้าดังกล่าว

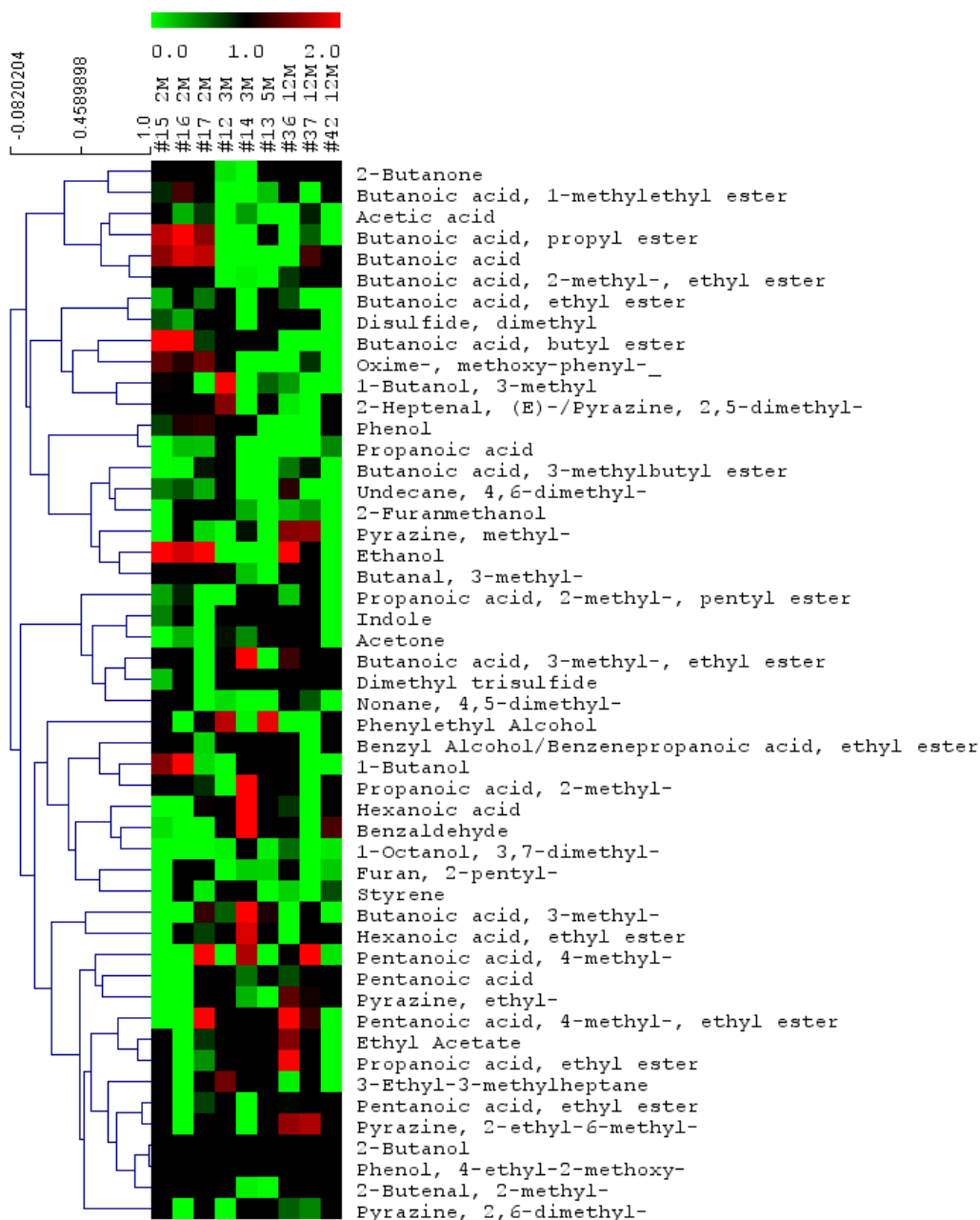
ตารางที่ 12 ข้อมูลตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในเขตพื้นที่จังหวัด นครราชสีมา ตามระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก

| รหัส GC/MS | รหัสตัวอย่าง | ระยะเวลา ในการ หมัก | จังหวัด    | อำเภอ      | ชนิดปลาร้า/ปลา/แหล่งน้ำ                    |
|------------|--------------|---------------------|------------|------------|--------------------------------------------|
| 15         | 7NC-S        | 2 เดือน             | นครราชสีมา | อ.ปักธงชัย | ปลาร้าเดี่ยว/ปลาสร้อย/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ |
| 16         | 8NC-S        | 2 เดือน             |            |            | ปลาร้าเดี่ยว/ปลาสร้อย/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ |
| 17         | 9NC-S        | 2 เดือน             |            |            | ปลาร้าเดี่ยว/ปลาสร้อย/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ |
| 12         | 1NC-S        | 3 เดือน             |            | อ.พิมาย    | ปลาร้าเดี่ยว/ปลากระดี่/แม่น้ำมูล           |
| 14         | 3NC-S        | 3 เดือน             |            |            | ปลาร้าเดี่ยว/ปลาขาวหรือปลาสร้อย/แม่น้ำมูล  |
| 13         | 2NC-S        | 5 เดือน             |            |            | ปลาร้าเดี่ยว/ปลาหมอ/แม่น้ำมูล              |
| 36*        | 13NC-M-12M   | 12 เดือน            |            | อ.จักราช   | ปลาร้าเดี่ยว/ปลาสร้อย/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ |
| 37*        | 14NC-S-12M   | 12 เดือน            |            | อ.จักราช   | ปลาร้าเดี่ยว/ปลาสร้อย/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ |
| 42*        | 15NC-M-12M   | 12 เดือน            |            | อ.สีคิ้ว   | ปลาร้าเดี่ยว/ปลาสร้อย/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ |

หมายเหตุ \*ตัวอย่างปลาร้าเสริมในงานวิจัยนี้

ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นข้อมูลการเปลี่ยนแปลงปริมาณสัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหย ง่ายในตัวอย่างปลาร้าตามระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก ตั้งแต่ 2 ถึง 12 เดือน ดังแสดงในภาพที่ 12 โดยเบื้องต้นสามารถจำแนกกลุ่มของสารเมตาบอไลต์ดังกล่าวตามรูปแบบการเปลี่ยนแปลงในเชิงปริมาณได้ เช่น สารประกอบกลุ่ม 2-butanone, butanoic acid อนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดดังกล่าว และ acetic acid สามารถตรวจพบในปลาร้าโดยจะมีปริมาณสูงในช่วง 2 เดือนแรก (แสดงด้วยสีแดง) และจะมีปริมาณลดลง เมื่อมีระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมักนานขึ้น (แสดงด้วยสีดำ-เขียว) เป็นต้น ซึ่งคณะผู้วิจัยจะทำการ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้อมูลดังกล่าวเพิ่มเติม ร่วมกับข้อมูลชนิดและกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในระหว่างระยะต่างๆ ของกระบวนการหมัก เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ด้านนี้ต่อไป



ภาพที่ 12 การจัดกลุ่มรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในเขตพื้นที่จังหวัด นครราชสีมา ตามระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก  แสดงค่าปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดเดียวกันจากต่ำไปสูงตามลำดับ

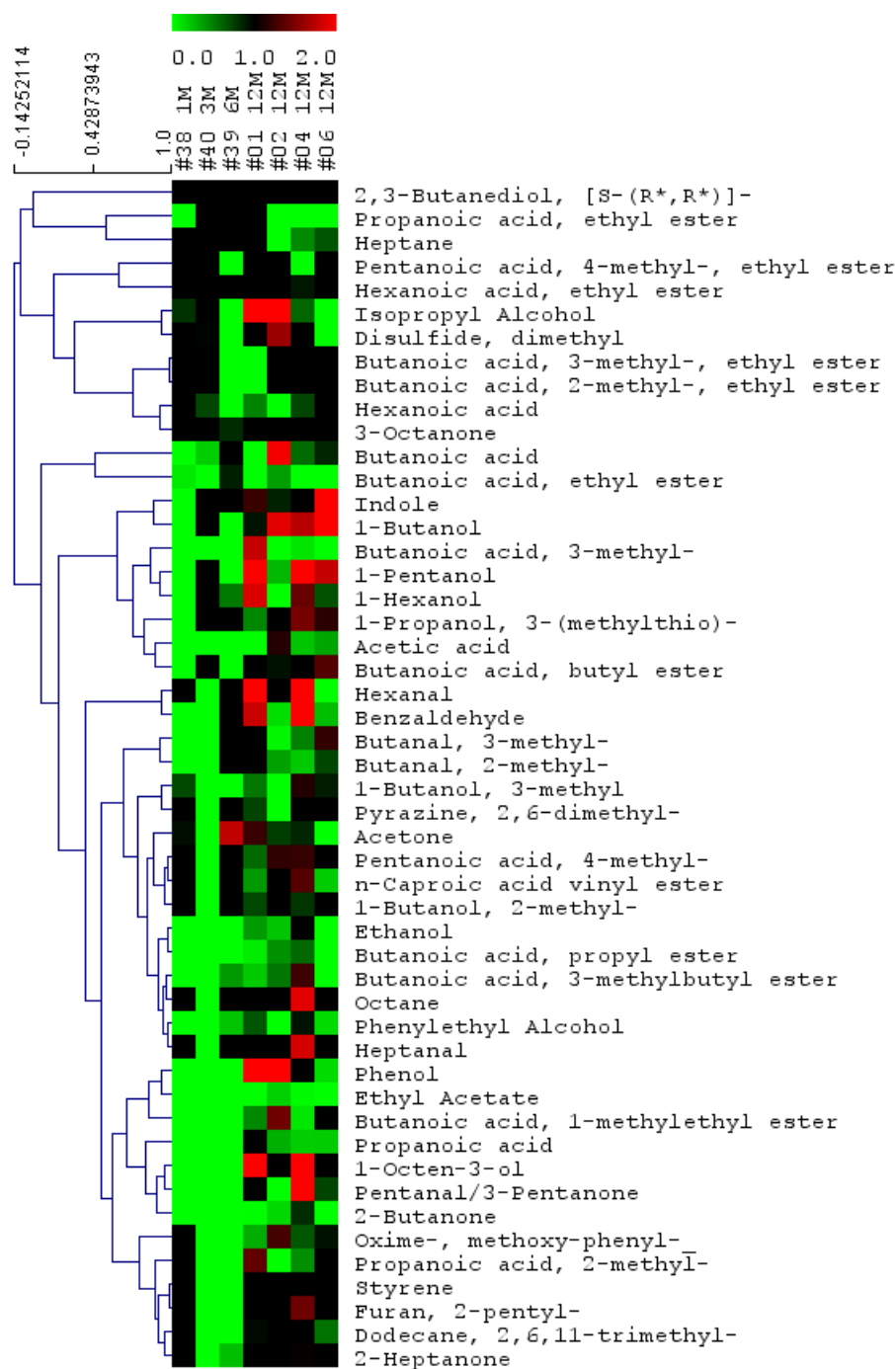
(3.2) การจัดกลุ่มรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในเขตพื้นที่จังหวัด **อุดรธานี** โดยคัดเลือกตัวอย่างปลาร้า (หลักและเสริม) ตามระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก ดังแสดงในตาราง 13 โดยสารเมตาบอไลต์ที่จะนำเข้ามาใช้เป็นตัวแปร (variable) เพื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติจะต้องตรวจพบในปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) รวมมากที่สุด 50 อันดับแรกในกลุ่มตัวอย่างปลาร้าดังกล่าว

**ตารางที่ 13** ข้อมูลตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในเขตพื้นที่จังหวัด **อุดรธานี** ตามระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก

| รหัส GC/MS                                 | รหัสตัวอย่าง | ระยะเวลาในการหมัก | จังหวัด  | อำเภอ      | ชนิดปลาร้า/ปลา/แหล่งน้ำ               |
|--------------------------------------------|--------------|-------------------|----------|------------|---------------------------------------|
| 38*                                        | 9UN-M-1M     | 1 เดือน           | อุดรธานี | อ.สร้างคอม | ปลาร้ารวม/สร้อย-ขาวหัวแข็ง/อ่างน้ำพาน |
| 40*                                        | 1UN-S-3M     | 3 เดือน           |          | อ.เมือง    | ปลาร้าตัว/นิล/กระชังน้ำโจง            |
| 39*                                        | 8UN-M-6M     | 6 เดือน           |          | อ.สร้างคอม | ปลาร้ารวม/สร้อย-ขาวหัวแข็ง/อ่างน้ำพาน |
| 1                                          | 6UN-S        | 12 เดือน          |          | อ.เมือง    | ปลาร้าตัว/สร้อย/เขื่อนห้วยหลวง        |
| 2                                          | 1UN-S        | 12 เดือน          |          |            | ปลาร้าตัว/นิล/กระชังน้ำโจง            |
| 4                                          | 7UN-M        | 12 เดือน          |          | อ.สร้างคอม | ปลาร้ารวม/สร้อย-ขาวหัวแข็ง/อ่างน้ำพาน |
| 6                                          | 9UN-M        | 12 เดือน          |          |            | ปลาร้ารวม/แขยง-ตะเพียน/อ่างน้ำพาน     |
| หมายเหตุ *ตัวอย่างปลาร้าเสริมในงานวิจัยนี้ |              |                   |          |            |                                       |

ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นข้อมูลการเปลี่ยนแปลงปริมาณสัมพัทธ์ของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในตัวอย่างปลาร้าตามระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก ตั้งแต่ 1 ถึง 12 เดือน ดังแสดงในภาพที่ 13 โดยเบื้องต้นสามารถจำแนกกลุ่มของสารเมตาบอไลต์ดังกล่าวตามรูปแบบการเปลี่ยนแปลงในเชิงปริมาณได้ เช่น สารประกอบกลุ่ม indole, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol และ 3-methyl butanoate สามารถตรวจพบในปลาร้าโดยจะมีปริมาณน้อยในช่วง 3 เดือนแรก (แสดงด้วยสีดำ-เขียว) และจะมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมักนานขึ้น (แสดงด้วยสีแดง) เป็นต้น ซึ่งคณะผู้วิจัยจะทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้อมูลดังกล่าวเพิ่มเติม ร่วมกับข้อมูลชนิดและกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในระหว่างระยะต่างๆ ของกระบวนการหมัก เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ด้านนี้ต่อไป





ภาพที่ 13 การจัดกลุ่มรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในเขตพื้นที่จังหวัด **อุดรธานี** ตามระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก แสดงค่าปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดเดียวกันจากต่ำไปสูงตามลำดับ

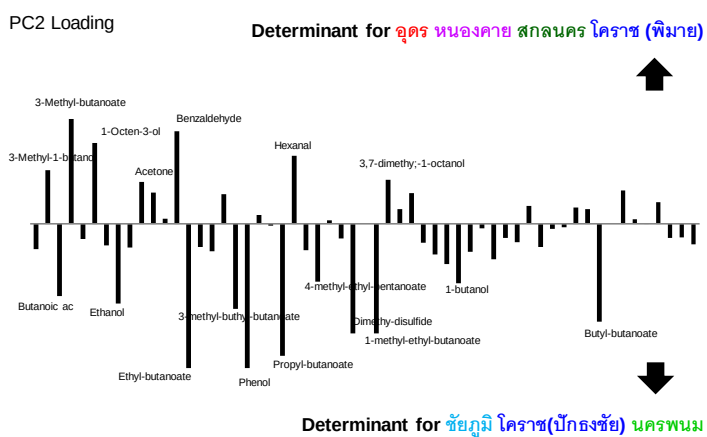
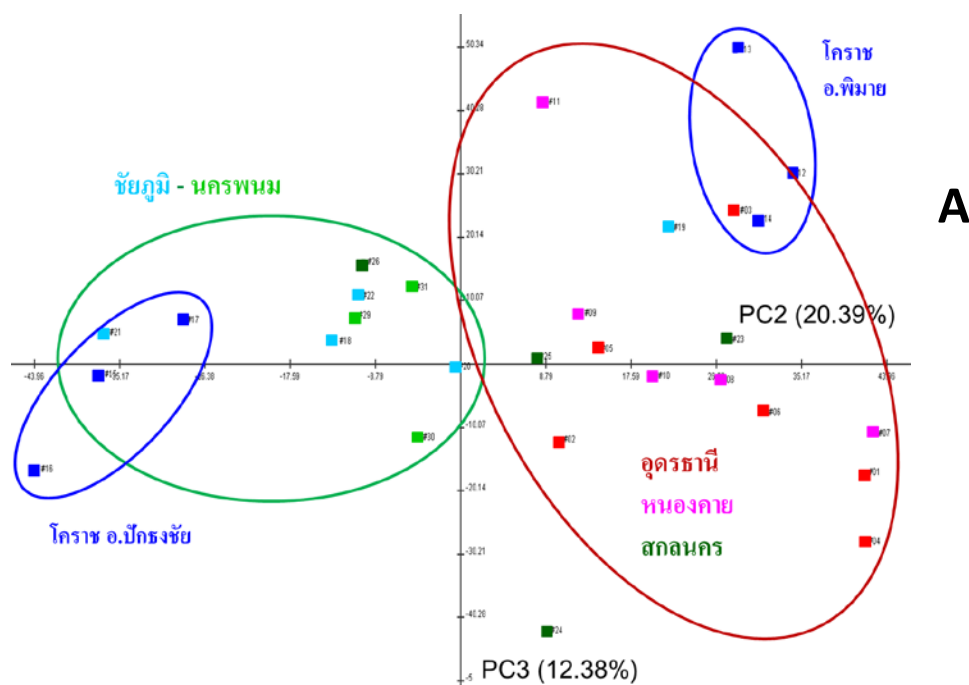
จ. การวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาร้าด้วยเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis: PCA) และรายงานสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่มีแนวโน้มเป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพ (potential biomarker) ของปลาร้าในแต่ละเขตพื้นที่การผลิต

(1) การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาร้าด้วย PCA จากข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในทุกตัวอย่าง (overall discrimination) ( $n = 29$ ) ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าสามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างปลาร้าออกเป็น 4 กลุ่ม ดังแสดงในภาพที่ 14-A ตามความแตกต่างของรูปแบบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย ได้แก่

- กลุ่มตัวอย่างปลาร้าจากจังหวัดอุดรธานี หนองคาย และสกลนครบางส่วน
- กลุ่มตัวอย่างปลาร้าจากจังหวัดชัยภูมิ และนครพนม
- กลุ่มตัวอย่างปลาร้าจาก อ.พิมาย จังหวัดนครราชสีมา
- กลุ่มตัวอย่างปลาร้าจาก อ.ปักธงชัย จังหวัดนครราชสีมา

ผลการวิเคราะห์ด้วย PCA สามารถแสดงให้เห็นรูปแบบ (pattern) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ชัดเจนกว่าผลที่ได้จากการจัดกลุ่มด้วย HCA และมีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ในข้อ 4.1 โดยการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีแสดงให้เห็นว่าข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในตัวอย่างปลาร้าจากจังหวัดนครราชสีมาที่ผลิตใน 2 อำเภอมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน และข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในตัวอย่างปลาร้าจากจังหวัดสกลนครมีรูปแบบไม่สม่ำเสมอ จึงยังไม่สามารถหา pattern ได้ชัดเจน อย่างไรก็ตาม จากผลการวิเคราะห์ดังแสดงในภาพที่ 14-A สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างปลาร้าจากค่าปริมาณสัมพันธ์ (คำนวณใหม่ตามวิธีทางสถิติหลายตัวแปร) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ใช้ plot ลงบน PC-2 (แกน X) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพ (potential biomarker) เพื่อจำแนกความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างปลาร้าได้ เมื่อพิจารณาข้อมูล loading plot ในภาพที่ 14-B แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในจังหวัดอุดรธานี หนองคาย นครราชสีมา (อ.พิมาย) และสกลนครบางส่วน จะมีสารประกอบ 3-methyl-1-butanol, 3-methyl butanoate, 1-octen-3-ol, acetone, benzaldehyde, hexanal และ 3,7-dimethyl-1-octanol ในปริมาณที่สูงกว่าตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในจังหวัดชัยภูมิ นครพนม และนครราชสีมา (อ.ปักธงชัย) ในทางตรงข้าม ปลาร้าที่ผลิตในกลุ่มหลังจะมีสารประกอบ butanoic acid และอนุพันธ์ของกรดดังกล่าว (R-butanoate) ethanol, phenol, dimethyl-disulfide, 4-methyl-ethyl-pentanoate และ 1-butanol

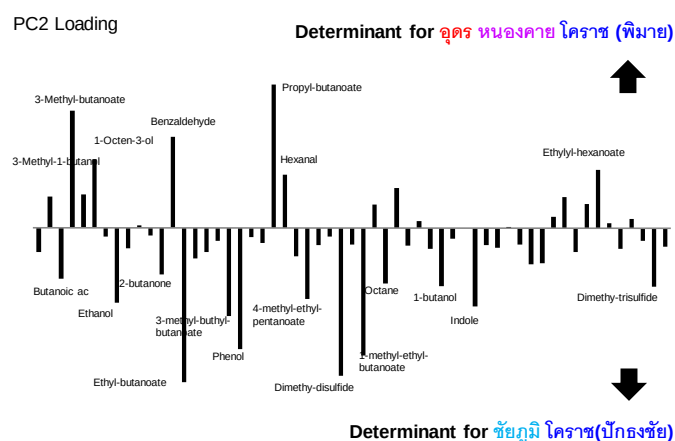
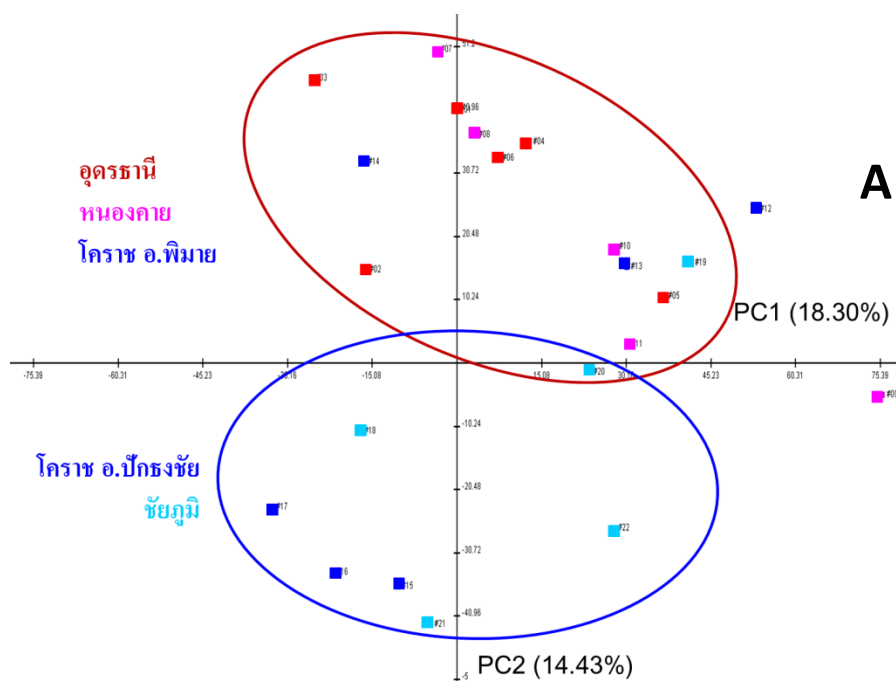
ในปริมาณที่สูงกว่าตัวอย่างกลุ่มแรก ซึ่งคณะผู้วิจัยจะทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้อมูลดังกล่าวเพิ่มเติมร่วมกับข้อมูลชนิดและกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในระหว่างระยะต่างๆ ของกระบวนการหมัก เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ด้านนี้ต่อไป



ภาพที่ 14 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาแรดด้วย PCA จากข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด **อุดรธานี-หนองคาย นครราชสีมา-ชัยภูมิ** และ **สกลนคร-นครพนม** (A) แสดง PCA score plot และ (B) แสดงค่า Loading plot ของสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็น potential biomarker บน PC ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาแรดได้

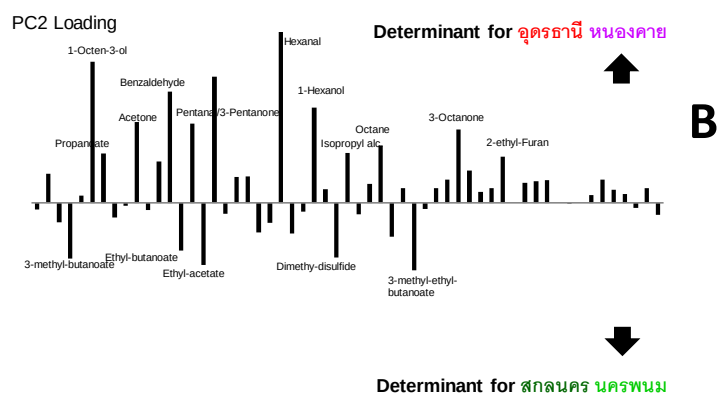
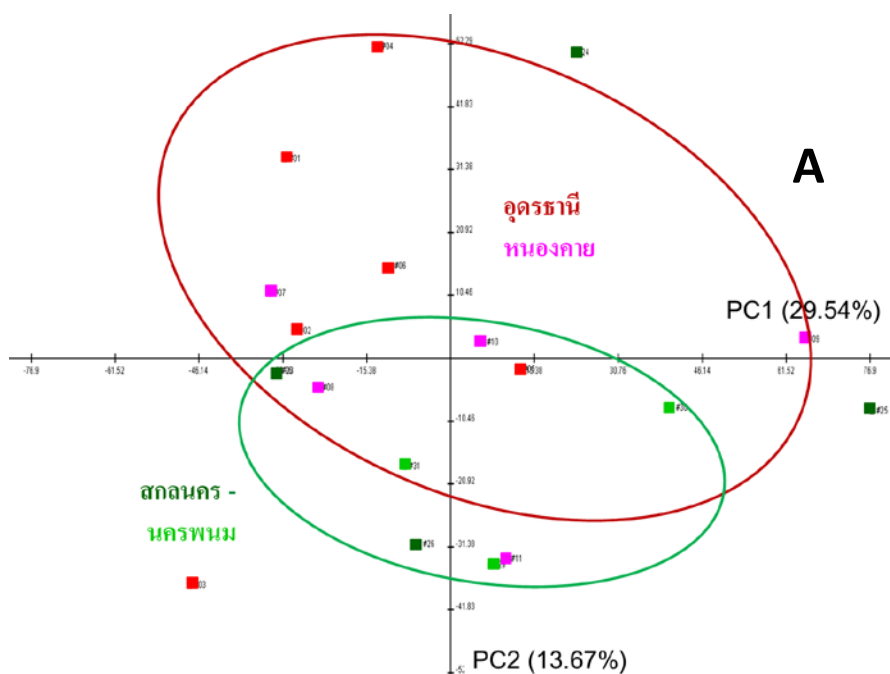
(2) การวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาไร้ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) และรายงานสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่มีแนวโน้มเป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพ (potential biomarker) โดยเปรียบเทียบทีละคู่เขตพื้นที่การผลิต (pairwise discrimination)

(2.1) การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาไร้ด้วย PCA จากข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด **อุดรธานี-หนองคาย** และ **นครราชสีมา-ชัยภูมิ** (n = 22) ผลการวิเคราะห์ด้วย PCA สามารถแสดงให้เห็นรูปแบบ (pattern) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ชัดเจนกว่าผลที่ได้จากการจัดกลุ่มด้วย HCA ในข้อ 4.2.1 โดยแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างปลาไร้จากจังหวัดอุดรธานี หนองคาย และนครราชสีมา (อ.พิมาย) มีความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายจากตัวอย่างปลาไร้ที่ผลิตในจังหวัดชัยภูมิ และนครราชสีมา (อ.ปักธงชัย) อย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 15 ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาไร้ทุกตัวอย่าง (overall discrimination) ในข้อ 5.1 เมื่อพิจารณาข้อมูล loading plot ของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายบน PC-2 (แกน Y) จะพบว่าตัวอย่างปลาไร้ที่ผลิตในจังหวัดอุดรธานี หนองคาย นครราชสีมา (อ.พิมาย) จะมีสารประกอบ 3-methyl-1-butanol, 3-methyl-butanoate, 1-octen-3-ol, benzaldehyde, propyl-butanoate, hexanal และ ethyl-hexanoate ในปริมาณที่สูงกว่าตัวอย่างปลาไร้ที่ผลิตในจังหวัดชัยภูมิ และนครราชสีมา (อ.ปักธงชัย) ในทางตรงข้าม ปลาไร้ที่ผลิตในกลุ่มหลังจะมีสารประกอบ butanoic acid และอนุพันธ์ของกรดดังกล่าว (R-butanoate) ethanol, phenol, dimethyl-disulfide, dimethyl-trisulfide, 4-methyl-ethyl-pentanoate, octane, indole และ 1-butanol ในปริมาณที่สูงกว่าตัวอย่างกลุ่มแรก ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์เพื่อระบุสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพของปลาไร้ในกลุ่มนี้ ดังแสดงในข้อ 5.1 โดยคณะผู้วิจัยจะทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้อมูลดังกล่าวเพิ่มเติม ร่วมกับข้อมูลชนิดและกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในระหว่างระยะต่างๆ ของกระบวนการหมัก เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ด้านนี้ต่อไป



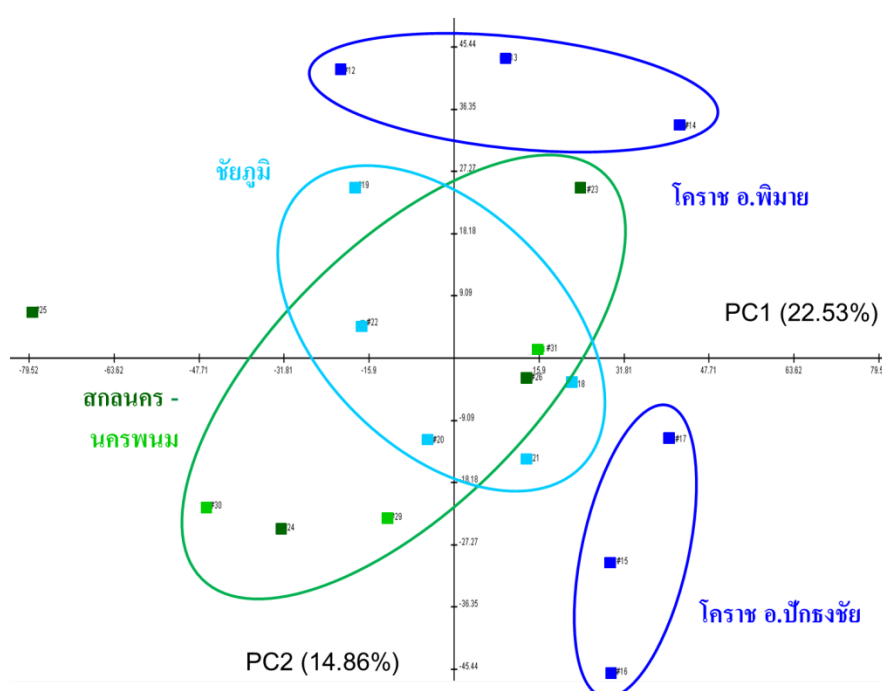
ภาพที่ 15 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาด้วย PCA จากข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด อุดรธานี-หนองคาย และ นครราชสีมา-ชัยภูมิ (A) แสดง PCA score plot และ (B) แสดงค่า Loading plot ของสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็น potential biomarker บน PC ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาได้

(2.2) การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาร้าด้วย PCA จากข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด **อุดรธานี-หนองคาย** และ **สกลนคร-นครพนม** ( $n = 18$ ) ผลการวิเคราะห์ด้วย PCA สามารถแสดงให้เห็นรูปแบบ (pattern) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการจัดกลุ่มด้วย HCA ในข้อ 4.2.2 โดยแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างปลาร้าจากจังหวัดอุดรธานี และหนองคาย มีความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายจากตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในจังหวัดนครพนม และข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในตัวอย่างปลาร้าจากจังหวัดสกลนครมีรูปแบบการกระจายตัวที่ไม่สม่ำเสมอ ดังแสดงในภาพที่ 16 ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาร้าทุกตัวอย่าง (overall discrimination) ในข้อ 5.1 เมื่อพิจารณาข้อมูล loading plot ของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายบน PC-2 (แกน Y) เพื่อระบุหาสารที่สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพ จะพบว่าตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในจังหวัดอุดรธานี และหนองคาย จะมีสารประกอบ 1-octen-3-ol, propanoic acid, acetone, benzaldehyde, pentanal, 3-pentanone, hexanal, 1-hexanol, isopropyl alcohol, octane, 3-octanone และ 2-ethyl-furan ในปริมาณที่สูงกว่าตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในจังหวัดนครพนม ในทางตรงข้าม ปลาร้าที่ผลิตในกลุ่มหลังจะมีสารประกอบ อนุพันธ์ของกรด butanoic (R-butanoate), ethyl-acetate และ dimethyl-disulfide ในปริมาณที่สูงกว่าตัวอย่างกลุ่มแรก ซึ่งเป็นข้อมูลเสริมกับผลการวิเคราะห์เพื่อระบุสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพของปลาร้าผลิตในจังหวัดนครพนมจากข้อ 5.1 โดยคณะผู้วิจัยจะทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้อมูลดังกล่าวเพิ่มเติม ร่วมกับข้อมูลชนิดและกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในระหว่างระยะต่างๆ ของกระบวนการหมัก เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ด้านนี้ต่อไป



ภาพที่ 16 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาร้าด้วย PCA จากข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด อุดรธานี-หนองคาย และ สกลนคร-นครพนม (A) แสดง PCA score plot และ (B) แสดงค่า Loading plot ของสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้เป็น potential biomarker บน PC ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาร้าได้

(2.3) การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาไร้ด้วย PCA จากข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด นครราชสีมา-ชัยภูมิ และ สกลนคร-นครพนม ( $n = 18$ ) ผลการวิเคราะห์ด้วย PCA สามารถแสดงให้เห็นรูปแบบ (pattern) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการจัดกลุ่มด้วย HCA ในข้อ 4.2.3 โดยแสดงให้เห็นว่าจากข้อมูลที่ยังไม่สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างปลาร้าระหว่างจังหวัดชัยภูมิ สกลนคร และนครพนมได้อย่างชัดเจน ยกเว้นตัวอย่างปลาร้าจาก อ.พิมาย และ อ.ปักธงชัย จังหวัดนครราชสีมา พบว่ามีความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายอย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 17



ภาพที่ 17 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาร้าด้วย PCA จากข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด นครราชสีมา-ชัยภูมิ และ สกลนคร-นครพนม แสดงในรูปแบบ PCA score plot



#### 2.1.4.2 การวิเคราะห์รูปแบบกรดอะมิโนอิสระ (Free amino acid profile)

การอภิปรายผลดังแสดงในหัวข้อ 1 ถึง 4 ตามลำดับ

ก. รายการตัวอย่างและ analysis codes (ตัวอย่างหลัก 28 samples)

ผู้วิจัยได้ดำเนินการคัดเลือกตัวอย่างปลาร้า โดยใช้ตัวอย่างเดียวกับที่ได้รับการคัดเลือกเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย ดังแสดงไปก่อนหน้านี้ โดยคัดเลือกตัวอย่างปลาร้าที่เหมาะสมเพื่อเป็นตัวแทนของแต่ละเขตพื้นที่การผลิต ครอบคลุมทั้งปลาร้าปลาเดี่ยว ปลาร้าปลารวม ปลาร้าปลาตัว ปลาร้าโหนด ปลาร้าหนัง ปลาร้าปลาเกล็ด จำนวนรวมทั้งสิ้น 28 ตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid) ดังแสดงในตารางที่ 14 โดยมีสมมติฐานว่าการเปลี่ยนแปลงเชิงปริมาณของกรดอะมิโนอิสระในตัวอย่างปลาร้า น่าจะมีความสัมพันธ์กับข้อมูลชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ (microbial composition) รวมทั้งกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมเพื่อย่อยสลายโปรตีน (proteolytic activity) และมีความสัมพันธ์กับกระบวนการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายจากเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโน (amino acid metabolism) ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับชนิดและปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักของปลาวัตถุดิบและระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก

**ตารางที่ 14** ข้อมูลตัวอย่างปลาร้าตัวแทนจากเขตพื้นที่การผลิตต่าง ๆ ที่คัดเลือกเพื่อมาวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระด้วยเทคนิค HPLC

| รหัส HPLC | รหัสตัวอย่าง | จังหวัด    | อำเภอ                | ชนิดปลาร้า/ปลา/แหล่งน้ำ                        |
|-----------|--------------|------------|----------------------|------------------------------------------------|
| 1         | 6UN-S        | อุดรธานี   | อ.เมือง              | ปลาร้าตัว/สร้อย/เขื่อนห้วยหลวง                 |
| 2         | 1UN-S        |            |                      | ปลาร้าตัว/นิล/กระซังน้ำโขง                     |
| 3         | 5UN-S        |            |                      | ปลาร้าตัว/นิล/เขื่อนห้วยหลวง                   |
| 4         | 7UN-M        |            | อ.สร้างคอม           | ปลาร้ารวม/สร้อย-ขาวหัวแข็ง/อ่างน้ำพาน          |
| 5         | 8UN-M        |            |                      | ปลาร้ารวม/ชีว-ตะเพียน/อ่างน้ำพาน               |
| 6         | 9UN-M        |            |                      | ปลาร้ารวม/แขยง-ตะเพียน/อ่างน้ำพาน              |
| 7         | 3UN-S        | หนองคาย    | อ.ศรีเชียงใหม่       | ปลาร้าตัว/นิล/กระซังน้ำโขง                     |
| 8         | 4UN-S        |            |                      | ปลาร้าตัว/นิล/กระซังน้ำโขง                     |
| 9         | 10UN-M       |            | อ.โพนพิสัย           | ปลาร้ารวม/แขยง-ตะเพียน-ชีว/หนองน้ำธรรมชาติ     |
| 10        | 11UN-M       |            |                      | ปลาร้ารวม/แขยง-ตะเพียน-ชีว/หนองน้ำธรรมชาติ     |
| 11        | 12UN-M       |            |                      | ปลาร้ารวม/คั่ว-ชีว/หนองน้ำธรรมชาติ             |
| 12        | 1NC-S        | นครราชสีมา | อ.พิมาย              | ปลาร้าเดี่ยว/ปลากระดี่/แม่น้ำมูล               |
| 13        | 2NC-S        |            |                      | ปลาร้าเดี่ยว/ปลาหมอ/แม่น้ำมูล                  |
| 14        | 3NC-S        |            |                      | ปลาร้าเดี่ยว/ปลาขาวหรือปลาสร้อย/แม่น้ำมูล      |
| 15        | 7NC-S        |            | อ. ปักธงชัย          | ปลาร้าเดี่ยว/ปลาสร้อย/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์     |
| 16        | 8NC-S        |            |                      | ปลาร้าเดี่ยว/ปลาสร้อย/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์     |
| 17        | 9NC-S        |            |                      | ปลาร้าเดี่ยว/ปลาสร้อย/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์     |
| 18        | 4NC-M        | ชัยภูมิ    | อ. ด่านขุนทด (โคราข) | ปลาร้ารวม/ปลาสร้อย-ปลาจวด/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ |
| 19        | 5NC-S        |            |                      | ปลาร้าเดี่ยว/ปลากระดี่/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์    |
| 20        | 12NC-M       |            | อ. จัตุรัส           | ปลาร้ารวม/ปลารวม/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์          |
| 21        | 11NC-M       |            |                      | ปลาร้ารวม/ปลารวม/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์          |
| 22        | 10NC-S       |            |                      | ปลาร้ารวม/ปลารวม/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์          |
| 23        | 7SN-M        | สกลนคร     | อ.เมือง              | ปลาร้าโหน่ง/ปลาหลายชนิด/เขื่อนน้ำอูน           |
| 24        | 3SN-M        |            | อ.อากาศอำนวย         | ปลาร้ารวม/ปลาหลายชนิด/แม่น้ำสงคราม             |
| 25        | 4SN-M        |            |                      | ปลาร้ารวม/ปลาหลายชนิด/แม่น้ำสงคราม             |
| 28        | 8SN-M        | นครพนม     | อ.ธาตุพนม            | ปลาร้าเกล็ด/ปลาเกล็ดหลายชนิด/แม่น้ำโขง         |
| 29        | 9SN-M        |            |                      | ปลาร้าหนัง/ปลาหนังหลายชนิด/แม่น้ำโขง           |
| 30        | 5SN-M        |            |                      | ปลาร้าหนัง/แขยง/แม่น้ำสงคราม                   |

ข. รายการปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิดในตัวอย่างปลาร้าจากการวิเคราะห์ด้วย

เทคนิค HPLC

จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิดในตัวอย่างปลาร้าด้วยเทคนิค HPLC

สามารถจัดเรียงรายการกรดอะมิโนอิสระดังกล่าวตามปริมาณที่พบในตัวอย่างปลาร้า โดยจำแนกตามเขต

พื้นที่การผลิตหลัก นั่นคือ กลุ่มจังหวัด (i) อุตรธานี-หนองคาย (ii) สกลนคร-นครพนม และ (iii)

นครราชสีมา-ชัยภูมิ ดังแสดงในตารางที่ 15

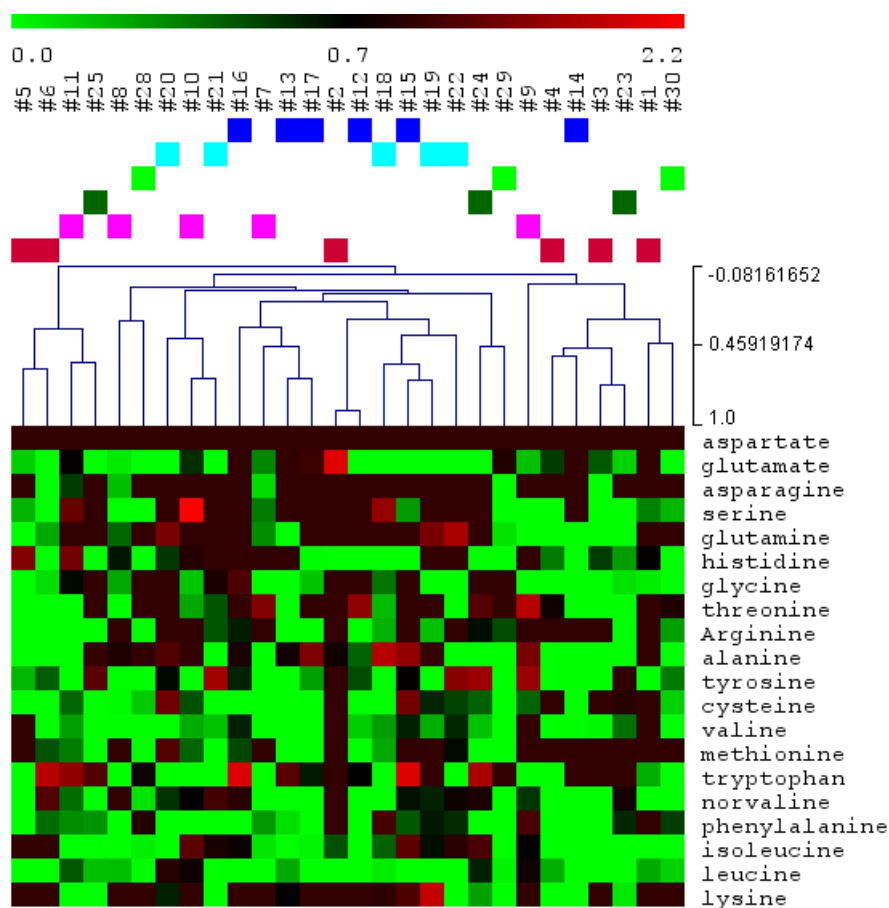
**ตารางที่ 15** ข้อมูลปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิดที่ตรวจพบในปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) รวมมากที่สุด  
ที่สุดในตัวอย่างปลาร้าด้วยเทคนิค HPLC จำแนกตามเขตพื้นที่การผลิต

| ลำดับ | อุดร-หนองคาย (n=11) |                                                                   | สกลนคร-นครพนม (n=6) |                                                               | นครราชสีมา-ชัยภูมิ (n = 11 ) |                                                              |
|-------|---------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|       | กรดอะมิโน           | Relative abundance*<br>(log <sub>10</sub> arbitrary unit<br>± SD) | กรดอะมิโน           | Relative abundance<br>(log <sub>10</sub> arbitrary unit ± SD) | กรดอะมิโน                    | Relative abundance<br>(log <sub>10</sub> arbitrary unit ±SD) |
| 1     | histidine           | 2.0 ± 0.5                                                         | arginine            | 2.1 ± 0.4                                                     | arginine                     | 2.3 ± 0.1                                                    |
| 2     | leucine             | 1.9 ± 0.5                                                         | leucine             | 2.0 ± 0.4                                                     | alanine                      | 2.1 ± 0.3                                                    |
| 3     | valine              | 1.8 ± 0.4                                                         | valine              | 1.9 ± 0.3                                                     | glutamine                    | 2.1 ± 0.8                                                    |
| 4     | glutamate           | 1.8 ± 0.2                                                         | cysteine            | 1.9 ± 0.1                                                     | isoleucine                   | 2.0 ± 0.3                                                    |
| 5     | glutamine           | 1.8 ± 0.5                                                         | tyrosine            | 1.8 ± 0.3                                                     | serine                       | 1.9 ± 0.3                                                    |
| 6     | alanine             | 1.7 ± 0.6                                                         | phenylalanine       | 1.7 ± 0.4                                                     | valine                       | 1.8 ± 0.5                                                    |
| 7     | methionine          | 1.7 ± 0.1                                                         | glutamine           | 1.7 ± 0.6                                                     | tyrosine                     | 1.8 ± 0.3                                                    |
| 8     | isoleucine          | 1.7 ± 0.6                                                         | isoleucine          | 1.6 ± 0.6                                                     | lysine                       | 1.7 ± 0.3                                                    |
| 9     | cysteine            | 1.6 ± 0.4                                                         | histidine           | 1.6 ± 0.4                                                     | leucine                      | 1.7 ± 0.6                                                    |
| 10    | phenylalanine       | 1.6 ± 0.4                                                         | tryptophan          | 1.6 ± 0.4                                                     | phenylalanine                | 1.6 ± 0.4                                                    |
| 11    | serine              | 1.5 ± 0.4                                                         | valine              | 1.5 ± 0.2                                                     | cysteine                     | 1.6 ± 0.5                                                    |
| 12    | tyrosine            | 1.5 ± 0.5                                                         | glutamate           | 1.5 ± 0.3                                                     | methionine                   | 1.6 ± 0.4                                                    |
| 13    | valine              | 1.1 ± 0.4                                                         | alanine             | 1.5 ± 0.6                                                     | valine                       | 1.6 ± 0.3                                                    |
| 14    | tryptophan          | 1.4 ± 0.5                                                         | threonine           | 1.5 ± 0.2                                                     | histidine                    | 1.5 ± 0.8                                                    |
| 15    | asparagine          | 1.4 ± 0.2                                                         | serine              | 1.4 ± 0.2                                                     | tryptophan                   | 1.4 ± 0.6                                                    |
| 16    | glycine             | 1.3 ± 0.1                                                         | asparagine          | 1.4 ± 0.0                                                     | threonine                    | 1.4 ± 0.3                                                    |
| 17    | threonine           | 1.3 ± 0.4                                                         | glycine             | 1.3 ± 0.1                                                     | glycine                      | 1.3 ± 0.4                                                    |
| 18    | lysine              | 0.6 ± 0.3                                                         | lysine              | 1.2 ± 0.5                                                     | glutamate                    | 0.1 ± 0.5                                                    |
| 19    | arginine            | 0.4 ± 0.4                                                         | methionine          | 1.1 ± 0.5                                                     | aspartate                    | ND                                                           |
| 20    | aspartate           | ND                                                                | aspartate           | ND                                                            | asparagine                   | ND                                                           |

หมายเหตุ \*Relative abundance คือค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละสารที่ได้จากการอินทิเกรตโครมาโตแกรม

ค. ผลการวิเคราะห์จัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือน (overall similarity basis) ของข้อมูลกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) ด้วย Pearson correlation

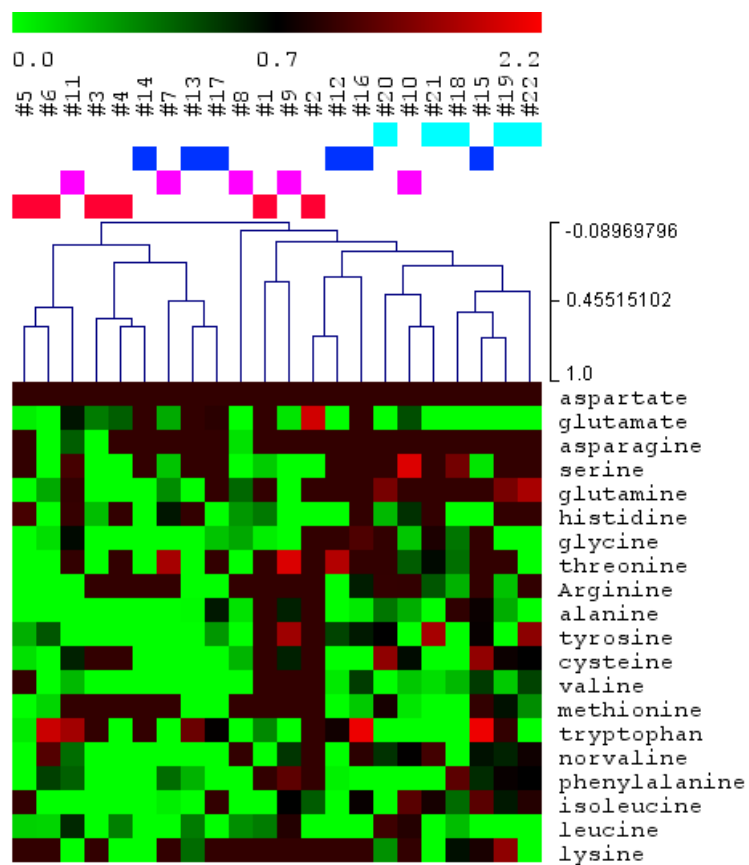
การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ในทุกตัวอย่าง (overall similarity clustering) (n = 28) ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าจากข้อมูลที่มียังไม่สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างปลาร้าภายในจังหวัดเดียวกันและระหว่างเขตพื้นที่การผลิตได้อย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 18-23



ภาพที่ 18 การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด **อุดรธานี-หนองคาย** **นครราชสีมา-ชัยภูมิ** และ **สกลนคร-นครพนม** แสดงค่าปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) ของกรดอะมิโนชนิดเดียวกันจากต่ำไปสูงตามลำดับ

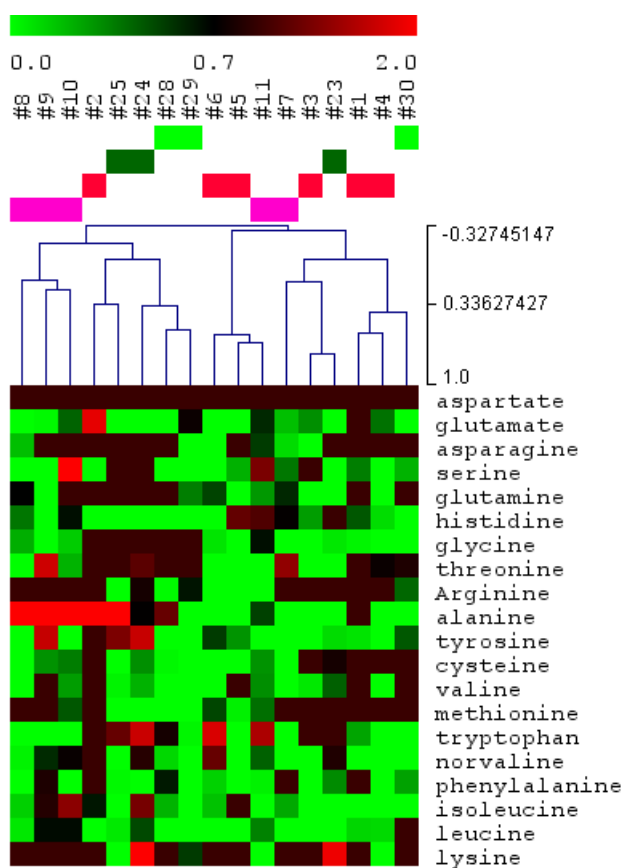
(1) การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาไร้ตามความเหมือนของข้อมูลกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด โดยเปรียบเทียบทีละคู่เขตพื้นที่การผลิต (pairwise clustering)

(1.1) การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาไร้ตามความเหมือนของข้อมูลกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด **อุดรธานี-หนองคาย** และ **นครราชสีมา-ชัยภูมิ** (n = 22)



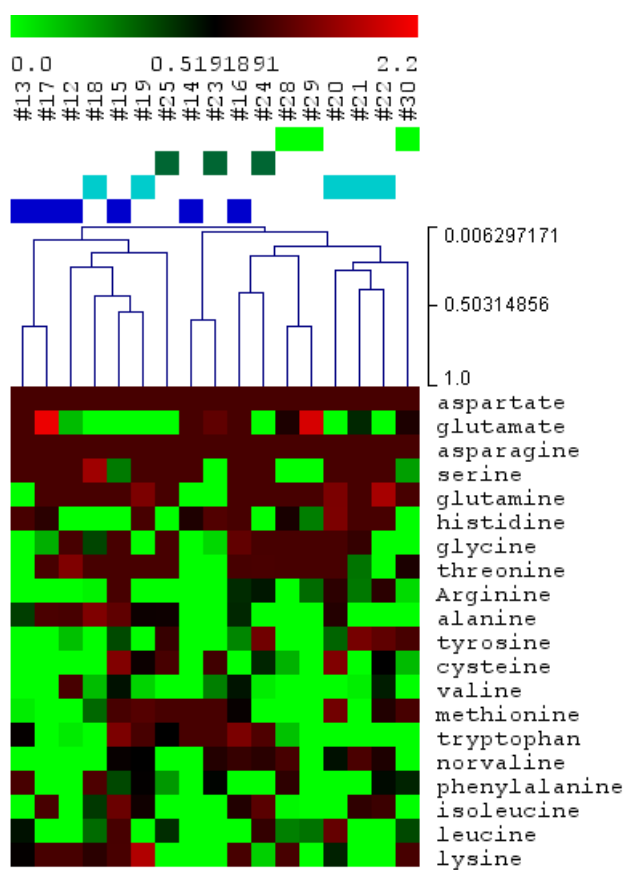
ภาพที่ 19 การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาไร้ตามความเหมือนของข้อมูลกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด **อุดรธานี-หนองคาย** และ **นครราชสีมา-ชัยภูมิ** แสดงค่าปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) ของกรดอะมิโนชนิดเดียวกันจากต่ำไปสูงตามลำดับ

(1.2) การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาไร้ตามความเหมือนของข้อมูลกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด **อุดรธานี-หนองคาย** และ **สกลนคร-นครพนม** (n = 18)



ภาพที่ 20 การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาไร้ตามความเหมือนของข้อมูลกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด **อุดรธานี-หนองคาย** และ **สกลนคร-นครพนม** แสดงค่าปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) ของกรดอะมิโนชนิดเดียวกันจากต่ำไปสูงตามลำดับ

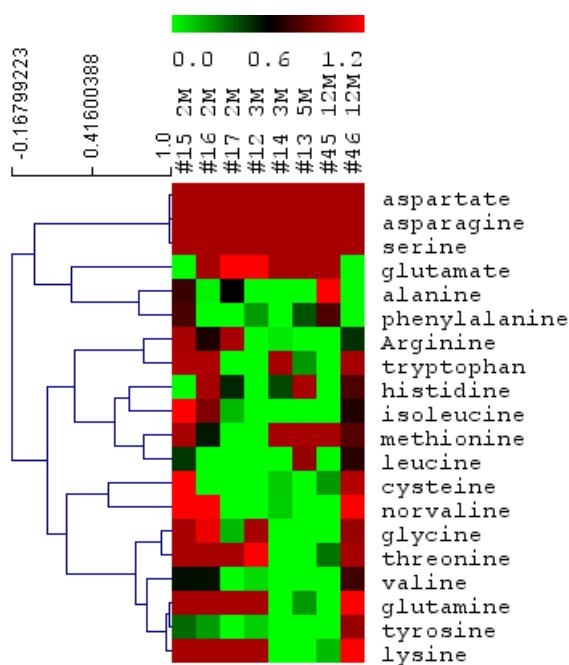
(1.3) การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาจำตามความเหมือนของข้อมูลกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด นครราชสีมา-ชัยภูมิ และ สกลนคร-นครพนม (n = 18)



ภาพที่ 21 การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาจำตามความเหมือนของข้อมูลกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ระหว่างเขตพื้นที่ การผลิตจังหวัด นครราชสีมา-ชัยภูมิ และ สกลนคร-นครพนม แสดงค่าปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) ของกรดอะมิโนชนิดเดียวกันจากต่ำไปสูงตามลำดับ

(2) การจัดกลุ่มรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ในตัวอย่างปลาร้าตามระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมักด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) ด้วย Pearson correlation

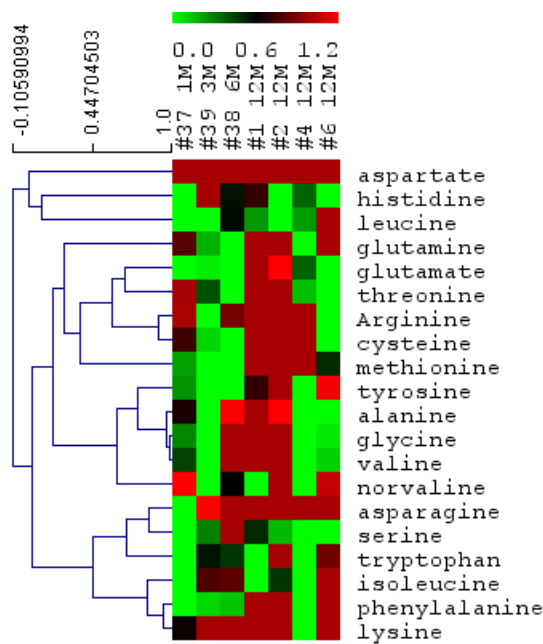
(2.1) การจัดกลุ่มรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ในตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในเขตพื้นที่จังหวัด นครราชสีมา โดยคัดเลือกตัวอย่างปลาร้า (หลักและเสริม) ตามระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก ดังแสดงในตาราง 8 ก่อนหน้านี้ (see volatile metabolite)



ภาพที่ 22 การจัดกลุ่มรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ในตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในเขตพื้นที่จังหวัด นครราชสีมา ตามระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก  แสดงค่าปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) ของกรดอะมิโนชนิดเดียวกันจากต่ำไปสูงตามลำดับ



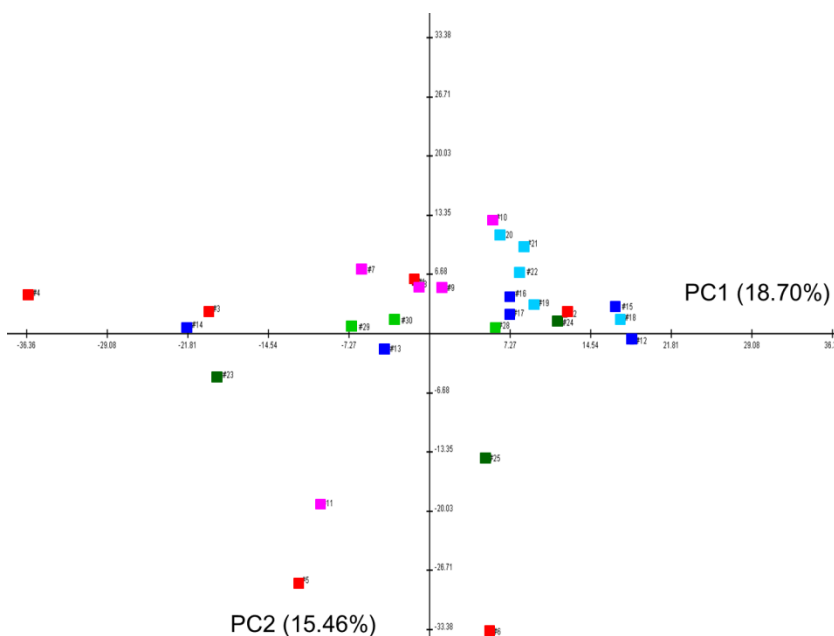
(2.2) การจัดกลุ่มรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ในตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในเขตพื้นที่จังหวัด **อุดรธานี** โดยคัดเลือกตัวอย่างปลาร้า (หลักและเสริม) ตามระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก ดังแสดงในตาราง 8 ก่อนหน้านี้ (see volatile metabolite)



ภาพที่ 23 การจัดกลุ่มรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ในตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในเขตพื้นที่จังหวัด **อุดรธานี** ตามระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก  แสดงค่าปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) ของกรดอะมิโนชนิดเดียวกันจากต่ำไปสูงตามลำดับ

ง. การวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิด ระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาร้าด้วยเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis: PCA) และรายงานปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่มีแนวโน้มเป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพ (potential biomarker) ของปลาร้าในแต่ละเขตพื้นที่การผลิต

การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาร้าด้วย PCA จากข้อมูลปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 20 ชนิดในทุกตัวอย่าง (overall discrimination) (n = 28) ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าจากข้อมูลที่ยังไม่สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างปลาร้าภายในจังหวัดเดียวกันและระหว่างเขตพื้นที่การผลิตได้อย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 24



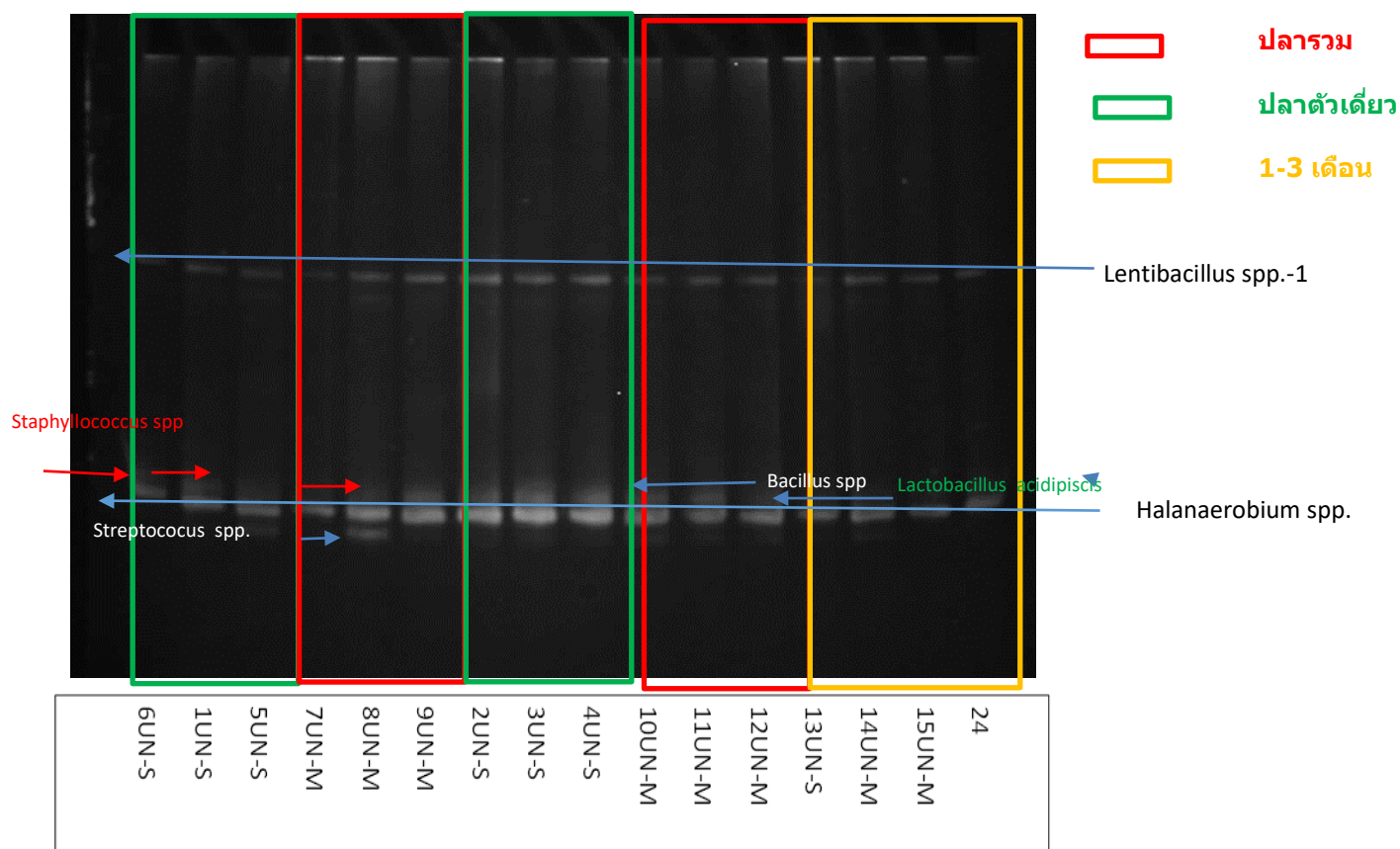
ภาพที่ 24 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาร้าด้วย PCA จากข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด **อุดรธานี-หนองคาย** **นครราชสีมา-ชัยภูมิ** และ **สกลนคร-นครพนม** แสดงในรูปแบบ PCA score plot

จากผลการวิเคราะห์หารูปแบบข้อมูลปริมาณกรดอะมิโนอิสระในตัวอย่างปลาร้า ดังแสดงในข้อ ค. และ ง. แสดงให้เห็นว่าปริมาณสารดังกล่าวยังไม่สามารถใช้ระบุรูปแบบ (pattern) ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างปลาร้าภายในจังหวัดเดียวกันและระหว่างเขตพื้นที่การผลิตได้อย่างชัดเจน ผู้วิจัยจึงขอยุติการดำเนินการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระด้วยเทคนิค HPLC เพื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาร้าที่หมักแบบวิธีปกติและหมักแบบวิธีเร่งโดยใช้หัวเชื้อชีวภาพในช่วงหลังของโครงการฯ

## 2.2 ศึกษาารูปแบบการหมักและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักปลาร้า

ตรวจสอบรูปแบบของจุลินทรีย์และบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการหมักในแต่ละช่วงของการหมักด้วยเทคนิค cultural independent และเทคนิค cultural independent ด้วยวิธี Reverse Transcriptase PCR Denaturing gradient gel electrophoresis (RT-PCR-DGGE) ในตัวอย่างปลาร้าที่เป็นตัวแทนของการผลิตในทุกพื้นที่ตามรายการที่แสดงในตารางที่ 1, 3 และ 5 รวมถึงรวมถึงปลาร้าที่อยู่ระหว่างการหมักจากรายเดียวกันกับที่แสดงในทั้ง 3 ตารางข้างต้น เพื่อนำไปตรวจสอบรูปแบบการหมักโดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักรวมถึงการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี สารเมตาบอไลต์ต่าง ๆ เพื่อตรวจสอบกลไกการหมักและสารเมตาบอไลต์ที่สามารถใช้บ่งชี้อัตลักษณ์เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกจุลินทรีย์สำหรับใช้ผลิตกล้าเชื้อ รูปแบบกล้าเชื้อที่เหมาะสมกับปลาร้าที่ผลิต ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 25 และ 26 และตาราง ที่ 16-20

จากผลการตรวจสอบรูปแบบของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในปลาร้าตัวอย่างจากหนองคายและอุดรธานีพบว่ารูปแบบของจุลินทรีย์หลักมีรูปแบบเหมือนกันกล่าวคือ จะพบจุลินทรีย์ชนิด *Halanaerobium* spp. และ *Lentibacillus* spp. เป็นจุลินทรีย์หลักในทุกตัวอย่าง (ภาพที่ 25 ตารางที่ 16) โดยแถบ cDNA ของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดมีความเข้มใกล้เคียงกัน และพบแนวโน้มว่าปลาร้าที่หมักจากปลารวมจะมีความหลากหลายของจุลินทรีย์มากกว่า โดยพบแถบดีเอ็นเอของจุลินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ *Bacillus* spp. เพิ่มเติมในตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในอำเภอศรีเชียงใหม่ จังหวัดหนองคาย จากสองตัวอย่าง (3-4UN-S) ซึ่งเป็นปลาร้าที่หมักเป็นเวลา 1 ปีขึ้นไป ส่วนปลาร้าที่หมักด้วยกระบวนการผลิตเดียวกันแต่หมักเพียง 4 เดือน (2UN-S) จะไม่พบแถบ cDNA ดังกล่าว และ พบ *Lactobacillus acidipiscis* ในปลาร้าจากโพนพิสัย ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ไม่ได้ใช้เกลือจากอำเภอบ้านดุงทั้ง 3 ตัวอย่างจังหวัดหนองคายในทั้งสามตัวอย่าง (10-12UN-M) เป็นต้น ส่วนปลาร้าตัวอย่างที่หมักในระยะเริ่มต้นคือ เก็บตัวอย่างในช่วง 1 ถึง 3 เดือนนั้นพบเฉพาะแถบดีเอ็นเอของจุลินทรีย์หลัก คือ *Halanaerobium* spp. และ *Lentibacillus* spp. เท่านั้น โดยตัวอย่างที่อยู่ในช่วงการหมักเริ่มต้นจะพบแถบ cDNA ของ *Lentibacillus* spp. ที่จางกว่าอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้ตัวอย่างที่ตรวจพบการปนเปื้อนของ *Staphylococcus aureus* ดังแสดงในตารางที่ 2 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1UN-S, 6UN-S และ 8UN-M นั้นจะปรากฏแถบ cDNA ของ *Staphylococcus* spp. ในทั้งสามตัวอย่าง ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าหากมีจุลินทรีย์ดังกล่าวปนเปื้อนอยู่ในระบบ *Staphylococcus* จะเพิ่มจำนวนและแสดงออกทางพันธุกรรมในตัวอย่างปลาร้าได้



ภาพที่ 25 แถบ cDNA ของจุลินทรีย์หลักที่พบในการหมักปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดอุดรธานีและหนองคาย

เมื่อตรวจสอบแถบ cDNA ของจุลินทรีย์ในตัวอย่างปลาร้าจากสกลนครและนครพนม (ตารางที่ 17) พบว่า จุลินทรีย์หลักที่พบในระบบการหมักคล้ายกับปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่อุดรธานีและหนองคาย คือ พบการแสดงออกทาง พันธุกรรมของ *Halanaerobium* spp และ *Lentibacillus* spp เป็นส่วนใหญ่ แต่ในบางตัวอย่างพบแถบ cDNA ของ *Tetragenococcus halophilus* แทน *Lentibacillus* spp ในตัวอย่างที่ผลิตโดยใช้เกลือจากบ้านท่าสะอาด อำเภอสว่างแดนดิน และส่วนใหญ่จะพบในตัวอย่างที่เป็นปลาร้ารวม (1SN-S, 2SN-M, 6SN-M, 7SN-M และ 12SN-M) และตัวอย่างที่พบรูปแบบ cDNA แบบนี้จะเป็นอย่างที่หมักเกิน 12 เดือนเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้พบตัวอย่าง แถบดีเอ็นเอของจุลินทรีย์เพิ่มเติมในตัวอย่างจากสกลนคร เช่น *Lactobacillus acidipiscis* และ *Lactobacillus* spp. ในตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่อำเภอสว่างแดนดินที่ใช้ปลาและเกลือจากแหล่งเดียวกัน ซึ่งความหลากหลายของ จุลินทรีย์ที่พบเพิ่มขึ้นดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับรูปแบบจุลินทรีย์ที่พบในจังหวัดอุดรธานีและหนองคาย ซึ่งน่าจะเกิด จากเวลาที่ใช้ในการหมักปลาร้าที่ซึ่งทั้ง 4 พื้นที่จะผลิตปลาร้าด้วยการหมักเป็นระยะเวลานานกว่า 6 เดือนขึ้นไปจึงทำ ให้กระบวนการหมักดำเนินขึ้นมากกว่า 2 ขั้นตอน คือช่วงต้นที่ดำเนินการโดย *Halanaerobium* spp และ *Lentibacillus* spp และช่วงที่ 2 ของการหมักที่เกิดจากจุลินทรีย์ที่น่าจะทำหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน สารอาหารที่มีขนาดเล็ก เช่น กรดอะมิโนหรือน้ำตาล เกิดเป็นสารเมตาบอไลต์ โดยเฉพาะสารระเหย และกรดอินทรีย์

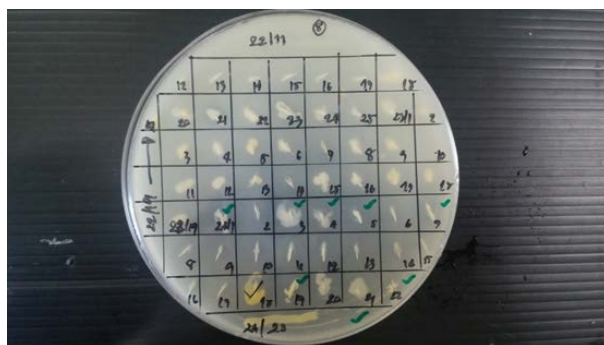
ที่ทำให้ปลาร้ามีกลิ่นรสที่ซับซ้อนมากขึ้น ซึ่งจุลินทรีย์ที่พบในช่วงปลายของการหมัก ได้แก่ *Tetragenococcus* และ *Lactobacillus* เป็นจุลินทรีย์ที่มีรายงานการพบในระบบการหมักน้ำปลาและอาหารหมักอื่นๆ ที่คล้ายกัน ซึ่งจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดมีส่วนเกี่ยวข้องกับสร้างสารที่ให้กลิ่นรสที่ดีในอาหารหมักเหล่านั้น

เมื่อตรวจสอบจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในปลาร้าจากพื้นที่ จังหวัดนครราชสีมาและชัยภูมิ (ตารางที่ 18) พบว่า จุลินทรีย์หลักมีรูปแบบเดียวกับปลาร้าจากพื้นที่อื่น ๆ เช่นกัน คือมี *Halanaerobium* spp และ *Lentibacillus* spp. เป็นจุลินทรีย์หลักในทุกตัวอย่าง แต่พบความแตกต่างที่น่าสนใจคือ ตัวอย่างปลาร้าจากนครราชสีมาและชัยภูมิ จะพบแถบดีเอ็นเอของ *Halanaerobium* spp. เข้มกว่าแถบของ *Lentibacillus* spp. อย่างเห็นได้ชัด และไม่พบแถบ cDNA ของจุลินทรีย์อื่น ๆ เพิ่มเติมในปลาร้าทุกตัวอย่าง (ภาคผนวก ค2) ทั้งนี้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากในระบบการหมักปลาร้าในพื้นที่นี้ปลาร้าที่เก็บเกี่ยวยังอยู่ในช่วงต้นซึ่งจุลินทรีย์โดยเฉพาะ *Halanaerobium* spp เป็นจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ดำเนินกิจกรรมเป็นหลักและ *Lentibacillus* spp. จะเริ่มทำหน้าที่ในการดำเนินการหมักในช่วงถัดมาโดยที่ จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ยังไม่สามารถเพิ่มจำนวนเพื่อแสดงกิจกรรมการหมักได้ซึ่งสอดคล้องกับการพบแถบ cDNA ในตัวอย่างปลาร้าที่หมักในระยะเริ่มต้น คือ 1-3 แรกจากอุดรและหนองคาย ซึ่งเมื่อตรวจสอบปลาร้าในพื้นที่เดียวกัน แต่มีอายุการหมักนานกว่า 6 เดือนจะเริ่มพบแถบ cDNA ของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เช่น *Staphylococcus pasteurii* เพิ่มขึ้น (11NC-M-6M) และพบ *Tetragenococcus halophilus* เพิ่มเติมในตัวอย่างปลาร้าที่หมักนานถึง 12 เดือน (15NC-M-12M) ซึ่งคล้ายกับการพบ *Tetragenococcus halophilus* ในตัวอย่างปลาร้าจากสกลนครและนครพนม ที่หมักนานเกิน 12 เดือน ซึ่งการพบรูปแบบของแถบ cDNA ดังที่ปรากฏในปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและชัยภูมิเป็นการยืนยันได้ว่า *Halanaerobium* spp เป็นจุลินทรีย์ที่น่าจะมีบทบาทในการเริ่มต้นกระบวนการหมักปลาร้าและผลจากการหมักน่าจะทำให้เกิดโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น ย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนหรือสารอาหารที่มีขนาดเล็กทำให้จุลินทรีย์อื่น ๆ สามารถใช้ในการเจริญและร่วมดำเนินกิจกรรมการหมักและสร้างสารเมตาบอไลต์เพิ่มเติมทำให้ปลาร้ามีกลิ่นรสที่ซับซ้อนขึ้น

เมื่อตรวจสอบจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในปลาร้าจากพื้นที่อื่น ๆ ได้แก่ ปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่นครเวียงจันทร์ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว ซึ่งเป็นปลาร้าที่ผลิตจากปลาในแหล่งน้ำธรรมชาติ เชื้อนน้ำจืด รวมถึงปลาร้านำเข้าจากประเทศไทย ซึ่งเป็นปลาทะเล และปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่อำเภอเชียงใน จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งเป็นปลาร้าที่หมักจากปลาผิวดินที่จับจากนาข้าว โดยตัวอย่างปลาร้าเพิ่มเติมทุกตัวอย่างใช้เวลาในการหมักเกิน 6 ขึ้นไป (ตารางที่ 19) จากการตรวจสอบรูปแบบแถบ cDNA *Halanaerobium* spp และ *Lentibacillus* spp. เป็นจุลินทรีย์หลักในทุกตัวอย่างเช่นเดียวกัน โดยตัวอย่างปลาร้า 1 ตัวอย่างจากจังหวัดอุบล (1Ub-M) พบแถบ cDNA ของ *Clostridium* spp. เพิ่มเติม ทั้งนี้อาจเกิดจากปลาที่ใช้เป็นปลาหน้าดินซึ่งอาจมีเศษดินซึ่งเป็นแหล่งของ *Clostridium* ปนเปื้อนในระบบการหมักและจุลินทรีย์ในกลุ่มดังกล่าวเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศได้ดี และอาจมีบาง

สายพันธุ์ที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีเกลือสูงได้ ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวต้องให้ความสำคัญเป็นพิเศษ เนื่องจากเป็นกลุ่มที่มีจุลินทรีย์ก่อโรคบางสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง จากข้อมูลดังกล่าวสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตปลาร้าปลอดภัยได้ โดยเฉพาะในประเด็นของข้อพึงระวังในการเลือกปลาและเตรียมปลาวัตถุดิบในการหมักปลาร้าได้

จากข้อมูลการแสดงออกทางพันธุกรรมในระดับอาร์เอ็นเอของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในปลาร้าที่พบว่าจุลินทรีย์หลักที่ทำหน้าที่ในการหมักปลาร้าที่ผลิตจากทุกพื้นที่ และทุกช่วงการหมักเป็นจุลินทรีย์ที่มีรูปแบบเดียวกัน ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่มีบทบาทหมักในการหมักปลาร้า คือ *Halanaerobium* spp. และ *Lentibacillus* spp. และมีแนวโน้มว่า species ของจุลินทรีย์หลักเหล่านี้แตกต่างกันในตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตจากพื้นที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามเมื่อจากข้อมูลคุณสมบัติของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้พบว่า *Halanaerobium* spp. น่าจะมีบทบาทหลักในการย่อยสลายโปรตีนของปลาและสร้างสารในกลุ่มซัลไฟด์ที่ทำให้ปลาร้ามีสีดำและกลิ่นปลาร้าโดยจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญในภาวะไร้อากาศแบบ obligate anaerobe และเจริญในสภาวะที่มีเกลือในปริมาณสูงได้ดี (Kim and Park, 2014; Lipus et al., 2017) ส่วน *Lentibacillus* spp เป็นจุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสร้างสารให้สีแดงและสร้างกลิ่นรส จึงน่าจะเกี่ยวข้องกับการสร้างสารให้สีที่ทำให้ปลาร้ามีเนื้อและน้ำเป็นสีแดง และให้กลิ่นรสเฉพาะตัวของปลาร้า (Namwong, 2005) ส่วนจุลินทรีย์ที่พบเพิ่มเติมส่วนใหญ่จะพบในตัวอย่างปลาร้าที่ผ่านการหมักเป็นเวลานาน และหมักจากปลารวม ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าจุลินทรีย์เหล่านี้จะมีบทบาทหลักในการสร้างสารให้กลิ่นรสที่ทำให้ปลาร้ามีกลิ่นรสที่เป็นอัตลักษณ์ ดังจะเห็นได้จากข้อมูลสารระเหยของตัวอย่างปลาร้าจากสกลนครที่มีรูปแบบอยู่ในกลุ่มเดียวกับปลาร้าจากอุดรธานีและหนองคาย และพบว่าตัวอย่างเหล่านี้มีจุลินทรีย์ที่พบเพิ่มเติมคล้ายกัน จึงมีความเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวอาจมีความความสัมพันธ์กับสารให้กลิ่นรสในตัวอย่างปลาร้า ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงกระบวนการผลิตปลาร้าพบว่า ปลาร้าที่ผลิตจากสกลนครตัวอย่างที่คล้ายกับตัวอย่างอุดรธานีและหนองคายนั้นเป็นตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในอำเภอสว่างแดนดิน ที่ใช้เกลือจากอำเภอบ้านดุง เช่นเดียวกับสองจังหวัดแรก ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นถึงผลของปัจจัยทางภูมิศาสตร์ต่ออัตลักษณ์ของปลาร้าได้อย่างชัดเจน



ภาพที่ 26 โคโลนีของไอโซเลทที่คัดแยกจากจากตัวอย่างปลาร้าจากสกลนครและนครพนม

จากการตรวจสอบจุลินทรีย์กลุ่มที่ชอบเกลือในตัวอย่างปลาร้าที่เป็นที่เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายหรือปลาร้าพร้อมจำหน่าย (final product) จากทั้ง 6 จังหวัด รวมถึงปลาร้าปลาร้าที่ยังอยู่ในระหว่างการหมักที่เก็บตัวอย่างได้จากบางพื้นที่ ดังแสดงในตารางที่ 7-9 ผลการทดลองพบว่า เมื่อตรวจสอบจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ที่ชอบเกลือ (โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเกลือ 5%) ที่พบในตัวอย่างปลาร้าพร้อมจำหน่าย พบว่าปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดอุดรธานีและหนองคาย สกลนครและนครพนม โดยส่วนใหญ่มีจุลินทรีย์อยู่ในช่วงประมาณ 2-6 log CFU/g ซึ่งต่ำกว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบเกลือในปลาร้าพร้อมจำหน่ายที่ผลิตในพื้นที่โคราชและชัยภูมิอย่างมีนัยสำคัญ ที่อยู่ในช่วงประมาณ 6-9 log CFU/g ทั้งนี้อาจเนื่องปลาร้าพร้อมจำหน่ายของ 4 จังหวัดแรก ได้แก่ อุดรธานี หนองคาย สกลนคร และนครพนม เป็นปลาร้าที่หมักเป็นระยะเวลานานซึ่งทุกตัวอย่างผ่านการหมักมากกว่า 6 เดือน หรือ 1 ปีขึ้นไป กิจกรรมการหมักจึงน่าจะผ่านช่วงการย่อยสลายโปรตีนซึ่งเป็นปฏิกิริยาหลักของการหมักปลาร้าในช่วงต้นไปแล้ว ดังนั้นจุลินทรีย์เหล่านี้จึงมีจำนวนลดลง ส่วนจุลินทรีย์ที่ยังคงอยู่น่าจะเป็นจุลินทรีย์เกี่ยวข้องกับการสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ให้กลิ่นรสเป็นหลักและกลไกดังกล่าวมักจะเกิดในช่วง stationary phase ของเชื้อซึ่งจะไม่มีภาวะเจริญเพื่อแบ่งเซลล์ จึงทำให้พบจุลินทรีย์ดังกล่าวในจำนวนน้อย ในขณะที่ปลาร้าพร้อมจำหน่ายที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและชัยภูมิใช้เวลาในการหมักเพียง 2-6 เดือน ซึ่งน่าจะอยู่ในช่วงการดำเนินกิจกรรมการย่อยโปรตีนซึ่งจุลินทรีย์จะย่อยโปรตีนพร้อมกับเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว จึงทำให้มีจำนวนจุลินทรีย์ในระบบการหมักในช่วงเวลานี้สูงกว่าช่วงปลายของการหมัก ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างปลาร้าเดียวกันอยู่ในช่วงการหมักต่างกัน เช่น ตัวอย่าง 1UN-S จากอุดรที่หมักเป็นเวลา 1 ปี มีจุลินทรีย์เหลืออยู่เพียง 6 log CFU/g แต่เมื่อตรวจสอบในตัวอย่างที่กำลังอยู่ในช่วงหมัก 3 เดือน (1UN-S-3M) มีจุลินทรีย์สูงถึง 7.5 log CFU/g ซึ่งเมื่อพิจารณาจากตัวอย่างเพิ่มเติมอื่น ๆ ก็พบปรากฏการณ์นี้เช่นเดียวกัน จึงอาจกล่าวโดยสรุปได้ว่า จำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบเกลือสัมพันธ์กับระยะเวลาการหมัก ในช่วงต้นของการหมัก 1-6 เดือน จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอสจะเป็นประชากรหลักที่เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นจุลินทรีย์ชนิดที่สามารถใช้กรดอะมิโนแต่ละชนิดได้ดีจะกลายเป็นประชากรหลัก (หลัง 6 เดือน) และดำเนินกิจกรรมในการสร้างสารเมตาบอไลต์ที่เกี่ยวข้องกับกลิ่นรสของปลาร้าในระบบการหมักต่อไป ซึ่งข้อสรุปดังกล่าวสามารถยืนยันด้วยผลการทดสอบสมบัติของจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากระบบการหมักเหล่านี้ โดยพบว่า ไอโซเลทหลักที่แยกได้จากระบบการหมักของปลาร้าพร้อมจำหน่ายจากนครราชสีมาและชัยภูมิ เป็นจุลินทรีย์ที่มีแอสทิวติของโปรตีเอสสูง ในขณะที่ปลาร้าพร้อมจำหน่ายจากอีก 4 พื้นที่เป็นจุลินทรีย์ที่มีโปรตีเอสต่ำหรือไม่มีเป็นส่วนใหญ่ (ไม่แสดงผลการทดลอง) เมื่อพิจารณาถึงความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์ พบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากปลาร้าที่หมักเป็นเวลานานจะมีความหลากหลายของจุลินทรีย์มากกว่า นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ศึกษารูปแบบจุลินทรีย์จากปลาร้าที่มีระบบนิเวศของการหมักแตกต่างจาก 6 จังหวัดที่ศึกษานี้เพิ่มเติม คือ ปลาร้าจากจังหวัดอุบลราชธานีเพื่อศึกษารูปแบบการหมักปลาที่เป็นปลาน้ำจืดจากนาข้าว และปลาร้าจากประเทศลาวซึ่งเป็นปลาจากเขื่อนน้ำจันทและจากแหล่งน้ำธรรมชาติของประเทศลาว เพื่อเป็นตัวแทนระบบการหมักที่มีความแตกต่างของกระบวนการผลิต เพื่อตรวจสอบรูปแบบของจุลินทรีย์และบทบาทของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องเพิ่มเติม (ตารางที่ 10) โดยจะนำผลความหลากหลายและชนิดของจุลินทรีย์มาเปรียบเทียบกับตัวอย่างปลาร้าในพื้นที่ 6 จังหวัดต่อไป

ตารางที่ 16 รูปแบบของจุลินทรีย์ในระบบการหมักปลาร้าในพื้นที่จังหวัดอุดรธานีและหนองคาย

| รหัสตัวอย่าง | ลักษณะปลาร้า | พื้นที่ผลิต           | ปลา/แหล่งน้ำ                  | เทคนิค cultural independent           |                                    |                                                                                                                | เทคนิค cultural independent                                                                                                |
|--------------|--------------|-----------------------|-------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|              |              |                       |                               | จำนวน จุลินทรีย์ ชอบเกลือ (log CFU/g) | จำนวน Isolate (ระบบ Herisson disc) | ชนิดของ ไอโซเลท (%)*                                                                                           | ชนิดของจุลินทรีย์ (ลำดับตามความเข้มข้น DNA)**                                                                              |
| 1UN-S        | ปลาร้าตัว    | อุดร/เมือง            | นิล/กระซังน้ำโขง              | 6.11                                  | 12                                 | 1. <i>Bacillus</i> sp (100%)                                                                                   | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.<br>2. <i>Staphylococcus</i> spp                               |
| 1UN-S-3M     | ปลาร้าตัว    | อุดร/เมือง            | นิล/กระซังน้ำโขง              | 7.45                                  | 29                                 | 1. <i>Bacillus</i> sp (100%)                                                                                   | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.                                                               |
| 2UN-S        | ปลาร้าตัว    | หนองคาย/ ศรีเชียงใหม่ | นิล/กระซังน้ำโขง              | 4.73                                  | 25                                 | 1. <i>Bacillus subtilis</i> (100%)                                                                             | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.                                                               |
| 3UN-S        | ปลาร้าตัว    | หนองคาย/ ศรีเชียงใหม่ | นิล/กระซังน้ำโขง              | 3.23                                  | 17                                 | 1. <i>Bacillus</i> sp (100%)                                                                                   | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.                                                               |
| 3UN-S-1M     | ปลาร้าตัว    | หนองคาย/ ศรีเชียงใหม่ | นิล/กระซังน้ำโขง              | 6.28                                  | 25                                 | 1. <i>Bacillus</i> sp (100%)                                                                                   | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp.                                                               |
| 4UN-S        | ปลาร้าตัว    | หนองคาย/ ศรีเชียงใหม่ | นิล/กระซังน้ำโขง              | 3.23                                  | 15                                 | 1. <i>Bacillus pumilus</i> (67%)<br>2. <i>B. amyloliquefaciens</i> (18%)<br>3. <i>Staphylococcus</i> sp. (15%) | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.<br>3. <i>Bacillus</i> spp                                     |
| 5UN-S        | ปลาร้าตัว    | อุดร/เมือง            | นิล/เขื่อนห้วยหลวง            | 3.04                                  | 11                                 | 1. <i>Bacillus subtilis</i> (100%)                                                                             | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp.                                                               |
| 6UN-S        | ปลาร้าตัว    | อุดร/เมือง            | สร้อย/ เขื่อนห้วยหลวง         | 4.00                                  | 15                                 | 1. <i>Bacillus subtilis</i> (100%)                                                                             | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.<br>2. <i>Staphylococcus</i> spp.                              |
| 7UN-M        | ปลาร้ารวม    | อุดร/ สว่างคอม        | สร้อย/ ขาวหัวแข็ง/ อ่างน้ำพาน | 4.45                                  | 28                                 | 1. <i>B. subtilis</i> (33%)<br>2. <i>Bacillus</i> spp (33%)<br>3. <i>Stap. carnosus</i> (33%)                  | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.                                                               |
| 8UN-M        | ปลาร้ารวม    | อุดร/ สว่างคอม        | ชีว ตะเพียน/ อ่างน้ำพาน       | 4.65                                  | 20                                 | 1. <i>B. altitudinis</i> (50%)<br>2. <i>B. pumilus</i> (50%) .                                                 | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp<br>2. <i>Staphylococcus</i> spp<br>3. <i>Streptococcus</i> spp |



ตารางที่ 16 (ต่อ)

| รหัสตัวอย่าง | ลักษณะปลาร้า | พื้นที่ผลิต       | ปลา/แหล่งน้ำ                      | เทคนิค cultural independent           |                                    |                                                                                              | เทคนิค cultural independent                                                                                           |
|--------------|--------------|-------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|              |              |                   |                                   | จำนวน จุลินทรีย์ ชอบเกลือ (log CFU/g) | จำนวน Isolate (ระบบ Herisson disc) | ชนิดของไอโซเลท (%)*                                                                          | ชนิดของจุลินทรีย์ (ลำดับตาม ความเข้มแถบ DNA)*                                                                         |
| 8UN-M-6M     | ปลาร้าตัว    | อุดร/ สว่างคอม    | ตะเพียน/ อ่างน้ำพาน               | 5.98                                  | 9                                  | 1. <i>Bacillus</i> spp (100%)                                                                | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.                                                          |
| 9UN-M        | ปลาร้ารวม    | อุดร/ สว่างคอม    | แขวง ตะเพียน/ อ่างน้ำพาน          | 3.11                                  | 13                                 | 1. <i>B. pumilus</i> (60%)<br>2. <i>B. atrophaeus</i> (20%)<br>3. <i>B. marisflavi</i> (20%) | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.<br>2. <i>Bacillus</i> spp<br>3. <i>Streptococcus</i> spp |
| 9UN-S-1M     | ปลาร้าตัว    | อุดร/ สว่างคอม    | ตะเพียน/ อ่างน้ำพาน               | 5.61                                  | 7                                  | 1. <i>B. subtilis</i> (100%)                                                                 | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp.                                                          |
| 9UN-M-1M     | ปลาร้ารวม    | อุดร/ สว่างคอม    | แขวง ตะเพียน/ อ่างน้ำพาน          | 6.12                                  | 14                                 | 1. <i>B. subtilis</i> (100%)                                                                 | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp.                                                          |
| 9UN-S        | ปลาร้าตัว    | อุดร/ สว่างคอม    | แขวง / อ่างน้ำพาน                 | 5.72                                  | 9                                  | 1. <i>B. subtilis</i> (100%)                                                                 | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.                                                          |
| 10UN-M       | ปลาร้ารวม    | หนองคาย/ โพนพิสัย | แขวง ตะเพียน ชิว /หนองน้ำธรรมชาติ | 4.14                                  | 15                                 | 1. <i>Bacillus</i> spp (100%)                                                                | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp<br>2. <i>Bacillus</i> spp                                 |
| 11UN-M       | ปลาร้ารวม    | หนองคาย/ โพนพิสัย | แขวง ตะเพียน ชิว /หนองน้ำธรรมชาติ | 4.30                                  | 20                                 | 1. <i>B. amyloliquefaciens</i> (100%)                                                        | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.                                                          |
| 12UN-M       | ปลาร้ารวม    | หนองคาย/ โพนพิสัย | ค้าว ชิว/ หนองน้ำธรรมชาติ         | 2.95                                  | 8                                  | 1. <i>B. amyloliquefaciens</i> (100%)                                                        | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.<br>2. <i>Lactobacillus acidipiscis</i>                   |
| 13 UN-S      | ปลาร้ารวม    | อุดร/บ้านดุง      | ปลาขาว/ห้วยหลวง                   | 3.75                                  | 7                                  | 1. <i>B. licheniformis</i> (50%)<br>2. <i>Stap.saprophyticus</i> (50%)                       | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp                                                           |
| 14UN-M       | ปลาร้ารวม    | อุดร/บ้านดุง      | ปลารวม/ แม่น้ำสงคราม              | 2.60                                  | 6                                  | 1. <i>B.amyloliquefaciens</i> (100%)                                                         | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.                                                          |
| 15UN-M       | ปลาร้ารวม    | อุดร/บ้านดุง      | ปลารวม/ แม่น้ำสงคราม              | 6.21                                  | 17                                 | 1. <i>B.amyloliquefaciens</i> (100%)                                                         | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.                                                          |

ตารางที่ 16 (ต่อ)

| รหัสตัวอย่าง | ลักษณะปลาร้า | พื้นที่ผลิต  | ปลา/แหล่งน้ำ  | เทคนิค cultural independent           |                                    |                                 | เทคนิค cultural independent                                  |
|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|              |              |              |               | จำนวน จุลินทรีย์ ชอบเกลือ (log CFU/g) | จำนวน Isolate (ระบบ Herisson disc) | ชนิดของไอโซเลท (%) <sup>*</sup> | ชนิดของจุลินทรีย์ (ลำดับตาม ความเข้มแถบ DNA) <sup>**</sup>   |
| 16UN-M       | ปลาร้ารวม    | อุดร/บ้านดุง | ปลารวม/นาข้าว | 7.16                                  | 25                                 | 1. <i>Bacillus</i> spp (100%)   | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp. |
| 17UN-M       | ปลาร้ารวม    | อุดร/บ้านดุง | ปลารวม/นาข้าว | 6.26                                  | 19                                 | 1. <i>Bacillus</i> spp (100%)   | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp. |

<sup>\*</sup>,<sup>\*\*</sup>รอฟลิโคราห์จากหน่วยงานร่วบวิโคราห์ 1, 2, 3 ชนิดจุลินทรีย์เรียงตามลำดับจำนวนประชากรที่พบ

ตารางที่ 17 รูปแบบของจุลินทรีย์ในระบบการหมักปลาร้าในพื้นที่จังหวัดสกลนครและนครพนม

| รหัสตัวอย่าง | ลักษณะปลาร้า      | พื้นที่ผลิต        | ปลา/แหล่งน้ำ                            | เทคนิค cultural independent           |                                    |                                                                                                                                                        | เทคนิค cultural independent                                                                       |
|--------------|-------------------|--------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
|              |                   |                    |                                         | จำนวน จุลินทรีย์ ชอบเกลือ (log CFU/g) | จำนวน isolate (ระบบ Herisson disc) | ชนิดของไอโซเลท (%)*                                                                                                                                    | ชนิดของจุลินทรีย์ (ลำดับตามความเข้มของแถบ DNA)**                                                  |
| 1SN-S        | ปลาร้าเกล็ด (ตัว) | นครพนม /ศรีสงคราม  | ปลาเกล็ดตัวใหญ่ /แม่น้ำสงคราม           | 4.24                                  | 5                                  | 1. <i>B. pumilus</i> (100%)                                                                                                                            | 1. <i>Halanaerobium</i> spp<br>2. <i>Tetragenococcus halophyllus</i>                              |
| 2SN-M        | ปลาร้ารวม         | นครพนม/ ศรีสงคราม  | ปลาเกล็ดตัวเล็ก หลายชนิด / แม่น้ำสงคราม | 4.68                                  | 7                                  | 1. <i>B. pumilus</i> (100%)                                                                                                                            | 1. <i>Halanaerobium</i> spp<br>2. <i>Tetragenococcus halophyllus</i>                              |
| 3SN-M        | ปลารวม            | สกลนคร/ อากาศอำนวย | ปลาหลากหลาย ชนิด/แม่น้ำสงคราม           | 3.54                                  | 3                                  | 1. <i>B. atrophaeus</i> (60%)<br>2. <i>B. subtilis</i> (60%)                                                                                           | 1. <i>Halanaerobium</i> spp<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp                                        |
| 4SN-M        | ปลารวม            | สกลนคร/ อากาศอำนวย | ปลาหลากหลาย ชนิด/แม่น้ำสงคราม           | 6.67                                  | 5                                  | 1. <i>B. atrophaeus</i> (60%)<br>2. <i>B. subtilis</i> (60%)                                                                                           | 1. <i>Halanaerobium</i> spp<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp<br>2. <i>Lactobacillus acidipiscis</i> |
| 5SN-M        | ปลาร้าแห้ง        | นครพนม/ ธาตุพนม    | แขยง/ แม่น้ำสงคราม                      | 3.60                                  | 5                                  | 1. <i>Tetragenococcus muriaticus</i> (25%)<br>2. <i>Lelliottia</i> sp. (25%)<br>3. <i>Halobacillus</i> sp. (25%)<br>4. <i>Oceanobacillus</i> sp. (25%) | 1. <i>Halanaerobium</i> spp<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp<br>2. <i>Lactobacillus</i> spp         |
| 6SN-M        | ปลาร้ารวม         | สกลนคร/ เมือง      | ปลาหลายชนิด/ เชื่อน้ำอูน                | 4.20                                  | 6                                  | 1. <i>B. subtilis</i> (70%)<br>2. <i>Lentibacillus</i> sp (30%)                                                                                        | 1. <i>Halanaerobium</i> spp<br>2. <i>Tetragenococcus halophyllus</i>                              |
| 7SN-M        | ปลาร้าแห้ง        | สกลนคร/ เมือง      | ปลาหลายชนิด/ เชื่อน้ำอูน                | 4.82                                  | 5                                  | 1. <i>B. subtilis</i> (50%)<br>2. <i>Tetragenococcus halophyllus</i> (50%)                                                                             | 1. <i>Halanaerobium</i> spp<br>2. <i>Tetragenococcus halophyllus</i>                              |
| 8SN-S        | ปลาร้าเกล็ด (ตัว) | นครพนม/ ธาตุพนม    | ปลาเกล็ดหลายชนิด /แม่น้ำโขง             | 5.60                                  | 11                                 | 1. <i>S. warneri</i> (100%)                                                                                                                            | 1. <i>Halanaerobium</i> spp<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp                                        |
| 9SN-M        | ปลาร้าแห้ง        | นครพนม/ ธาตุพนม    | ปลาแห้งหลายชนิด /แม่น้ำโขง              | 5.62                                  | 10                                 | 1. <i>Lelliottia</i> sp. (100%)                                                                                                                        | 1. <i>Halanaerobium</i> spp<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp                                        |

ตารางที่ 17 (ต่อ)

| รหัสตัวอย่าง | ลักษณะปลาร้า | พื้นที่ผลิต          | ปลา/แหล่งน้ำ                      | เทคนิค cultural independent           |                                    |                                                                                                    | เทคนิค cultural independent                                          |
|--------------|--------------|----------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
|              |              |                      |                                   | จำนวน จุลินทรีย์ ชอบเกลือ (log CFU/g) | จำนวน Isolate (ระบบ Herisson disc) | ชนิดของไอโซเลท (%)*                                                                                | ชนิดของจุลินทรีย์ (ลำดับตามความเข้มของแถบ DNA)**                     |
| 10SN-M       | ปลาร้าแห้ง   | สกลนคร/ อากาศอ่าวไทย | ปลาแห้งหลายชนิด / หนองน้ำธรรมชาติ | 5.23                                  | 11                                 | 1. <i>Halanaerobium</i> sp (50%)<br>2. <i>B. infantis</i> (50%)                                    | 1. <i>Halanaerobium</i> spp<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp           |
| 11SN-M       | ปลาร้าโหม่ง  | สกลนคร/ อากาศอ่าวไทย | ปลาแห้งหลายชนิด/ น้ำธรรมชาติ      | 4.23                                  | 15                                 | 1. <i>Bacillus</i> spp (50%)<br>2. <i>B. infantis</i> (50%)                                        | 1. <i>Halanaerobium</i> spp<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp           |
| 12SN-M       | ปลาร้ารวม    | สกลนคร/ สว่างแดนดิน  | ปลาขาวเป็นหลัก/ หนองน้ำธรรมชาติ   | 6.78                                  | 4                                  | 1. <i>Bacillus</i> sp. (100%)                                                                      | 1. <i>Halanaerobium</i> spp<br>2. <i>Tetragenococcus halophyllus</i> |
| 13SN-M-2M    | ปลาเกล็ด     | นครพนม/ ธาตุพนม      | ปลาตะเพียน/ แม่น้ำสงคราม          | 7.52                                  | 6                                  | 1. <i>S.nepalensis</i> (60%)<br>2. <i>Staphylococcus</i> sp (20%)<br>3. <i>S.epidermidis</i> (20%) | 1. <i>Halanaerobium</i> spp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp           |

\*,\*\* รวบรวมวิเคราะห์จากหน่วยงานรับวิเคราะห์ , 1, 2, 3 ชนิดจุลินทรีย์เรียงตามลำดับจำนวนประชากรที่พบ

ตารางที่ 18 รูปแบบของจุลินทรีย์ในระบบการหมักปลาร้าในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและชัยภูมิ

| รหัสตัวอย่าง | ลักษณะปลาร้า | พื้นที่ผลิต          | ปลา/แหล่งน้ำ                         | เทคนิค cultural independent         |                                    |                                                                                                                                                                    | เทคนิค cultural independent                            |
|--------------|--------------|----------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
|              |              |                      |                                      | จำนวนจุลินทรีย์ชอบเกลือ (log CFU/g) | จำนวน isolate (ระบบ Herisson disc) | ชนิดของไอโซเลท (%)*                                                                                                                                                | ชนิดของจุลินทรีย์ (ลำดับตามความเข้มของแถบ DNA)**       |
| 1NC-S        | ปลาร้าเดี่ยว | นครราชสีมา/พิมาย     | ปลากระดี่/แม่น้ำมูล                  | 9.47                                | 5                                  | 1. <i>B.atrophaeus</i> (50%)<br>2. <i>B. subtilis</i> (50%)                                                                                                        | 1. <i>Halanaerobium</i><br>2. <i>Lentibacillus</i> spp |
| 2NC-S        | ปลาร้าเดี่ยว | นครราชสีมา/พิมาย     | ปลาหมอ/แม่น้ำมูล                     | 8.26                                | 18                                 | 1. <i>B.atrophaeus</i> (50%)<br>2. <i>B. subtilis</i> (50%)                                                                                                        | 1. <i>Halanaerobium</i><br>2. <i>Lentibacillus</i> spp |
| 3NC-S        | ปลาร้าเดี่ยว | นครราชสีมา/พิมาย     | ปลาขาว หรือปลาแม่น้ำมูล              | 6.30                                | 3                                  | 1. <i>Staphylococcus</i> sp. (100%)                                                                                                                                | 1. <i>Halanaerobium</i><br>2. <i>Lentibacillus</i> spp |
| 4NC-M        | ปลาร้ารวม    | นครราชสีมา/ด่านขุนทด | ปลาสร้อย ปลาจวด/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ | 6.48                                | 3                                  | 1. <i>Lelliottia</i> sp (100%)                                                                                                                                     | 1. <i>Halanaerobium</i><br>2. <i>Lentibacillus</i> spp |
| 5NC-S        | ปลาร้าเดี่ยว | นครราชสีมา/ด่านขุนทด | ปลากระดี่/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์       | 7.40                                | 20                                 | 1. <i>S. arlettae</i> (40%)<br>2. <i>Bacillus</i> spp (20%)<br>3. <i>S. saprophyticus</i> (20%)<br>4. <i>S. carnosus</i> (20%)                                     | 1. <i>Halanaerobium</i><br>2. <i>Lentibacillus</i> spp |
| 6NC-S        | ปลาร้าเดี่ยว | นครราชสีมา/ด่านขุนทด | ปลาสร้อย/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์        | 9.62                                | 8                                  | 1. <i>S. nepalensis</i> (20%)<br>2. <i>S.pasteuri</i> (20%)<br>3. <i>S. epidermidis</i> (20%)<br>4. <i>Staphylococcus</i> sp. (20%)<br>5. <i>B. subtilis</i> (20%) | 1. <i>Halanaerobium</i><br>2. <i>Lentibacillus</i> spp |

ตารางที่ 18 (ต่อ)

| รหัสตัวอย่าง | ลักษณะปลาร้า | พื้นที่ผลิต         | ปลา/แหล่งน้ำ                      | เทคนิค cultural independent         |                               |                                                                                                        | เทคนิค cultural independent                                                          |
|--------------|--------------|---------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|              |              |                     |                                   | จำนวนจุลินทรีย์ชอบเกลือ (log CFU/g) | จำนวน isolate (หรือ Herisson) | ชนิดของไอโซเลท (%)*                                                                                    | ชนิดของจุลินทรีย์ (ลำดับตามความเข้มของแถบ DNA)**                                     |
| 7NC -S       | ปลาร้าเดี่ยว | นครราชสีมา/ปักธงชัย | ปลาสร้อย/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์     | 7.18                                | 5                             | 1. <i>T. halophilus</i> (60%)<br>2. <i>B. atrophaeus</i> (40%)                                         | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                            |
| 8NC -S       | ปลาร้าเดี่ยว | นครราชสีมา/ปักธงชัย | ปลาสร้อย/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์     | 7.70                                | 6                             | 1. <i>T. halophilus</i> (60%)<br>2. <i>Psychrobacter</i> sp. (20)<br>3. <i>Enterobacter</i> sp (20%)   | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                            |
| 9NC -S       | ปลาร้าเดี่ยว | นครราชสีมา/ปักธงชัย | ปลาสร้อย/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์     | 5.40                                | 10                            | 1. <i>Enterobacter</i> sp. (100%)                                                                      | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                            |
| 10NC-M       | ปลาร้ารวม    | จัสตุรัส/ชัยภูมิ    | ปลารวม/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์       | 6.85                                | 7                             | 1. <i>Bacillus</i> spp (33%)<br>2. <i>B. pumilus</i> sp. (33%)<br>3. <i>B. amyloliquefaciens</i> (33%) | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                            |
| 11NC-M       | ปลาร้ารวม    | จัสตุรัส/ชัยภูมิ    | ปลารวม/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์       | 5.76                                | 7                             | 1. <i>Kocuria</i> sp (50%)<br>2. <i>T. muriaticus</i> (50%)                                            | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                            |
| 11NC-M-6M    | ปลาร้ารวม    | จัสตุรัส/ชัยภูมิ    | ปลารวม/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์       | 6.2                                 | 5                             | 1. <i>B. atrophaeus</i> (50%)<br>2. <i>Lelliottia</i> sp. (50%)                                        | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp<br>3. <i>S. pasteurii</i>  |
| 12NC-M       | ปลาร้ารวม    | จัสตุรัส/ชัยภูมิ    | ปลารวม/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์       | 5.40                                | 10                            | 1. <i>B. amyloliquefaciens</i> (100%)                                                                  | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                            |
| 13NC-M-2M    | ปลาร้าเดี่ยว | นครราชสีมา/จักรราช  | ปลากระตี่/เขื่อนลำปาว (เกลือทะเล) | 7.40                                | 12                            | 1. <i>Bacillus</i> sp (50%)<br>2. <i>B. safensis</i> (50%)                                             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                            |
| 14NC-S-2M    | ปลาร้ารวม    | นครราชสีมา/จักรราช  | ปลารวม/เขื่อนลำปาว (เกลือทะเล)    | 7.40                                | 5                             | 1. <i>Bacillus</i> sp. (100%)                                                                          | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                            |
| 15NC-M-12M   | ปลาร้ารวม    | นครราชสีมา/สีคิ้ว   | ปลารวม/เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์       | 2.70                                | 5                             | 1. <i>Bacillus</i> sp. (100%)                                                                          | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp<br>3. <i>T. halophilus</i> |

\*,\*\*รวมผลวิเคราะห์จากหน่วยงานร่วบวิเคราะห์ 1, 2, 3 ชนิดจุลินทรีย์เรียงตามลำดับจำนวนประชากรที่พบ

ตารางที่ 19 รูปแบบของจุลินทรีย์ในระบบการหมักปลาร้าในพื้นที่อื่น ๆ

| รหัสตัวอย่าง | ลักษณะปลาร้า | พื้นที่ผลิต           | ปลา/แหล่งน้ำ              | เทคนิค cultural independent         |                               |                                                                                                                                                                        | เทคนิค cultural independent                                                                |
|--------------|--------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
|              |              |                       |                           | จำนวนจุลินทรีย์ชอบเกลือ (log CFU/g) | จำนวน isolate (ระบุ Herisson) | ชนิดของไอโซเลท (%)*                                                                                                                                                    | ชนิดของจุลินทรีย์ (ลำดับตามความเข้มแถบ DNA)**                                              |
| 1Ub-M        | ปลาร้ารวม    | อุบลราชธานี/แม่น้ำโขง | ปลารวม/ปลาในนาข้าว        | 5.81                                | 16                            | 1. <i>S. aureus</i> (50%)<br>2. <i>S. saprophyticus</i> (50%)                                                                                                          | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.<br>2. <i>Clostridium</i> spp. |
| 2Ub-M        | ปลาร้ารวม    | อุบลราชธานี/แม่น้ำโขง | ปลารวม/ปลาในนาข้าว        | 5.38                                | 24                            | 1. <i>Staphylococcus</i> sp. (50%)<br>2. <i>Bacillus</i> sp (50%)                                                                                                      | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.                               |
| 3Ub-M        | ปลาร้ารวม    | อุบลราชธานี/แม่น้ำโขง | ปลารวม/ปลาในนาข้าว        | 4.86                                | 40                            | 1. <i>Bacillus</i> sp. (26%)<br>2. <i>B. subtilis</i> (26%)<br>3. <i>B. amylolyticus</i> (26%)<br>4. <i>Lelliottia</i> sp. (10%)<br>4. <i>Staphylococcus</i> sp. (10%) | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.                               |
| 1L-M         | ปลาร้ารวม    | ลาว/เวียงจันทน์       | ปลารวม/แหล่งน้ำธรรมชาติ   | 7.91                                | 15                            | 1. <i>Halomonas alimentaria</i> (50%)<br>2. <i>Bacillus</i> sp (50%)                                                                                                   | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.                               |
| 2L-M         | ปลาร้ารวม    | ลาว/เวียงจันทน์       | ปลารวม/แหล่งน้ำธรรมชาติ   | 7.97                                | 20                            | 1. <i>B. atrophaeus</i> (33%)<br>2. <i>B. amyloliquefaciens</i> (33%)<br>3. <i>Bacillus</i> sp. (33%)                                                                  | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.                               |
| 3L-M         | ปลาร้ารวม    | ลาว/เวียงจันทน์       | ปลารวม/เขื่อนน้ำจันทน์    | 8.57                                | 25                            | 1. <i>Bacillus</i> sp. (33%)<br>2. <i>B. subtilis</i> (33%)<br>3. <i>B. amylolyticus</i> (33%)                                                                         | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.                               |
| 4L-M         | ปลาร้ารวม    | ลาว/เวียงจันทน์       | ปลารวม/จังหวัดสมุทรสงคราม | 6.32                                | 25                            | 1. <i>B. atrophaeus</i> (33%)<br>2. <i>B. amyloliquefaciens</i> (33%)<br>3. <i>Virgibacillus pantothenicus</i> (33%)                                                   | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.                               |
| 5L-M         | ปลาร้ารวม    | ลาว/เวียงจันทน์       | ปลารวม/แหล่งน้ำธรรมชาติ   | 8.79                                | 25                            | 1. <i>B. atrophaeus</i> (100%)                                                                                                                                         | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.                               |
| 6L-M-8M      | ปลาร้ารวม    | ลาว/เวียงจันทน์       | ปลารวม/เขื่อนน้ำจันทน์    | 4.66                                | 6                             | 2. <i>B. amyloliquefaciens</i> (50%)<br>3. <i>Staphylococcus</i> sp (50%)                                                                                              | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.                               |
| 6L-M-11M     | ปลาร้ารวม    | ลาว/เวียงจันทน์       | ปลารวม/เขื่อนน้ำจันทน์    | 5.40                                | 30                            | 1. <i>B. subtilis</i> (100%)                                                                                                                                           | 1. <i>Halanaerobium</i> spp.<br>1. <i>Lentibacillus</i> spp.                               |

จากผลการตรวจสอบชนิดจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างปลาร้าพบว่าจุลินทรีย์หลักที่คัดแยกได้มีความแตกต่างจากจุลินทรีย์หลักที่แสดงออกทางพันธุกรรมที่พบจากการวิเคราะห์ด้วย Reverse Transcriptase –PCR-DGGE โดยทั้งจุลินทรีย์หลัก (major) และจุลินทรีย์รอง (minor) ส่วนใหญ่ที่คัดแยกได้จัดอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* และ *Staphylococcus* ดังแสดงในตารางที่ 11 แต่จะพบ species ที่แตกต่างกันในปลาร้าจากแต่ละแหล่งผลิต จุลินทรีย์อื่น ๆ ที่คัดแยกได้เพิ่มเติม ได้แก่ *Tetragenococcus* และ *Lactobacillus* และจุลินทรีย์ที่สร้างสารสีแดงบางชนิด เช่น *Halomonas*, *Halobacter* และ *Salinococcus* เป็นต้น นอกจากนี้ในบางตัวอย่างยังพบจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทนเกลือและ *Bacillus cereus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสปอร์เมื่อสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญได้ ที่น่าสนใจคือการพบจุลินทรีย์ที่คัดแยกด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นไม่สอดคล้องกับการวิเคราะห์การแสดงออกทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ด้วย DGGE ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อน่าจะมีความสามารถในการเจริญหรือแสดงออกทางพันธุกรรมในภาวะการหมักดังกล่าวได้น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ที่พบด้วยเทคนิค DGGE ซึ่งได้แก่ *Halanaerobium* spp. และ *Lentibacillus* spp. แต่อย่างไรก็ตามการพบแถบ cDNA ของจุลินทรีย์เหล่านี้ในตัวอย่างของปลาร้าหลายตัวอย่างที่หมักเป็นระยะเวลานาน เช่น แถบ cDNA ของ *Bacillus* ในตัวอย่างปลาร้าในพื้นที่จังหวัดอุดรธานี *Lactobacillus* ที่พบในปลาร้าจากอุดรธานี/หนองคาย และสกลนคร/นครพนม *Tetragenococcus* ที่พบใน สกลนคร/นครพนม และนครราชสีมาที่หมักนานถึง 12 เดือน ซึ่งการพบการแสดงออกทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์เหล่านี้ในช่วงปลายของการหมักบ่งชี้ให้เห็นว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวน่าจะมียบทบาทหลักในการสร้างสารเมตาบอไลต์ที่ช่วยพัฒนากลิ่นรสให้มีความซับซ้อนที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพที่ดีของปลาร้าที่พบเฉพาะในปลาร้าที่หมักเป็นเวลานานนั่นเอง ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาคัดเลือกจุลินทรีย์ในการพัฒนาเป็นกล้าเชื้อหมักปลาร้าได้ ซึ่งจุลินทรีย์ที่พบสอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วย DDGE คือ *Tetragenococcus halophilus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่พบโดยทั่วไปในระบบนิเวศของการหมักปลาในภาวะที่มีเกลือสูง และ *Bacillus* spp. ซึ่งพบในช่วงปลายของการตรวจสอบด้วย DGGE และในส่วนของการคัดแยกนั้นเป็นจุลินทรีย์หลักที่คัดแยกได้จากปลาร้าตั้งแต่เริ่มต้นไปจนถึงช่วงสุดท้ายของการหมักนั้นแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถเจริญและแสดงออกทางพันธุกรรมและน่าจะมียบทบาทในการหมักปลาร้าที่มีนัยสำคัญ จึงเป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อหมักปลาร้าได้ แต่ต้องนำไปศึกษาคุณสมบัติการหมักและตรวจสอบความปลอดภัยในการนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อ ส่วน *Halanaerobium* spp. และ *Lentibacillus* spp. นั้นจากปลาร้า 100 กว่าตัวอย่างนั้นคัดแยกได้เพียงชนิดละ 1 ไอโซเลท ซึ่งบ่งชี้ว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวเพาะเลี้ยงได้ยากเนื่องจากมีคุณสมบัติเป็น cultural independent แต่จากผลการวิจัยนี้บ่งชี้ว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็น normal flora ที่มีอยู่ในระบบนิเวศของการหมักปลาร้าโดยธรรมชาติและทำหน้าที่เริ่ม กระบวนการหมักแบบ auto fermentation ดังนั้นหากออกแบบกระบวนการผลิตปลาร้าโดยการอาศัย



การทำงานของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิด auto fermentation ร่วมกับการเร่งกระบวนการหมักโดยใช้กล้าเชื้อที่ช่วยเร่งการสร้างกลิ่นรสและสีได้ เช่น เมื่อเริ่มกระบวนการผลิตปลาร้าปล่อยให้เกิด auto fermentation ในช่วง 0.5-2 เดือนแล้วจึงเติมกล้าเชื้อเพื่อช่วยเร่งกระบวนการหมักเพื่อให้สร้างกลิ่นรสที่ซับซ้อนและสีได้เร็วขึ้น น่าจะเป็นแนวทางที่มีศักยภาพแนวทางหนึ่ง

เมื่อสังเคราะห์ข้อมูลโดยการหาประเมินหาความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการหมักและแหล่งวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมักกับชนิดของจุลินทรีย์ที่พบ (ตารางที่ 20) ผลการวิจัยบ่งชี้ได้ว่าจุลินทรีย์โอซิเลทหลัก ได้แก่ *Bacillus* sp. พบได้ทั่วไปในปลาร้าที่ผลิตทุกพื้นที่ แต่โอซิเลทที่คัดแยกได้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันมากทั้งในเรื่องของการทนเกลือ มีความแตกต่างกันตั้งแต่ร้อยละ 5 ไปจนถึงสายพันธุ์ที่สามารถทนเกลือสูงถึงร้อยละ 20 คุณสมบัติในการย่อยโปรตีนของจุลินทรีย์ในกลุ่มมีความแตกต่างกันในช่วงที่กว้างมาก อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์หลักที่พบในตัวอย่างปลาร้าจากพื้นที่จังหวัดอุดรธานี/หนองคาย และ สกลนคร/นครพนม รวมถึงจังหวัดอุบลราชธานีและลาว ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Bacillus atrophaeus* และ *Bacillus amylolyticus* โดยจุลินทรีย์ดังกล่าวพบน้อยในปลาร้าจากพื้นที่นครราชสีมา/ชัยภูมิ ซึ่งจะพบเฉพาะในตัวอย่างที่หมักนานกว่า 4 เดือนขึ้นไป ทั้งนี้อาจเกิดจากการหมักปลาร้าในนครราชสีมา/ชัยภูมิใช้เวลาสั้นปลาร้าที่เก็บเกี่ยวยังอยู่ในช่วงต้นของการหมักส่งผลให้ *Bacillus* ในกลุ่มดังกล่าวยังไม่สามารถเจริญและดำเนินกิจกรรมการหมักได้ ดังนั้นจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. การพบ *Staphylococcus* ซึ่งจะพบในพื้นที่จังหวัดอุดรธานี/หนองคาย และนครราชสีมา/ชัยภูมิ โดยเฉพาะ *Staphylococcus carnosus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีรายงานการพบโดยทั่วไปในอาหารหมักโปรตีนที่มีเกลือ ซึ่งการพบจุลินทรีย์ดังกล่าวในระบบการหมักปลาร้าของทั้ง 2 พื้นที่บ่งชี้ได้ว่า *Staphylococcus carnosus* น่าจะมีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับในการหมักปลาร้า เมื่อพิจารณาถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างปลาร้าที่มีเกลือสูงในพื้นที่ของจังหวัดสกลนครและนครพนม จะพบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีความหลากหลายต่ำกว่าพื้นที่อื่น ๆ และส่วนใหญ่จุลินทรีย์ที่พบเพิ่มเติมเป็นจุลินทรีย์ชนิดทนเกลือสูงกว่าจุลินทรีย์ที่พบโดยทั่วไปในแหล่งอื่น เช่น *Halobacillus* sp.

นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้รวมถึงพบเมื่อตรวจสอบด้วย DGGE โดยพบว่าปลาร้าที่ผลิตจากการใช้ปลาหมักเกลือทะเลก่อนเป็นวัตถุดิบจะพบแบคทีเรียชนิด *Tetragenococcus muriaticus* หรือ *Tetragenococcus halophilus* ในทุกตัวอย่างซึ่งเมื่อผู้วิจัยเปรียบเทียบกับการศึกษาจุลินทรีย์ในระบบการหมักปลาร้าของภาคกลางที่ใช้เกลือทะเลในการหมักจะพบจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้ในตัวอย่างการหมักปลาร้าเช่นกัน (ไม่แสดงผลการทดลอง) นอกจากนี้ในตัวอย่างปลาร้าที่พบ *Halobacillus* sp. เป็นปลาร้าที่ใช้เกลือทะเลในการหมัก และเมื่อคัดแยกจุลินทรีย์จากเกลือทะเลก็พบจุลินทรีย์ดังกล่าว (ตารางที่ 21) ในเกลือทะเลตัวอย่างที่ใช้ในการหมักปลาร้าที่พบ *Tetragenococcus* นั้นไม่สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ดังกล่าวได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็นแบคทีเรียกรดแลกติกซึ่งการคัดแยกจากตัวอย่างเกลือต้องคัดแยกโดยใช้ระบบ

selective media อย่างไรก็ตามผลการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่า เกลือทะเลน่าจะเป็นแหล่งของ *Tetragelococcus* ซึ่งมีรายงานกล่าวว่าจุลินทรีย์ชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักโปรตีนที่มีเกลือสูง ได้แก่ น้ำปลา กะปิ มิโซ และซีอิ๊ว รวมถึงปลาร้า (Tanasupawat et al., 2002)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ตรวจสอบองค์ประกอบของเกลือที่ใช้ในการผลิตปลาร้า (ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในภาคผนวก? ) เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบเกลือ ได้แก่ เกลือสินเธาว์จากอำเภอบ้านดุง เกลือสินเธาว์จากอำเภอท่าเสา และเกลือทะเลจากสมุทรสงคราม พบว่า เกลือทะเลจะมีปริมาณสาร potassium (K) สูงกว่าเกลือสินเธาว์ประมาณ 5-40 เท่า (ผลการวิเคราะห์เกลือ ดังแสดงในภาคผนวก ง) ซึ่ง potassium อาจเป็น key mineral ที่จำเป็นกับการเจริญของ *Tetragelococcus* มีรายงานว่า selective condition สำหรับ Tetra มักจะมี potassium เป็น supplement อย่างหนึ่ง (Satomi et al., 1997) ซึ่งจะต้องมีการศึกษาต่อไป ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้เป็นปัจจัยหนึ่งในการพิจารณาปรับปรุงกระบวนการหมักของปลาร้าโดยเติมแร่ธาตุที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อในกระบวนการหมักได้

นอกจากนี้ผลการตรวจสอบเกลียยังพบข้อมูลที่น่าสนใจเพิ่มเติมคือเกลียยังอาจเป็นแหล่งของ *Bacillus* ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักปลาร้า โดยพบว่าเกลือทะเลมี *Bacillus* spp. เป็นไอโซเลทหลัก และในเกลือสินเธาว์จากบ้านดุงที่ใช้ในการหมักปลาร้าในพื้นที่หลักของอุดรธานี/หนองคาย พบ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus atrophaeus* เป็นจุลินทรีย์หลัก นอกจากนี้ยังพบจุลินทรีย์ที่สร้างรงควัตถุสีแดง ได้แก่ *Salinicoccus* sp. ซึ่งอาจเป็นจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารสีแดงในปลาร้า หรืออาจสามารถพัฒนาเป็นกล่าเชื้อเพื่อเร่งการสร้างสารสีในปลาร้าได้ ส่วนรำหรือรำคั่วที่ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตปลาร้าไม่สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ด้วยวิธีที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อในการวิจัยนี้ได้ (คัดแยกโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือร้อยละ 5) ซึ่งบ่งชี้ว่า รำน่าจะไม่ใช่แหล่งของจุลินทรีย์ชอบเกลือหรือจุลินทรีย์ทนเกลือที่มีบทบาทในกระบวนการหมักปลาร้าได้

ส่วนจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารที่คัดแยกได้ คือ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ทนสภาวะ Aw ต่ำหรือทนเกลือได้ดี จึงสามารถเจริญเพิ่มจำนวนในระบบการหมักปลาร้าได้

**ตารางที่ 20** จุลินทรีย์ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตจากพื้นที่ต่าง ๆ และความหลากหลายของสมบัติทนเกลือและการย่อยโปรตีน (ตามลำดับจำนวนที่คัดแยกได้)

| Main isolate (แหล่งที่พบเป็นส่วนใหญ่)                                                                                                      | Salt tolerance (%) | Protease activity |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------|
| 1. <i>Bacillus</i> sp. (ทุกพื้นที่)                                                                                                        | 5-20*              | 0.001-0.245*      |
| 2. <i>Bacillus atrophaeus</i> (อุดรฯ/หนองคาย สกลนคร/นครพนม ลาว อุบลฯ นครราชสีมาพบเฉพาะพื้นที่ที่หมักนานเกิน 4 เดือน)                       | 10-20              | 0.060-0.120       |
| 3. <i>Bacillus subtilis</i> (อุดรฯ/หนองคาย สกลนคร/นครพนม ลาว อุบลฯ นครราชสีมาพบเฉพาะพื้นที่ที่หมักนานเกิน 4 เดือน)                         | 10-20              | 0.000-0.080       |
| 4. <i>Bacillus amylolyticus</i> (นครราชสีมา/ชัยภูมิ ลาว อุบลฯ อุดรฯ/หนองคาย)                                                               | 10-20              | 0.070-0.190       |
| 5. <i>Bacillus pumilus</i> (อุดรฯ/หนองคาย สกลนคร/นครพนม)                                                                                   | 10-15              | 0.020-0.120       |
| 6. <i>Staphylococcus</i> sp. (อุดรฯ/หนองคาย ลาว อุบลฯ)                                                                                     | 5-20               | 0.010-0.180       |
| 7. <i>Tetragenococcus halophilus</i> (นครราชสีมา ตัวอย่างปลาร้าที่ใช้ปลาหมักเกลือทะเลเป็นวัตถุดิบ)                                         | 20                 | 0.010-0.020       |
| 8. <i>Tetragenococcus muriaticus</i> (นครราชสีมา อำเภอดุพนม ตัวอย่างปลาร้าที่ใช้ปลาหมักเกลือทะเลเป็นวัตถุดิบ)                              | 20                 | 0.000-0.090       |
| 10. <i>Staphylococcus arlettae</i> (นครราชสีมา/ชัยภูมิ)                                                                                    | 5-20               | 0.000-0.060       |
| 11. <i>Staphylococcus carnosus</i> (นครราชสีมา/ชัยภูมิ อุดรฯ/หนองคาย)                                                                      | 15                 | 0.060-0.070       |
| 12. <i>Staphylococcus pasteurii</i> , <i>S. nepalensis</i> (สกลนคร/นครพนม)                                                                 | 20                 | 0.074             |
| 13. <i>Halomonas</i> sp./ <i>H. alimentaria</i> / <i>H. campaniensis</i> (นครราชสีมา ลาว ตัวอย่างปลาร้าที่ใช้ปลาหมักเกลือทะเลเป็นวัตถุดิบ) | 20                 | 0.060             |
| 14. <i>Halobacillus</i> sp. (นครพนม ตัวอย่างปลาร้าที่ใช้ปลาหมักเกลือทะเลเป็นวัตถุดิบ)                                                      | 20                 | 0.200             |
| 15. <i>Lentibacillus</i> sp. (นครพนม)                                                                                                      | 20                 | 0.094             |
| 16. <i>Halanaerobium</i> sp (สกลนคร)                                                                                                       | ND                 | ND                |
| Food pathogenic strains                                                                                                                    | Salt tolerance (%) | Protease activity |
| 1. <i>Staphylococcus aureus</i>                                                                                                            | 20                 | 0.005             |
| 2. <i>Bacillus cereus</i>                                                                                                                  | 20                 | 0.014             |

\*ค่าตัวเลขแสดงเป็นช่วง ตามค่าสูงสุดต่ำสุดของกิจกรรมของไอโซเลทแต่ละสายพันธุ์ที่คัดแยกในกลุ่ม

ตารางที่ 21 จุลินทรีย์ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างเกลือและรำที่ใช้เป็นส่วนผสมของปลาร้าในแต่ละพื้นที่

| ตัวอย่าง                                                                                             | จุลินทรีย์ไอโซเลท                                                                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. รำ<br>ใช้ในการผสมปลาร้าในจังหวัดอุดรธานี                                                          | ไม่พบจุลินทรีย์ชอบเกลือ                                                                                                                  |
| 2. รำคั่ว<br>ใช้ในการผสมปลาร้าในจังหวัดนครราชสีมา                                                    | ไม่พบจุลินทรีย์ชอบเกลือ                                                                                                                  |
| 3. เกลือทะเล<br>ใช้ในการหมักปลาร้าในจังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ                                        | 1. <i>Bacillus</i> sp.<br>2. <i>Halobacillus yeomjeoni</i>                                                                               |
| 4. เกลือสินเธาว์ (บ้านดุง)<br>ใช้ในการหมักปลาร้าในพื้นที่จังหวัดอุดรธานี<br>หนองคาย และสกลนครบางส่วน | 1. <i>Bacillus subtilis</i><br>2. <i>Bacillus atrophaeus</i><br>3. <i>Salinicoccus</i> sp/ <i>S. hispanicus</i> / <i>S. alkaliphilus</i> |

สรุปรูปแบบการหมักและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักปลาร้าและแนวทางการพัฒนากล้าเชื้อ

จากข้อมูลจากการศึกษารูปแบบจุลินทรีย์ที่พบสามารถใช้เป็นเกณฑ์การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อและแนวทางการใช้กล้าเชื้อสำหรับเร่งกระบวนการหมัก โดยพบว่า *Halanaerobium* spp และ *Lentibacillus* spp. เป็นจุลินทรีย์ที่เป็นจุลินทรีย์ท้องถิ่นในระบบการหมักปลาร้า โดยเฉพาะ *Halanaerobium* spp เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะปราศจากออกซิเจนที่จะเพิ่มจำนวนเองได้เองในระหว่างการหมักปลาร้าตั้งแต่เริ่มต้นกระบวนการหมักซึ่งเป็นการทำให้เกิดกระบวนการหมักแบบ auto fermentation ดังนั้นในกระบวนการพัฒนาการวิธีการใช้กล้าเชื้อจะเติมกล้าเชื้อในปลาร้าที่ผ่านการหมักอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ถึง 2 เดือน เพื่อให้ *Halanaerobium* spp. และ *Lentibacillus* spp. เพิ่มจำนวนและเริ่มย่อยสลายเนื้อปลาก่อน จากนั้นจึงเติมกล้าเชื้อที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่พบเป็นหลักในแต่ละพื้นที่ โดยเฉพาะกลุ่ม *Bacillus* โดยจะคัดเลือก species ตามที่พบเป็นไอโซเลทหลักในแต่ละพื้นที่ผลิตเพื่อช่วยในการหมักปลา โดยจะผลิตในรูปของกล้าเชื้อผสม ร่วมกับจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารให้สีแดงและกลิ่นรส เช่น *Salinococcus* หรือ *Halomonas* และ *Tetragenococcus halophilus* ที่คัดแยกได้จากแต่ละพื้นที่ ซึ่งเกณฑ์การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่จะพัฒนาเป็นกล้าเชื้อ คือ ต้องผ่านการทดสอบความปลอดภัยเพาะเลี้ยงได้ง่าย และมีความเสถียร

## 2.3 การพัฒนากล้าเชื้อพร้อมใช้สำหรับเร่งกระบวนการหมักปลาร้า

### 2.3.1 การคัดเลือกเชื้อสำหรับพัฒนาเป็นกล้าเชื้อ

จากข้อมูลที่ศึกษาข้างต้นนั้น กระบวนการผลิตปลาร้าจากพื้นที่หลักที่ศึกษามีความแตกต่างกัน ซึ่งแยกตามกระบวนการผลิตในแต่ละพื้นที่ได้ เป็น 3 รูปแบบ คือ การหมักแบบแห้ง (SSF) ทั่วไป การหมักแบบแห้งเกลือสูง และการหมักแบบเติมน้ำ (SMF) ซึ่งจากกระบวนการผลิตดังกล่าวทำให้ปลาร้าที่มีสมบัติที่เป็น อัตลักษณ์ คือ

1) สมบัติทางเคมีฟิสิกส์ มีความแตกต่างกันที่ชัดเจนที่สุดคือ ปริมาณเกลือ (ความเค็ม) ความชื้น และไฟเบอร์ (ปริมาณรำที่ใช้) (ตารางที่ 22)

2) คุณภาพด้านกลิ่น เมื่อตรวจสอบโดยการตรวจวัดชนิดและปริมาณสารระเหยพบว่า ปลาร้าที่มีคุณภาพดีทุกรูปแบบการผลิตคือปลาร้าที่มีกลิ่นหอมจากสารเมตาบอไลต์ในกลุ่มของกรด butanoic และอนุพันธ์ของกรด Butanoic acid, ethyl ester และ Butanoic acid, 3-methyl- ยกเว้นปลาร้าที่ผลิตแบบ SSF แบบเกลือสูง ส่วนใหญ่จะมีปริมาณ Disulfide, dimethyl ในสัดส่วนที่มากกว่าการผลิตรูปแบบอื่น ซึ่งทั้งนี้ น่าจะเกิดจากปลาร้าในพื้นที่นี้ใช้เวลาในการหมักนานกว่า 1 ถึง 2 ปีทำให้สาร disulfide ซึ่งเกิดจากจุลินทรีย์หลักที่ดำเนินการหมักในระบบสร้างสะสมไว้ในปริมาณสูงกว่าปลาร้าที่ผลิตจากรูปแบบอื่น ๆ จึงทำให้ปลาร้านี้มีกลิ่นฉุนของซัลเฟอร์และน้ำปลาร้ามีสีดำอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่อีก 2 พื้นที่จะมีปริมาณสาร Disulfide, dimethyl เป็นสารที่มีสัดส่วนน้อยกว่ากลุ่ม กรด butanoic และอนุพันธ์ของกรด

ตารางที่ 22 สมบัติที่บ่งชี้ลักษณะของปลาร้าที่ผลิตในแต่ละพื้นที่

| พื้นที่            | กระบวนการผลิต | ระยะเวลาหมัก<br>(เดือน) | ค่าที่บ่งชี้สมบัติ<br>ทางเคมีฟิสิกส์<br>(%) | สารระเหย<br>หลัก (กลิ่น)<br>ภาพรวม                 | ลักษณะ<br>ปรากฏ |
|--------------------|---------------|-------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------|
| อุดรธานี-หนองคาย   | SSF ทัวไป     | 6-12                    | ความชื้น: 65<br>เกลือ: 25<br>ไฟเบอร์: 5     | butanoic<br>และอนุพันธ์,<br>Disulfide,<br>dimethyl | เนื้อปลาสีแดง   |
| นครราชสีมา-ชัยภูมิ | SMF           | 3-6                     | ความชื้น: 65<br>เกลือ: 22<br>ไฟเบอร์: 12    |                                                    |                 |
| สกลนคร-นครพนม      | SSF เกลือสูง  | 8-24                    | ความชื้น: 61<br>เกลือ: 32<br>ไฟเบอร์: 4     | Disulfide,<br>dimethyl,<br>butanoic<br>และอนุพันธ์ |                 |

3) ลักษณะปรากฏของปลาร้าทุกพื้นที่ ปลาร้าที่มีคุณภาพดีจะต้องมีเนื้อและน้ำปลาร้าควรมีสีแดง โดยสีของน้ำปลาร้าที่หมักแบบ SMF จะมีสีดำเข้มเกิดจากสีของรำข้าวเป็นหลัก ส่วนการหมักแบบ SSF เกลือสูงจะให้น้ำปลาร้าที่มีสีดำ เนื่องจากการหมักเป็นเวลานานสีดำเกิดจากการมีสารกลุ่ม sulfide สูง

จากข้อมูลที่สรุปได้ จึงนำมาใช้ประกอบการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อพัฒนาเป็นก้ำเชื้อและออกแบบกระบวนการหมักโดยใช้ก้ำเชื้อ ดังต่อไปนี้

ในการออกแบบกระบวนการหมักแบบใช้ก้ำเชื้อ โดยอาศัยข้อมูลจากการศึกษาการแสดงออกทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ในชุมชนการหมักปลาร้า และออกแบบกระบวนการหมักโดยการหมักด้วยก้ำเชื้อให้แสดงกิจกรรมร่วมกับจุลินทรีย์ที่เป็น predominant ในระบบการหมัก ได้เป็นแบบการหมัก 2 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

#### 1. ขั้นตอนการหมักแบบ auto-fermentation

โดยการเตรียมปลาร้าตามรูปแบบที่ผลิต ปล่อยให้เกิดกระบวนการหมักแบบ auto-fermentation ด้วย *Halanaerobium* spp. และ *Lentibacillus* spp. เป็นระยะเวลาหนึ่งเพื่อให้ย่อยโปรตีนเป็นกรดอะมิโนที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นใช้ในการเจริญต่อไปได้ และเพื่อให้สร้างสารกลุ่ม sulfide ดังนี้

- 1) การหมักแบบ SSF แบบทั่วไป ปล่อยให้เกิดกระบวนการหมักแบบ auto-fermentation เป็นเวลา 1-2 เดือน
- 2) การหมักแบบ SSF แบบเกลือสูง ปล่อยให้เกิดกระบวนการหมักแบบ auto-fermentation เป็นเวลา 2-3 เดือน
- 3) การหมักแบบ SMF ในกรณีใช้ปลาหมักเกลือมาแล้วเป็นวัตถุดิบ เดิมกล้าเชื้อพร้อมกับการเติมน้ำเพื่อเริ่มการหมักได้ ในกรณีใช้ปลาในพื้นที่และหมักเกลือเองหลังเติมน้ำปล่อยให้เกิดกระบวนการหมักแบบ auto-fermentation เป็นเวลา 2 สัปดาห์

## 2. ขั้นตอนการหมักโดยการเติมกล้าเชื้อ

หลังกระบวนการหมักแบบ auto-fermentation เติมกล้าเชื้อเพื่อช่วยเร่งปฏิบัติการหมักใน 3 ด้าน คือ เร่งการย่อยโปรตีน เร่งการสร้างกลิ่น และเร่งการสร้างสี

ดังนั้นในการพัฒนากล้าเชื้อสำหรับหมักปลาร้าเพื่อเร่งกระบวนการหมักนั้น มีหลักเกณฑ์ในการคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์เพื่อให้ทำหน้าที่ในกระบวนการเร่งการหมักปลาร้าให้ 3 ประการ ได้แก่

- 1) จุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่เร่งการย่อยโปรตีน โดยคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* เนื่องจากเป็น จุลินทรีย์หลักที่มีจำนวนมากที่สุดและพบในทุกพื้นที่ ผลการวิจัยบ่งชี้ว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวน่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนในปลาร้า (เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่มี protease activity สูงที่สุดกว่าจุลินทรีย์ที่พบในระบบทั้งหมด) โดยสายพันธุ์ที่พบมากคือ *B. subtilis* และ *B. atrophaeus* ซึ่งหลังจากนำไอโซเลทของจุลินทรีย์กลุ่มนี้มาศึกษาคุณสมบัติพบว่า *B. subtilis* มีความแปรผันในเรื่องของ protease activity เมื่อเทียบกับ *B. atrophaeus* สามารถบ่งชี้ได้ว่าการย่อยโปรตีนของ *B. atrophaeus* มีลักษณะทาง genotype มากกว่า phenotype ซึ่งหากเลือกไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อย่อมมีคุณสมบัติไม่ผันแปรตามสิ่งแวดล้อม ทำให้แสดงกิจกรรมในสภาวะการหมักที่ผันแปรในช่วงกว้างมากกว่า และจากการตรวจสอบเบื้องต้นพบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวสร้างสารให้กลิ่นคล้ายปลาร้าที่เป็นกลิ่นเค็ม (salty) และกลิ่นปลาเค็ม (anchovy-like) นอกจากนั้นในเรื่องของการนำไปใช้ในการเป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็น industrial microorganisms จัดเป็น GRAS ตามประกาศของ efsa ยุโรป และเป็นจุลินทรีย์ใน Biosafety level 1 จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ในอนาคต จากการทดสอบคุณสมบัติของจุลินทรีย์ชนิดนี้พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการสร้างสารให้กลิ่นรสของปลาร้าซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการสร้างสารให้กลิ่นรสที่ให้ความซับซ้อนและให้อัตลักษณ์กับปลาร้า จึงคัดเลือก *B. atrophaeus* จากพื้นที่ละไอโซเลทสำหรับเป็นกล้าเชื้อแบบ autochthonous strains สำหรับใช้อย่างจำเพาะกับปลาร้าที่หมักในแต่ละพื้นที่การผลิต

- 2) จุลินทรีย์ที่ทำหน้าสร้างสารระเหยกลุ่มหลัก โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ *Tetragenococcus* โดยจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ที่พบในระบบ คือ *T. halophilus* และ *T. muriaticus* เนื่องจากมีข้อมูลจากการวิจัยที่ชัดเจนว่า จุลินทรีย์ชนิดนี้จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนกรดอะมิโนให้เป็นสารในกลุ่มที่เป็นอนุพันธ์ของ butanoic acid ในการหมักปลาสถานะเกลือสูง ซึ่งเป็นสารกลุ่มที่ทำให้เกิดกลิ่นหมักที่สำคัญของปลาแองโชวีและน้ำปลา ซึ่งตรงกับสารกลุ่มหลักให้อัตลักษณ์ด้านกลิ่นรสในปลาร้า ในงานวิจัยนี้คัดเลือก *T. halophilus* สำหรับนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่สร้างสารระเหยกลุ่มหลัก และเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร มีความปลอดภัย
- 3) จุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่สร้างสีแดงในเนื้อปลา โดยการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สร้างรงควัตถุสีแดงที่สามารถสร้างสารสีที่แรงให้เนื้อปลามีสีแดงเพิ่มจากการการทำงานของ *Lentibacillus* ในระหว่างขั้นตอน auto-fermentation โดยในงานวิจัยนี้คัดเลือกจุลินทรีย์ *S. hispanicus* จากกลุ่มจุลินทรีย์ที่สร้างรงควัตถุสีแดง ชนิด Xanthophyll ซึ่งเป็นสารสีแดงในกลุ่ม carotenoids มีความเสถียรในการสร้างสารสีในสภาวะการหมักในช่วงกว้าง เจริญได้ดี เพาะเลี้ยงง่าย

จากการคัดเลือกจุลินทรีย์ตามเกณฑ์ที่ตั้งไว้ ได้จุลินทรีย์ที่เป็น candidate ทั้งสิ้น 30 ไอโซเลท จึงนำมาทดสอบการส่งเสริมและการต้านการเจริญในการพัฒนาเป็นกล้าเชื้อผสม (ผลการทดลองแสดงในภาคผนวก ง) ผลการคัดเลือกได้จุลินทรีย์สำหรับนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อจำเพาะสำหรับเร่งกระบวนการหมักทั้ง 3 รูปแบบ ดังแสดงในตารางที่ 23

ตารางที่ 23 จุลินทรีย์ไอโซเลทสำหรับพัฒนาเป็นกล้าเชื้อเร่งหมักปลาร้า

| รูปแบบการผลิต   | กล้าเชื้อออโตโคโนส<br>(autochthonous starter) | กล้าเชื้อเร่งกลิ่นและสี<br>Common starters |
|-----------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------|
| SSF แบบทั่วไป   | <i>Bacillus atrophaeus</i> UD6-2              | <i>Tetragenococcus halophilus</i> NCFE-2   |
| SSF แบบเกลือสูง | <i>Bacillus atrophaeus</i> NC58-2             | <i>Salinicoccus hispanicus</i> UDBD82-1    |
| SMF             | <i>Bacillus atrophaeus</i> SN78-1             |                                            |

การยืนยันสายพันธุ์ด้วยการทดสอบสมบัติทางชีวเคมี ด้วยระบบ ViTeK ผลการทดสอบความปลอดภัย และคุณสมบัติพิเศษในเรื่องของการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคชนิด *Staphylococcus aureus* (รายละเอียดผลการทดสอบแสดงในภาคผนวก ง)



### การทดสอบความปลอดภัยของจุลินทรีย์

ผลการตรวจสอบความปลอดภัยของจุลินทรีย์ไอโซเลทสำหรับพัฒนาเป็นกล้าเชื้อเร่งหมักปลาร้า ในเรื่องของความใกล้ชิดกับสายพันธุ์ก่อโรค โดยทดสอบการทำลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis) การสร้างสารก่อภูมิแพ้โดยการตรวจสอบการมี Biogenic amine gene JV16/JV17, HD3/HD4 และ TD2/TD5 ในการสร้างสาร Histamine, Putrescine และ Tyramine และทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ โดยการทดสอบการทำลายเซลล์ไลน์ชนิด CaCo2 ดังแสดงในตารางที่ 24 พบว่าจุลินทรีย์ทุกไอโซเลทไม่มีความใกล้ชิดกับสายพันธุ์ก่อโรค ไม่มี gene สร้างสารก่อภูมิแพ้ และไม่เป็นพิษกับเซลล์ (ภาคผนวก ง)

### การทดสอบสมบัติพิเศษ

เนื่องจากจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีโอกาสที่จะเจริญในระบบการหมักปลาร้าและเป็นจุลินทรีย์ชนิดที่ถูกกำหนดว่าห้ามพบในปลาร้า 25 กรัม ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ คือ *Staphylococcus aureus* ดังนั้น *B. atrophaeus* ทั้งสามไอโซเลทจึงถูกคัดเลือกโดยเพิ่มเกณฑ์การมีคุณสมบัติที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ดังแสดงในตารางที่ 24

**ตารางที่ 24** การทดสอบความปลอดภัยและสมบัติพิเศษของจุลินทรีย์โอโซเลทสำหรับพัฒนาเป็นกล้าเชื้อเร่งหมักปลา  
ร้า (แสดงผลรายละเอียดการวิเคราะห์ในภาคผนวก ง)

| Isolates                      | Hemolysis      | Biogenic amine producing gene |        |         | การรอดชีวิตของเซลล์ CaCo2 (%) | การต้าน <i>S. aureas</i> |
|-------------------------------|----------------|-------------------------------|--------|---------|-------------------------------|--------------------------|
|                               |                | JV16/JV17                     | HD3/H4 | TD2/TD5 |                               |                          |
| <i>B.atrophaeus</i> UD6-2     | non-heamolytic | -                             | -      | -       | >95*                          | +++                      |
| <i>B.atrophaeus</i> NC58-2    | non-heamolytic | -                             | -      | -       | >95                           | ++                       |
| <i>B.atrophaeus</i> .SN78-1   | non-heamolytic | -                             | -      | -       | >95                           | ++                       |
| <i>T.halophilus</i> NCFF-2    | non-heamolytic | -                             | -      | -       | >95                           | ND                       |
| <i>S. hispanicus</i> UDBD82-1 | non-heamolytic | -                             | -      | -       | >95<br>>95                    | ND                       |

การรอดชีวิตของเซลล์ CaCo2 > 95% บ่งชี้ได้ว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

ND = ไม่ทดสอบ

### 2.3.2 การประเมินสภาวะในการผลิตกล้าเชื้อแห้งพร้อมใช้

ประเมินวิธีการผลิตกล้าเชื้อพร้อมใช้ แบบ active dried ในรูปแบบของ “กล้าเชื้อร้าแห้ง” ผลการทดลองในแต่ละส่วนมีดังต่อไปนี้

#### 2.3.2.1 ประเมินสภาวะในการเตรียมเซลล์แบคทีเรีย

ประเมินรูปแบบการเตรียมกล้าเชื้อให้สามารถดำเนินการหมักปลาภายใต้ภาวะการหมักที่มีเกลือสูง โดยใช้เทคนิคการฝึกฝนให้เซลล์พร้อมเจริญสภาวะการหมักปลา (strain optimization) เพื่อเตรียมเซลล์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกสำหรับการพัฒนาเป็นกล้าเชื้อสำหรับแต่ละกระบวนการเซลล์กล้าเชื้อที่เตรียมจากสภาวะที่เหมาะสม จะนำไปผสมกับร้าเพื่อเตรียมเป็นกล้าเชื้อร้าแห้ง ในข้อ 3.2

การประเมินสภาวะในการเตรียมเซลล์จุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด ประกอบด้วย

- การประเมินสภาวะในการเพาะเลี้ยง
  - โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น  $10^6$  CFU/ml ในอาหาร 1% peptone water ที่มีเกลือ 5 % แปรการให้อากาศแบบ orbital shaking ที่ 0, 60 และ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าทุกไอโซเลทเจริญได้ดีโดยการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไม่ให้อากาศ โดยเจริญได้สูงถึง  $10^9$ - $10^{10}$  CFU/ml โดย *T. halophilus* จะเจริญได้จำนวนเซลล์สูงสุดที่สภาวะดังกล่าว (ตารางที่ 25)
- ความสามารถในการฝึกฝนให้เจริญในสภาวะที่มีเกลือสูง
  - โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสภาวะเกลือสูงขึ้นพร้อมกับสร้างความคุ้นเคยกับสารอาหารในปลาร้า ในสภาวะอาหารสูตร A, B และ C เป็นลำดับ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้สามารถเจริญในสภาวะเกลือสูงได้ดี จะต้องฝึกฝนเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เซลล์สามารถเจริญได้เร็วที่สุดในสภาวะเกลือเข้มข้น 5% สูตร A เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือสูงขึ้นพร้อมกับมีสารอาหารจากปลาร้า เพื่อสร้างความคุ้นเคยกับการใช้สารอาหารที่มีในปลาร้าในสูตร B ซึ่งเชื้อจะใช้เวลาในการเจริญเพื่อให้มีจำนวน  $10^8$ - $10^9$  CFU/ml ในเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ยกเว้น *T. halophilus* ที่ซึ่งใช้เวลา 24-48 ชั่วโมง (ซึ่งเป็นเชื้อที่ต้องใช้เวลาในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ (lag phase) นาน แต่จะมีอัตราการเจริญที่เร็วกว่าหลังจากปรับตัวได้) และเพาะเลี้ยงขั้นตอนสุดท้ายในอาหารสูตร C เพื่อให้ได้เซลล์ถึง  $10^8$ - $10^9$  CFU/ml ในเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 25 )

ซึ่งสภาวะที่ประเมินได้ดังกล่าวเป็นสภาวะที่ใช้ในการเตรียมเซลล์สำหรับนำไปใช้ในการผลิตเป็นก๊อแล็ก่อนร่าแห้งพร้อมใช้ เนื่องจากเซลล์ที่ถูกเตรียมจากสภาวะดังกล่าวสามารถปรับตัวและเจริญในสภาวะการหมักปลาร้าจริงที่ซึ่งมีเกลือเข้มข้นถึง 22-30 % ได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านการฝึกฝน สรุปผลสภาวะที่เหมาะสมดังแสดงในตารางที่ 25 (ไม่แสดงผลข้อมูลจากทุกสภาวะที่ประเมิน)

ตารางที่ 25 สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเซลล์ของไอโซเลท (สภาวะที่เซลล์เจริญได้สูงสุด)

| Isolates                    | สภาวะการเพาะเลี้ยง   |                                  | การฝึกฝนในอาหารสูตรตามลำดับ* |                   |             |                   |             |                   |
|-----------------------------|----------------------|----------------------------------|------------------------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------|-------------------|
|                             | ให้อากาศ*<br>/ 24 hr | จำนวนเซลล์<br>สูงสุด<br>(CFU/ml) | A                            |                   | B           |                   | C           |                   |
|                             |                      |                                  | 0rpm/<br>hr                  | (CFU/ml)          | 0rpm/<br>hr | (CFU/ml)          | 0rpm/<br>hr | (CFU/ml)          |
| <i>B.atrophaeus</i> UD6-2   | 0 rpm                | $9.6 \times 10^9$                | 24                           | $9.0 \times 10^9$ | 24          | $7.8 \times 10^8$ | 48          | $7.4 \times 10^8$ |
| <i>B.atrophaeus</i> NC58-2  | 0 rpm                | $7.2 \times 10^9$                | 24                           | $8.2 \times 10^9$ | 24          | $8.5 \times 10^8$ | 48          | $6.8 \times 10^8$ |
| <i>B.atrophaeus</i> .SN78-1 | 0 rpm                | $7.6 \times 10^9$                | 24                           | $8.8 \times 10^9$ | 24          | $9.8 \times 10^8$ | 48          | $8.2 \times 10^8$ |
| <i>T.halophilus</i> NCFF-2  | 0 rpm                | $4.2 \times 10^{10}$             | 24                           | $9.2 \times 10^9$ | 24-48       | $6.2 \times 10^9$ | 48          | $9.2 \times 10^8$ |
| <i>S. Hispanic</i> UDBD81-2 | 0 rpm                | $5.6 \times 10^9$                | 24                           | $7.8 \times 10^9$ | 24          | $6.2 \times 10^9$ | 48          | $9.2 \times 10^8$ |

\*เพาะเลี้ยงในอาหารจำนวนเซลล์เริ่มต้น  $10^{10}$  CFU/ml

อาหารสูตร A B และ C แสดงรายละเอียดในภาคผนวก จ และรายละเอียดดังกล่าวได้ระบุเป็นข้อถือสิทธิในร่างสิทธิบัตรที่กำลังดำเนินการยื่นขอจดผ่าน สกว เรื่อง “กล้ำเชื้อปลาสำหรับเร่งอัตราการหมักและกระบวนการผลิต” เพื่อปกป้องสิทธิทางปัญญาให้กับผู้รับถ่ายทอดเทคโนโลยี

#### 2.3.2.2 ประเมินปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมรำและการอบแห้ง

ในการเตรียมรำเพื่อใช้เป็น matrix สำหรับกักเก็บและปกป้องเซลล์จุลินทรีย์ระหว่างทำแห้งและเก็บรักษา โดยได้ออกแบบการขึ้นรูปให้เป็นรำแห้งรูปแบบต่าง ๆ เพื่อสร้างรูปลักษณะของกล้ำเชื้อให้เป็นเอกลักษณ์ในแต่ละรูปแบบเพื่อให้ง่ายต่อการจดจำ ได้แก่ การเตรียมรำ (รำสด และ รำคั่ว) อัตราส่วนรำและน้ำสำหรับขึ้นรูปก้อนรำ (5:6, 5:10) รูปแบบและขนาด/ปริมาณรูปก้อนรำ (ก้อนกลม ก้อนแบนและผง) การเติมสารปกป้องเซลล์ (เติม และไม่เติม glycerol) อุณหภูมิและเวลา (single step ที่ 40, 60 และแบบ 2 step (ขั้นแรก 70°C ,30 นาที ขั้นที่ 2 60°C, 2 ชั่วโมง) พบสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมรำแต่ละรูปแบบดังสรุปในตารางที่ 26

ตารางที่ 26 สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมกล้าเชื้อรื้ออบแห้ง

| รูปแบบกล้าเชื้อแห้ง   | ชนิดรำ | อัตราส่วน<br>รำ:กล้าเชื้อ<br>(กรัม/มิลลิลิตร) | สภาวะใน<br>การอบแห้ง<br>ที่เหมาะสม<br>(ชั่วโมง) | สารปกป้อง<br>เซลล์ | *อัตราการรอด<br>ชีวิตของกล้า<br>เชื้อ (%*) |
|-----------------------|--------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------|
| 1. กล้าเชื้อรำก้อนกลม | รำคั่ว | 5: 6                                          | 2 step                                          | no                 | >90                                        |
| 2. กล้าเชื้อรำก้อนแบน | รำคั่ว | 5: 6                                          | 2 step                                          | no                 | >90                                        |
| 3. กล้าเชื้อรำผง      | รำคั่ว | 5: 6                                          | 2 step                                          | no                 | >95                                        |

\*เฉลี่ยจากการประเมินผลจากจุลินทรีย์ทุกชนิด \*\*ตรวจวัดจำนวนเซลล์หลังการทำแห้งแล้วเสร็จทันที

จากสภาวะการเตรียมกล้าเชื้อที่ประเมินพบว่า การเตรียมกล้าเชื้อแต่ละรูปแบบสามารถเตรียมได้ด้วยสภาวะที่ใกล้เคียงกัน โดยการเตรียมในรูปของกล้าเชื้อผงมีแนวโน้มว่ามีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตใกล้เคียงกับจำนวนเซลล์เริ่มต้นมากที่สุด โดยเซลล์กล้าเชื้อจุลินทรีย์มีอัตราการรอดสูงกว่าร้อยละ 90 แต่พบว่ากล้าเชื้อก้อนที่เตรียมได้จากรำสดนั้นจะแตกหักง่ายกว่ากล้าเชื้อที่เตรียมจากรำคั่ว ดังนั้นจึงเลือกสภาวะในการเตรียมกล้าเชื้อจากรำคั่วสำหรับนำไปใช้ในการผลิตกล้าเชื้อทั้งสามรูปแบบ และการใช้รำคั่วซึ่งในขั้นตอนการคั่วรำจะส่งผลดีในเรื่องของการลดอัตราการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในรำได้อีกทางหนึ่ง

### 2.3.2.3 การประเมินอายุการเก็บกล้าเชื้อก้อนรำ

กล้าเชื้อปลาร้าที่ผลิตได้บรรจุในซองอลูมิเนียมฟลอยด์ ขนาด 4 x 6 นิ้ว ปริมาณกล้าเชื้อ 5 กรัม (ที่ค่า  $a_w < 0.6$ ) ที่ซึ่งมีปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตประมาณ  $10^7$  CFU/g ใส่ซองบรรจุสารดูดออกซิเจน (oxygen absorber) ขนาดซองละ 30 ซีซี จำนวน 1 ซอง ปิดผนึกและเก็บที่อุณหภูมิห้อง การประเมินอายุการเก็บของกล้าเชื้อปลาร้า โดยการตรวจสอบคุณภาพด้านจุลินทรีย์ และแอคติวิตีของกล้าเชื้อในการเจริญในอาหารและการเจริญในปลาร้า เป็นระยะเวลา 6 เดือน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 27 พบว่ากล้าเชื้อก้อนรำมีคุณภาพสม่ำเสมอตลอดการประเมินในช่วง 6 เดือน โดยพบว่ากล้าเชื้อแห้งที่เก็บตลอด 6 เดือนมีการปนเปื้อนของรา ต่ำกว่า 100 CFU/g ซึ่งถือได้ว่าผ่านเกณฑ์มาตรฐานอาหารแห้ง เมื่อติดตามจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (TPC) มีจำนวนอยู่ในช่วงประมาณ  $10^6$ - $10^7$  CFU/g ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจำนวนจุลินทรีย์กล้าเชื้อที่ผ่านการอบแห้งนั้นยังมี viability ที่ระหว่างการเก็บในเวลา 6

เดือนและหากเก็บต่อในบรรจุภัณฑ์ที่ป้องกันความชื้นและการถ่ายเทออกซิเจนประกอบกับการใช้ oxygen absorber ที่คำนวณให้สามารถควบคุมปริมาณออกซิเจนได้นานกว่า 6 เดือน จึงทำให้กล้าเชื้อสามารถคงคุณภาพได้นานถึง 6 เดือนหรือมากกว่า และเมื่อพิจารณาการแสดงกิจกรรมในอาหารมาตรฐาน คือการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 3 ในอาหารมาตรฐาน 1% peptone ร่วมกับ 10% NaCl พบว่าในระบบอาหารดังกล่าวจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด จะเจริญได้อย่างไม่สมดุล กล่าวคือ หากจุลินทรีย์ชนิดใดสามารถเจริญได้ดีเมื่ออยู่ในอาหารที่มีสภาวะที่สมบูรณ์และ/หรือไม่มีสภาวะเครียดแก่เซลล์ของจุลินทรีย์ เช่น *T. halophilus* ซึ่งสามารถเจริญได้ดีกว่าจุลินทรีย์อีก 2 ชนิดในระบบ ทำให้จุลินทรีย์ดังกล่าวเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นไป ทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนเพื่อดำเนินกิจกรรมการหมักในระบบได้ สามารถบ่งชี้ได้ว่ากล้าเชื้อปลาร้าที่ผลิตโดยใช้จุลินทรีย์แบบผสมของทั้งสามชนิดที่พัฒนาขึ้นมาในงานวิจัยนี้ ควรใช้ผสมในระบบการหมักโดยตรงโดยไม่จำเป็นต้องทำการ enrich กล้าเชื้อที่ใช้ทั่วไปซึ่งอาจทำให้เกิดการเสียสมดุลของแอคติวิตีของจุลินทรีย์รูปแบบผสมได้ และเมื่อทดสอบแอคติวิตีในการเจริญในน้ำปลาร้าของจุลินทรีย์กล้าเชื้อทั้ง 3 ชนิด พบว่าจุลินทรีย์ทั้งสามชนิดสามารถเจริญเพิ่มจำนวนจนถึง  $>10^8$  CFU/ml ซึ่งเป็นจำนวนที่บ่งชี้ได้ว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวเริ่ม dominate ระบบจนสามารถเริ่มแสดงแอคติวิตีการหมักได้ภายใน 5 วันในน้ำปลาร้า นอกจากนี้ข้อมูลแอคติวิตีของจุลินทรีย์ในน้ำปลาร้าที่พบสามารถนำไปเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในระบบการผลิตปลาร้าระดับอุตสาหกรรมในเรื่องของการขยายกล้าเชื้อสำหรับการขยายขนาดถึงหมักปลาร้าได้ ซึ่งสามารถทำการขยายกล้าเชื้อโดยการเติมกล้าเชื้อในน้ำปลาร้าตามสัดส่วนที่กำหนดและทิ้งให้เจริญในน้ำปลาร้าเป็นเวลา 5-7 วัน จะสามารถใช้น้ำปลาร้าสำหรับเป็นกล้าเชื้อการหมักใน scale ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นตามลำดับได้

โดยสรุปกล้าเชื้อที่ผลิตในการวิจัยนี้มีอายุการเก็บได้อย่างน้อย 6 เดือน และมีแนวโน้มที่จะคงคุณภาพได้ถึง 1 ปี และการใช้กล้าเชื้อควรเติมลงในกระบวนการหมักปลาร้าโดยตรง โดยจุลินทรีย์ในกล้าเชื้อจะปรับตัวและเพิ่มจำนวนในปลาร้าและแสดงกิจกรรมการหมักในวันที่ 2 หลังการเติมกล้าเชื้อ และไม่ควรรนำกล้าเชื้อไปเพิ่มจำนวนในอาหารอุดมก่อน เพื่อป้องกันการเพิ่มจำนวนของ *T. halophilus* ไม่ให้มีจำนวนมากกว่าจุลินทรีย์ในกล้าเชื้ออีก 2 ชนิด

ตารางที่ 27 อายุการเก็บคุณภาพและแอคติวิตีของกล้าเชื้อ

| อายุ<br>การ<br>เก็บ<br>(เดือน) | TPC<br>(cfu/g)       | Yeast/<br>Mold<br>(cfu/g) | การติดตามแอคติวิตีของจุลินทรีย์ |                      |                      |                      |                      |                                               |                      |                      |                      |
|--------------------------------|----------------------|---------------------------|---------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                                |                      |                           | วัน<br>ที่                      | การเจริญในปลาร้า     |                      |                      |                      | การเจริญในอาหารมาตรฐาน<br>1%peptone + 10%NaCl |                      |                      |                      |
|                                |                      |                           |                                 | FF2<br>(cfu/ml)      | 82-1<br>(cfu/ml)     | 6-2<br>(cfu/ml)      | TPC<br>(cfu/ml)      | FF2<br>(cfu/ml)                               | 82-1<br>(cfu/ml)     | 6-2<br>(cfu/ml)      | TPC<br>(cfu/ml)      |
| 1                              | 5.7x10 <sup>7</sup>  | < 10                      | 0                               | 1X10 <sup>6</sup>    | 1.0X10 <sup>6</sup>  | <300                 | 1.0 X10 <sup>6</sup> | 2.2X10 <sup>9</sup>                           | <300                 | <300                 | 2.2X10 <sup>9</sup>  |
|                                |                      |                           | 2                               | 1X10 <sup>7</sup>    | 1.0X10 <sup>7</sup>  | 1.0X10 <sup>7</sup>  | 1.0 X10 <sup>7</sup> | 3.3X10 <sup>9</sup>                           | 1.0 X10 <sup>7</sup> | 1.0 X10 <sup>7</sup> | 3.3X10 <sup>9</sup>  |
|                                |                      |                           | 3                               | 2.0X10 <sup>7</sup>  | 2.0X10 <sup>7</sup>  | 1.0X10 <sup>7</sup>  | 2.0 X10 <sup>7</sup> | 3.0X10 <sup>9</sup>                           | 1.0 X10 <sup>8</sup> | 1.0 X10 <sup>8</sup> | 3.3X10 <sup>9</sup>  |
|                                |                      |                           | 4                               | 1X10 <sup>7</sup>    | 1.0X10 <sup>7</sup>  | 1.0X10 <sup>7</sup>  | 2.0 X10 <sup>7</sup> | 5.2X10 <sup>9</sup>                           | 1.0 X10 <sup>8</sup> | 1.0 X10 <sup>8</sup> | 5.2X10 <sup>9</sup>  |
|                                |                      |                           | 5                               | >1.0X10 <sup>8</sup> | >1.0X10 <sup>8</sup> | 1.0 X10 <sup>6</sup> | >1.0x10 <sup>8</sup> | >1.0X10 <sup>8</sup>                          | >1.0X10 <sup>8</sup> | 1.0 X10 <sup>6</sup> | >1.0x10 <sup>8</sup> |
| 2                              | 6.0 x10 <sup>7</sup> | < 10                      | 0                               | 1.9X10 <sup>6</sup>  | <300                 | <300                 | 1.9X10 <sup>6</sup>  | 2.2X10 <sup>6</sup>                           | <300                 | <300                 | 2.2X10 <sup>6</sup>  |
|                                |                      |                           | 2                               | 1.2X10 <sup>6</sup>  | <300                 | 5.9X10 <sup>6</sup>  | 7.1X10 <sup>6</sup>  | 3.2X10 <sup>7</sup>                           | <300                 | 3.2X10 <sup>6</sup>  | 3.8X10 <sup>7</sup>  |
|                                |                      |                           | 4                               | >1.0X10 <sup>8</sup> | >1.0X10 <sup>8</sup> | 1.0 X10 <sup>6</sup> | >1.0x10 <sup>8</sup> | 6.6X10 <sup>8</sup>                           | >1.0X10 <sup>8</sup> | 1.7X10 <sup>8</sup>  | 6.9X10 <sup>9</sup>  |
|                                |                      |                           | 5                               | >1.0X10 <sup>8</sup> | >1.0X10 <sup>8</sup> | 2.8 X10 <sup>7</sup> | >1.0x10 <sup>8</sup> | 5.0X10 <sup>9</sup>                           | >1.0X10 <sup>8</sup> | 5.9X10 <sup>8</sup>  | 5.0X10 <sup>9</sup>  |
| 3                              | 8.0 x10 <sup>7</sup> | < 10                      | 0                               | 3.8X10 <sup>6</sup>  | <300                 | 3.8X10 <sup>6</sup>  | 3.8X10 <sup>6</sup>  | 3.0X10 <sup>6</sup>                           | <300                 | <300                 | 3.0X10 <sup>6</sup>  |
|                                |                      |                           | 2                               | 4.8X10 <sup>7</sup>  | <300                 | 4.8X10 <sup>6</sup>  | 4.8X10 <sup>7</sup>  | 8.9X10 <sup>8</sup>                           | 2.2X10 <sup>6</sup>  | 1.2X10 <sup>6</sup>  | 8.9X10 <sup>8</sup>  |
|                                |                      |                           | 5                               | >1.0X10 <sup>8</sup> | >1.0X10 <sup>8</sup> | 2.8 X10 <sup>7</sup> | >1.0x10 <sup>8</sup> | 1.4X10 <sup>9</sup>                           | >1.0X10 <sup>8</sup> | >1.0X10 <sup>8</sup> | 1.4X10 <sup>9</sup>  |
| 4                              | 6.0 x10 <sup>7</sup> | < 100                     | 0                               | 1.9X10 <sup>6</sup>  | <300                 | <300                 | 1.9X10 <sup>6</sup>  | 2.2X10 <sup>6</sup>                           | <300                 | <300                 | 2.2X10 <sup>6</sup>  |
|                                |                      |                           | 2                               | 2.8X10 <sup>6</sup>  | <300                 | <300                 | 2.8X10 <sup>6</sup>  | 1.2X10 <sup>6</sup>                           | 1.0X10 <sup>6</sup>  | 1.0X10 <sup>6</sup>  | 1.2X10 <sup>6</sup>  |
|                                |                      |                           | 5                               | >1.0X10 <sup>8</sup> | >1.0X10 <sup>8</sup> | 1.0 X10 <sup>8</sup> | >1.0x10 <sup>8</sup> | 6.9X10 <sup>9</sup>                           | >1.0X10 <sup>8</sup> | 1.7X10 <sup>8</sup>  | 6.9X10 <sup>9</sup>  |
| 5                              | 7.0 x10 <sup>7</sup> | < 10                      | 0                               | 2.3X10 <sup>6</sup>  | <300                 | 1.0X10 <sup>6</sup>  | 2.3X10 <sup>6</sup>  | 3.2X10 <sup>6</sup>                           | <300                 | <300                 | 3.0X10 <sup>6</sup>  |
|                                |                      |                           | 2                               | 4.2X10 <sup>7</sup>  | <300                 | 4.5X10 <sup>6</sup>  | 4.2X10 <sup>7</sup>  | 2.9X10 <sup>8</sup>                           | 1.0X10 <sup>6</sup>  | 1.0X10 <sup>6</sup>  | 2.9X10 <sup>8</sup>  |
|                                |                      |                           | 5                               | >1.0X10 <sup>8</sup> | >1.0X10 <sup>8</sup> | 2.3 X10 <sup>7</sup> | >1.0x10 <sup>8</sup> | 1.7X10 <sup>9</sup>                           | >1.0X10 <sup>8</sup> | 1.2X10 <sup>8</sup>  | 1.7X10 <sup>9</sup>  |
| 6                              | 6.0 x10 <sup>7</sup> | < 100                     | 0                               | 1.0X10 <sup>6</sup>  | <300                 | <300                 | 1.0X10 <sup>6</sup>  | 1.1X10 <sup>6</sup>                           | <300                 | <300                 | 1.1X10 <sup>6</sup>  |
|                                |                      |                           | 2                               | 2.5X10 <sup>6</sup>  | <300                 | <300                 | 2.5X10 <sup>6</sup>  | 1.4X10 <sup>6</sup>                           | 1.0X10 <sup>6</sup>  | >1.0X10 <sup>6</sup> | 1.4X10 <sup>6</sup>  |
|                                |                      |                           | 5                               | >1.0X10 <sup>8</sup> | >1.0X10 <sup>8</sup> | 1.0 X10 <sup>8</sup> | >1.0x10 <sup>8</sup> | 3.4X10 <sup>9</sup>                           | >1.0X10 <sup>8</sup> | 1.7X10 <sup>8</sup>  | 3.4X10 <sup>9</sup>  |

## 2.4 ทดสอบคุณสมบัติการหมักและคุณภาพของกล้าเชื้อในปลาร้าทั้ง 3 ชนิด

ทดสอบคุณสมบัติการหมักปลาร้าตามวิธีที่ผลิตของแต่ละพื้นที่ พื้นที่ละ 1 ตัวอย่าง ได้แก่

### 1. การหมักแบบ SSF แบบทั่วไป

ทดสอบกับการผลิตปลาร้าของ”กลุ่มวิสาหกิจชุมชนปลาร้าท่าตูม”อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี กระบวนการผลิต ปลานิลแม่น้ำโขง (ขนาด 4 ตัวต่อกิโลกรัม) จำนวน 100 กิโลกรัม เติมเกลือสินเธาว์บ้านดุง 3 ส่วน ร้า 1 ส่วน หมักในโอ่งมังกร ปล่อยให้เกิด auto-fermentation เป็นเวลา 1.5 เดือน จึงเติมกล้าเชื้อ

### 2. การหมักแบบ SMF

เลือกทดสอบกับการผลิตปลาร้าของวิสาหกิจรายย่อย “มิตรปลาร้าเงิน” อำเภอปักธงชัยจังหวัดนครราชสีมา ปลาสวายและปลาขาวจากเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ หมักเกลือทะเล 100 กิโลกรัมให้ปลาพองเป็นเวลา 15 วัน จึงเติมน้ำเท่าตัวพร้อมกับเติมน้ำพร้อมกล้าเชื้อ

### 3. การหมักแบบ SSF แบบเกลือสูง

ทดสอบกับการผลิตปลาร้าของวิสาหกิจรายย่อยผลิตปลาร้าสำหรับทำน้ำปลาร้าส้มตำ อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร กระบวนการผลิต ปลาขาวเล็กหลายชนิด (ปลาขาว ปลาตะเพียน เป็นต้น) จากแม่น้ำสงคราม จำนวน 50 กิโลกรัม เติมเกลือสินเธาว์บ้านท่าสะอาด สว่างแดนดิน หมักในถังพลาสติก ปล่อยให้เกิด auto-fermentation เป็นเวลา 2.5 เดือน จึงเติมกล้าเชื้อ

หลังการหมักแบบ auto-fermentation ตามเวลาที่ระบุของการทดสอบการหมักของแต่ละรูปแบบแล้ว จึงเติมกล้าเชื้อปลาร้าสำหรับหมักแต่ละแบบ ด้วยกล้าเชื้อจำเพาะขนาด 5 กรัม จำนวนก้อน 8.5 ก้อน เพื่อให้มีจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น  $10^6$  CFU/g แบ่งปลาร้าเพื่อติดตามกระบวนการหมักในถังหมัก ระดับ 2 และ 10 กิโลกรัม ขนาดละ 2 ขั้ว (ยกเว้นการหมักระดับถัง 100 ติดตามผลแบบเชิงคุณภาพโดยการสัมภาษณ์ผู้ประกอบการเจ้าผู้ร่วมทดสอบ) ติดตามและตรวจสอบสมบัติและเอกลักษณ์ของปลาร้า ทุก 2 สัปดาห์ โดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค cultural plating และ RevT-PCR-DGGE protease activity ลักษณะปรากฏ กลิ่น จนกว่าปลาร้าจะมีลักษณะใกล้เคียงกับปลาร้าที่ผลิตด้วยวิธีดั้งเดิม ปลาร้าหลังการหมักนำไปตรวจสอบคุณภาพด้านจุลินทรีย์ สมบัติทางเคมีฟิสิกส์ สารระเหย และทดสอบทางประสาทสัมผัสในรูปแบบของการปรุงเป็นอาหารที่นิยมในแต่ละพื้นที่



#### 2.4.1. รูปแบบการหมักและการเปลี่ยนแปลงปลาร้าในระหว่างการหมักแบบ SSF แบบทั่วไป หลังเติมกล้าเชื้อ

ในการหมักปลาร้าแบบ SSF แบบทั่วไป ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 28 พบว่าในระหว่างการหมักที่ไม่เติมกล้าเชื้อจำนวนจุลินทรีย์ที่มีในระบบหลังจากทิ้งให้เกิด auto-fermentation เป็นเวลา 1.5 เดือนพบว่ามีจำนวนเพียง 7.32 log CFU/g หลังจากนั้นลดลงตลอดในระหว่างการหมักต่ออีก 8 สัปดาห์ และเมื่อตรวจสอบกิจกรรมการหมักโปรตีนพบว่าค่า protease activity ที่ตรวจสอบมีค่าเฉลี่ยคงที่ที่ ประมาณ 0.03 ในขณะที่ปลาร้าที่เติมกล้าเชื้อในการหมักระดับ 2 และ 10 กรัม พบว่าหลังเติมกล้าเชื้อจะมีจุลินทรีย์ในระบบเพิ่มขึ้นถึงประมาณ 8 log CFU/g และมีจำนวนคงที่ในสัปดาห์ที่ 2 และเริ่มลดลงประมาณ 1 log CFU/g ในสัปดาห์ที่ 4 เมื่อตรวจสอบ protease activity พบว่าหลังเติมกล้าเชื้อค่าดังกล่าวจะมีค่าเพิ่มขึ้นและคงที่อยู่ในระบบเป็นประมาณ 0.04 ตลอด 4 สัปดาห์และลดลงเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่ากล้าเชื้อที่เติมลงไปสามารถเพิ่มกิจกรรมการหมักโปรตีนในการหมักปลาร้าได้ตั้งแต่ช่วง 2 สัปดาห์แรกของการหมัก และเอนไซม์ที่สร้างขึ้นจะยังคงเอนกวิธีในการดำเนินกิจกรรมการหมักตลอดการหมักในและเมื่อโปรตีนถูกเร่งย่อยให้เป็นกรดอะมิโนได้เร็วขึ้นจุลินทรีย์ก็จะเร่งการสร้างสารระเหยและ หรือสารสีในระบบปลาร้าได้เร็วขึ้น ดังจะเห็นได้ว่าปลาร้าที่หมักโดยการเติมกล้าเชื้อจะเริ่มมีเนื้อสีแดงและกลิ่นหอมของสารระเหยที่ชัดเจนกว่าปลาร้าที่ไม่เติมกล้าเชื้อได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 หลังการเติมกล้าเชื้อ ภาพที่ 28 และกลิ่นหอมของสารระเหยจะเพิ่มมากขึ้นและมีกลิ่นใกล้เคียงกับที่หมักแบบดั้งเดิมในสัปดาห์ที่ 8 หลังเติมกล้าเชื้อ ในขณะที่ปลาร้าไม่เติมกล้าเชื้อพบว่าปลายังมีกลิ่นคาวของปลาอย่างชัดเจน เนื้อปลามีสีซีดและคล้ำมากขึ้นตามลำดับ เมื่อตรวจสอบชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ในระบบ (ตารางที่ 29) พบว่าจุลินทรีย์ที่มีจำนวนมากที่สุด คือ *Tetragenococcus halophilus* ส่วน *Bacillus* และ *Salinococcus* พบในสัดส่วนรองลงมาตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อปลาแล้วพบว่าสีแดงเพิ่มมากกว่าปลาร้าไม่เติมกล้าเชื้ออย่างเห็นได้ชัด ซึ่งบ่งชี้ว่าจุลินทรีย์ *Salinococcus* สามารถสร้างสารสีในเนื้อปลาได้ดี จึงเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวจะเจริญเพิ่มจำนวนในเนื้อปลามากกว่าที่จะลอยอย่างอิสระในน้ำปลาร้า จึงทำให้เมื่อตรวจสอบโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะพบจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดในจำนวนน้อยกว่า *Tetranococucus* ซึ่งน่าจะแขวนลอยเป็นเซลล์อิสระในน้ำปลาร้าจึงตรวจพบเมื่อเพาะเลี้ยงโดยการเกลี่ยตัวอย่างปลาร้าบนอาหารวุ้นแข็งได้ดีกว่า ทั้งนี้เมื่อตรวจสอบการแสดงออกทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ในระบบการหมักทั้งหมดด้วยระบบ Rev.-T-PCR-DGGE การตรวจสอบสารระเหย และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบรูปแบบของจุลินทรีย์ที่พบและการเปลี่ยนแปลงของปลาร้าในระหว่างการหมักที่ขนาดการหมักแตกต่างกันกล่าวคือพบแถบ DNA ของแบคทีเรียที่ใช้เป็นกล้าเชื้อเพิ่มเติมในระบบและพบว่าเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าหากควบคุมปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้มีความสม่ำเสมอกล้าเชื้อ ดังกล่าวมีศักยภาพที่จะพัฒนาใช้ในกระบวนการหมักที่มีขนาดใหญ่ได้ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้นำกล้าเชื้อไปทดลองผลิตจริงกับผู้ประกอบการที่ผลิตโดยการหมักขนาด 100 กิโลกรัม พบว่าปลาร้าที่เติมกล้าเชื้อที่หมักในระยะเวลาเดียวกันจะได้ปลาร้าที่มีคุณภาพ(ที่ผู้ประกอบการยอมรับ)เหมือนกัน (แสดงในภาคผนวก ณ กิจกรรมถ่ายทอดเทคโนโลยี)

ตารางที่ 28 ผลจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและ protease activity ในระหว่างกระบวนการหมักปลาร้า

| วันที่<br>ตรวจสอบ<br>ตัวอย่างหลัง<br>เติมน้ำเชื้อ<br>(สัปดาห์) | ปลาร้าควบคุม       |                   | ปลาร้าเติมน้ำเชื้อ<br>หมักขนาด 2 กิโลกรัม |                      | ปลาร้าเติมน้ำเชื้อ<br>หมักขนาด 10 กิโลกรัม |                   |
|----------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------------|-------------------|
|                                                                | TPC<br>(log CFU/g) | Protease activity | TPC<br>(log CFU/g)                        | Protease<br>activity | TPC<br>(log CFU/g)                         | Protease activity |
| 0                                                              | 7.32±0.21          | 0.035±0.0 02      | 8.74±0.35                                 | 0.041±0.006          | 8.74±0.35                                  | 0.041±0.006       |
| 2                                                              | 6.98±0.57          | 0.033±0.021       | 8.58±0.21                                 | 0.044±0.004          | 8.35±0.22                                  | 0.044±0.003       |
| 4                                                              | 4.70±0.32          | 0.037±0.021       | 7.36±0.70                                 | 0.046±0.010          | 7.39±0.32                                  | 0.046±0.004       |
| 8                                                              | 5.10±0.22          | 0.027±0. 002      | 6.07±0.02                                 | 0.030±0.003          | 6.35±0.24                                  | 0.035±0.002       |



a



b



c

ภาพที่ 27 ลักษณะปรากฏของปลาร้าหมักแบบ SSF แบบทั่วไป (a) ปลาร้าหมักแบบดั้งเดิม (ไม่เติมน้ำเชื้อหมัก 1 ปี)  
(b) ปลาร้าหมักแบบเติมน้ำเชื้อ 2 เดือน และ (c) ปลาร้าหมักแบบไม่เติมน้ำเชื้อ 2 เดือน

ตารางที่ 29 การเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณจุลินทรีย์และการแสดงออกทางพันธุกรรม ในระหว่างกระบวนการหมักปลาร้า แบบ SSF แบบทั่วไป

| วันที่<br>ตรวจสอบ<br>ตัวอย่างหลัง<br>เติมกล้าเชื้อ<br>(สัปดาห์) | ปลาร้าควบคุม              |      |      |      |                  |                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------|------|------|------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                 | จำนวนประชากร (log CFU/ml) |      |      |      |                  | แถบ cDNA<br>ตามลำดับความ<br>เข้มข้น                                                                                           |
|                                                                 | TPC                       | FF2  | 82-1 | 6-2  | จุลินทรีย์อื่น ๆ |                                                                                                                               |
| 0                                                               | 8.32                      | 0    | 0    | 0    | 8.32             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                                                                     |
| 2                                                               | 6.98                      | 0    | 0    | 0    | 6.98             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                                                                     |
| 4                                                               | 4.70                      | 0    | 0    | 0    | 4.70             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                                                                     |
| 8                                                               | 5.10                      | 0    | 0    | 0    | 5.10             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                                                                     |
| ปลาร้าเติมกล้าเชื้อหมักขนาด 2 กิโลกรัม                          |                           |      |      |      |                  |                                                                                                                               |
| 0                                                               | 8.73                      | 7.1  | 4.30 | 6.17 | 6.78             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                                                                     |
| 2                                                               | 8.58                      | 8.32 | 4.40 | 6.04 | 0.00             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp<br>3. <i>T.halophyllus</i><br>4. <i>B. atrophaeus</i> /Salinococcus |
| 4                                                               | 7.36                      | 7.30 | 4.00 | 6.77 | 0.00             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp<br>3. <i>T.halophyllus</i><br>4. <i>B. atrophaeus</i> /Salinococcus |
| 8                                                               | 6.07                      | 5.77 | 4.00 | 5.47 | 3.90             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp<br>3. <i>T.halophyllus</i><br>4. <i>B. atrophaeus</i> /Salinococcus |
| ปลาร้าเติมกล้าเชื้อหมักขนาด 10 กิโลกรัม                         |                           |      |      |      |                  |                                                                                                                               |
| 0                                                               | 8.74                      | 7.1  | 4.30 | 6.17 | 6.78             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                                                                     |
| 2                                                               | 8.35                      | 8.32 | 4.30 | 6.38 | 2.00             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp<br>3. <i>T.halophyllus</i><br>4. <i>B. atrophaeus</i> /Salinococcus |
| 4                                                               | 7.39                      | 7.30 | 4.60 | 6.80 | 2.60             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp<br>3. <i>T.halophyllus</i><br>4. <i>B. atrophaeus</i> /Salinococcus |
| 8                                                               | 6.35                      | 6.30 | 4.60 | 5.62 | 4.30             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp<br>3. <i>T.halophyllus</i><br>4. <i>B. atrophaeus</i> /Salinococcus |

#### 2.4.2. รูปแบบการหมักและการเปลี่ยนแปลงปลาร้าในระหว่างการหมักแบบ SMF หลังเติมกล้าเชื้อ

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 30 และ 31 พบว่าในการหมักปลาร้าแบบเติมน้ำพบว่า จุลินทรีย์ทุกชนิดที่เติมสามารถเจริญได้ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับหมักแบบ SMF แบบทั่วไป ในขณะที่เดียวกัน พบว่าในระบบดังกล่าวมีการดำเนินกิจกรรมการย่อยโปรตีนโดยพบค่า Protease activity สูงถึง 0.07 ซึ่งเกิดจาก กิจกรรมของจุลินทรีย์ในช่วง auto-fermentation ซึ่งน่าจะเกิดขึ้นตั้งแต่ขั้นตอนการหมักปลาร้าวัตถุดิบด้วยเกลือ ก่อนนำมาใช้ในการผลิต ซึ่งกลไกดังกล่าวทำให้มีกรดอะมิโนอิสระอยู่ในระบบมากกว่าการหมักรูปแบบอื่น ๆ และ เมื่อเติมน้ำจุลินทรีย์จึงสามารถใช้น้ำอิสระในการเจริญและดำเนินกิจกรรมการหมักได้เร็ว โดยพบว่าจุลินทรีย์กล้า เชื้อทั้งสามชนิดสามารถเร่งกิจกรรมการหมักทำให้เกิดการพัฒนาสี เนื้อสัมผัสของปลา และกลิ่นของปลาร้าได้ รวดเร็วกว่าปลาร้าไม่เติมน้ำอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าปลาร้าที่ได้จะมีลักษณะที่ใกล้เคียงกับปลาร้าที่ผลิต แบบดั้งเดิมหลังเติมน้ำเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในขณะที่ปลาร้าที่ไม่เติมน้ำจะยังมีกลิ่นคาวและเนื้อสัมผัสที่ แข็งกว่าอย่างเห็นได้ชัด

ตารางที่ 30 ผลจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและ protease activity ในระหว่างกระบวนการหมักปลาร้าการหมักแบบ SMF

| วันที่<br>ตรวจสอบ<br>ตัวอย่างหลัง<br>เติมน้ำเชื้อ<br>(สัปดาห์) | ปลาร้าควบคุม       |                      | ปลาร้าเติมน้ำเชื้อ<br>หมักขนาด 2 กิโลกรัม |                      | ปลาร้าเติมน้ำเชื้อ<br>หมักขนาด 10 กิโลกรัม |                   |
|----------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------|-------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------------|-------------------|
|                                                                | TPC<br>(log CFU/g) | Protease<br>activity | TPC<br>(log CFU/g)                        | Protease<br>activity | TPC<br>(log CFU/g)                         | Protease activity |
| 0                                                              | 3.84±0.10          | 0.078±0.00           | 4.13±0.13                                 | 0.079±0.00           | 3.84±0.02                                  | 0.078±0.00        |
| 2                                                              | 7.26±0.02          | 0.074±0.01           | 8.08±0.00                                 | 0.085±0.01           | 8.21±0.05                                  | 0.0785±0.02       |
| 4                                                              | 4.70±0.04          | 0.06±0.00            | 7.54±0.06                                 | 0.063±0.01           | 7.15±0.02                                  | 0.0605±0.01       |



(a)



(b)

ภาพที่ 28 ลักษณะปรากฏของปลาร้าหมักแบบ SMF (a) ปลาร้าหมักแบบเติมน้ำเชื้อ 1 เดือน และ (b) ปลาร้าหมักแบบไม่เติมน้ำเชื้อ 1 เดือน

**ตารางที่ 31** การเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณจุลินทรีย์และการแสดงออกทางพันธุกรรม ในระหว่างกระบวนการหมักปลาร้า แบบ SMF

| วันที่<br>ตรวจสอบ<br>ตัวอย่างหลัง<br>เติมกล้าเชื้อ<br>(สัปดาห์) | ปลาร้าควบคุม              |      |      |      |                  |                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------|------|------|------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                 | จำนวนประชากร (log CFU/ml) |      |      |      |                  | แถบ cDNA ตามลำดับ<br>ความเข้มข้น                                                                                              |
|                                                                 | TPC                       | FF2  | 82-1 | 78-1 | จุลินทรีย์อื่น ๆ |                                                                                                                               |
| 0                                                               | 3.84                      | 0    | 0    | 0    | 3.20             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                                                                     |
| 2                                                               | 7.26                      | 0    | 0    | 0    | 7.25             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                                                                     |
| 4                                                               | 4.70                      | 0    | 0    | 0    | 4.69             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                                                                     |
| ปลาร้าเติมกล้าเชื้อหมักขนาด 2 กิโลกรัม                          |                           |      |      |      |                  |                                                                                                                               |
| 0                                                               | 4.13                      | 2.95 | 2.5  | 2.5  | 2.0              | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                                                                     |
| 2                                                               | 8.08                      | 8.10 | 7.30 | 2.30 | 2.30             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp<br>3. <i>T.halophyllus</i><br>4. <i>B. atrophaeus</i> /Salinococcus |
| 4                                                               | 7.54                      | 7.50 | 6.30 | 4.30 | 2.00             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp<br>3. <i>T.halophyllus</i><br>4. <i>B. atrophaeus</i> /Salinococcus |
| ปลาร้าเติมกล้าเชื้อหมักขนาด 10 กิโลกรัม                         |                           |      |      |      |                  |                                                                                                                               |
| 0                                                               | 3.84                      | 2.95 | 2.5  | 2.5  | 2.0              | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                                                                     |
| 2                                                               | 8.21                      | 8.57 | 6.30 | 4.00 | 3.23             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp<br>3. <i>T.halophyllus</i><br>4. <i>B. atrophaeus</i> /Salinococcus |
| 4                                                               | 7.71                      | 7.69 | 6.57 | 4.11 | 0.00             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp<br>3. <i>T.halophyllus</i><br>4. <i>B. atrophaeus</i> /Salinococcus |

### 2.4.3. การหมักแบบ SSF แบบเกลือสูง

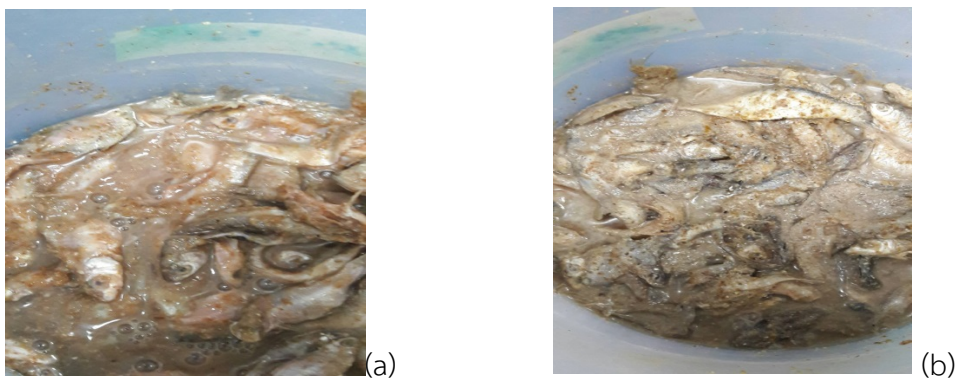
การทดสอบการหมักแบบ SSF เกลือสูง พบว่าในระบบการหมักดังกล่าวจุลินทรีย์กล้ำเชื้อเจริญเพิ่มจำนวนอยู่ในระบบได้มากกว่าการเจริญในระบบการหมัก 2 รูปแบบแรก ทั้งนี้เนื่องจากในกระบวนการหมักนี้มีเกลือในระบบสูงกระบวนการหมักดำเนินได้ช้า จึงทำให้เกิดการหมักเป็นเวลา 2.5 เดือน เพื่อให้มีกรดอะมิโนอิสระที่จุลินทรีย์กล้ำเชื้อสามารถใช้ในการเจริญเพิ่มจำนวนได้ภายใน 2 สัปดาห์แรกของการหมักโดยพบว่าจุลินทรีย์กล้ำเชื้อทั้งสามชนิดสามารถเร่งกิจกรรมการหมักทำให้เกิดการพัฒนาสี เนื้อสัมผัสของปลา และกลิ่น ของปลาร้าได้รวดเร็วกว่าปลาร้าไม่เติมกล้ำเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าปลาร้าที่ได้จะมีลักษณะที่ใกล้เคียงกับปลาร้าที่ผลิตแบบดั้งเดิมหลังเติมกล้ำเชื้อเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ในขณะที่ปลาร้าที่ไม่เติมกล้ำเชื้อจะยังมีกลิ่นคาว และเนื้อสัมผัสที่แข็งกว่าอย่างเห็นได้ชัด ภาพที่ 29 รวมถึงปลาร้าไม่เติมเชื้อจะยังมีกลิ่นซัลเฟอร์ที่รุนแรงที่เกิดจากกระบวนการหมักแบบ auto-fermentation เป็นเวลานาน ซึ่งกลิ่นดังกล่าวจะไม่รุนแรงในปลาร้าที่เติมกล้ำเชื้อบ่งชี้ให้เห็นได้ว่ากล้ำเชื้อปลาร้าสามารถช่วยสลายโมเลกุลของสารกลุ่มดังกล่าวได้ ซึ่งมีรายงานว่าจุลินทรีย์ *Tetragenococcus halophyllus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารไดซัลไฟด์ได้ดี (Udomsil et al, 2011)

**ตารางที่ 32** ผลจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและ protease activity ในระหว่างกระบวนการหมักปลาร้า แบบ SSF แบบใช้เกลือสูง

| วันที่<br>ตรวจสอบ<br>ตัวอย่างหลัง<br>เติมกล้ำเชื้อ<br>(สัปดาห์) | ปลาร้าควบคุม       |                      | ปลาร้าเติมกล้ำเชื้อ<br>หมักขนาด 2 กิโลกรัม |                      | ปลาร้าเติมกล้ำเชื้อ<br>หมักขนาด 10 กิโลกรัม |                      |
|-----------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------|--------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------|----------------------|
|                                                                 | TPC<br>(log CFU/g) | Protease<br>activity | TPC<br>(log CFU/g)                         | Protease<br>activity | TPC<br>(log CFU/g)                          | Protease<br>activity |
| 0                                                               | 7.04±0.43          | 0.017±0.010          | 7.45±0.42                                  | 0.028±0.011          | 8.32±0.010                                  | 0.028±0.011          |
| 2                                                               | 8.20±0.12          | 0.035±0.010          | 8.50±0.33                                  | 0.56±0.010           | 8.15±0.028                                  | 0.044±0.003          |
| 4                                                               | 8.92±0.78          | 0.037±0.011          | 9.92±0.40                                  | 0.054±0.002          | 8.59±0.065                                  | 0.035±0.004          |
| 6                                                               | 5.15±0.28          | 0.042±0.012          | 9.81±0.02                                  | 0.056±0.011          | 8.04±0.040                                  | 0.048±0.002          |

**ตารางที่ 33** การเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณจุลินทรีย์และการแสดงออกทางพันธุกรรม ในระหว่างกระบวนการหมักปลาร้า แบบ SSF แบบเกลือสูง

| วันที่<br>ตรวจสอบ<br>ตัวอย่างหลัง<br>เติมกล้าเชื้อ<br>(สัปดาห์) | ปลาร้าควบคุม              |      |      |      |                  |                                                                                                                            |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------|------|------|------|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                 | จำนวนประชากร (log CFU/ml) |      |      |      |                  | แถบ cDNA<br>ตามลำดับความ<br>เข้มข้น                                                                                        |
|                                                                 | TPC                       | FF2  | 82-1 | 58-2 | จุลินทรีย์อื่น ๆ |                                                                                                                            |
| 0                                                               | 7.04                      | 0    | 0    | 0    | 7.0.4            | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                                                                  |
| 2                                                               | 8.20                      | 0    | 0    | 0    | 8.20             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                                                                  |
| 4                                                               | 8.92                      | 0    | 0    | 0    | 8.92             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                                                                  |
| 8                                                               | 5.15                      | 0    | 0    | 0    | 5.15             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                                                                  |
| ปลาร้าเติมกล้าเชื้อหมักขนาด 2 กิโลกรัม                          |                           |      |      |      |                  |                                                                                                                            |
| 0                                                               | 7.45                      | 7.28 | 5.04 | 6.47 | 4.85             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                                                                  |
| 2                                                               | 8.50                      | 7.60 | 6.69 | 6.69 | 6.30             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp<br>3. <i>T.halophyllus</i><br>4. <i>B. atrophaeus</i> /Salinocod |
| 4                                                               | 9.92                      | 9.17 | 6.69 | 7.17 | 7.30             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp<br>3. <i>T.halophyllus</i><br>4. <i>B. atrophaeus</i> /Salinocod |
| 6                                                               | 9.81                      | 9.73 | 7.00 | 7.30 | 6.48             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp<br>3. <i>T.halophyllus</i><br>4. <i>B. atrophaeus</i> /Salinocod |
| ปลาร้าเติมกล้าเชื้อหมักขนาด 10 กิโลกรัม                         |                           |      |      |      |                  |                                                                                                                            |
| 0                                                               | 8.32                      | 8.28 | 7.36 | 6.30 | 6                | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp                                                                  |
| 2                                                               | 8.15                      | 8.15 | 6.30 | 2.00 | 4.00             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp<br>3. <i>T.halophyllus</i><br>4. <i>B. atrophaeus</i> /Salinocod |
| 4                                                               | 8.59                      | 6.95 | 6.90 | 8.59 | 2.48             | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp<br>3. <i>T.halophyllus</i><br>4. <i>B. atrophaeus</i> /Salinocod |
| 6                                                               | 8.04                      | 7.95 | 6.90 | 7.00 | 0                | 1. <i>Halanaerobium</i> sp<br>2. <i>Lentibacillus</i> spp<br>3. <i>T.halophyllus</i><br>4. <i>B. atrophaeus</i> /Salinocod |



**ภาพที่ 29** ลักษณะปรากฏของปลาร้าหมักแบบ SSF แบบเกลือสูง (a) ปลาร้าหมักแบบเดิมกล้าเชื้อ 1.5 เดือน และ (b) ปลาร้าหมักแบบไม่เติมกล้าเชื้อ 1.5 เดือน

เมื่อเปรียบเทียบสมบัติปลาร้าที่ได้จากการหมักแบบเดิมกล้าเชื้อทั้ง 3 รูปแบบ (ตารางที่ 34) พบว่าปลาร้าที่ได้จากการหมักโดยการเติมกล้าเชื้อจะมีรูปแบบของสมบัติต่าง ๆ ของปลาร้าอันเป็นผลจากกระบวนการหมัก ได้แก่ สี เนื้อสัมผัส pH และกลิ่น(แสดงผลการรูปแบบสารระเหยในวันนำเสนอสมมนา) ใกล้เคียงกับปลาร้าที่หมักแบบดั้งเดิม ส่วนสมบัติในเรื่องขององค์ประกอบของปลาร้าที่ได้จากการวิเคราะห์ proximate analysis นั้นไม่สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการเปรียบเทียบที่ชัดเจนได้ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับส่วนผสมที่ผู้ผลิตใช้ในแต่ละครั้ง ซึ่งหากจะต้องควบคุมตัวแปรดังกล่าวจำเป็นจะต้องหาแนวทางการปฏิบัติเพื่อให้ผู้ผลิตใช้ในการควบคุมกระบวนการผลิตให้มีความสม่ำเสมอ เช่น คู่มือการผลิตปลาร้า ที่ซึ่งกำหนดส่วนผสม และขั้นตอนการผลิตให้เป็นไปในแนวทางเดียวกัน จึงจะช่วยให้ผู้ผลิตสามารถผลิตปลาร้าที่มีคุณภาพการหมักและคุณภาพผลิตภัณฑ์ให้มีความสม่ำเสมอได้



**ตารางที่ 34** สมบัติทาง เคมี กายภาพ และชีวภาพ ของปลาร้าจาก 3 กระบวนการผลิตที่หมักโดยไม่เติม (U) และเติม กล้าเชื้อ (I) จากถั่วงอก 10 กิโลกรัม เปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของปลาร้าที่ผลิตแบบดั้งเดิม (c)

| Areas                  | pH   | Salt (%) | Proximate analysis<br>(% by weight) |        |      |       |         | Microbial population<br>(approx. Log CFU/g) |           |      | Color<br>(เนื้อด้านใน) |       |       | texture |
|------------------------|------|----------|-------------------------------------|--------|------|-------|---------|---------------------------------------------|-----------|------|------------------------|-------|-------|---------|
|                        |      |          | MS                                  | ash    | fat  | fiber | protein | TVC                                         | Y&M       | SA*  | L*                     | a*    | b*    |         |
| SFF (c)                | 5.44 | 24.53    | 64.62                               | 7.54   | 8.85 | 4.98  | 11.06   | 4.00-5.33                                   | 3.40-4.70 | 3:12 | 45.44                  | 4.34  | 12.07 | 309.82  |
| SFF<br>ทั่วไป<br>(U)   | 5.42 | 26.12    | 63.76                               | 18.30  | 5.16 | 0.00  | 14.15   | 6.65                                        | 3.00      | ND   | 46.71                  | 14.71 | 9.96  | 777.36  |
| SFF<br>ทั่วไป (I)      | 5.38 | 25.64    | 65.11                               | 17.43  | 4.11 | 0.00  | 13.58   | 5.41                                        | 2.85      | ND   | 53.57                  | 7.97  | 12.58 | 383.12  |
| SMF (c)                | 5.89 | 21.67    | 64.57                               | 6.62   | 5.63 | 12.10 | 12.10   | 6.00-6.74                                   | 1.00-3.88 | 3:12 | 49.39                  | 7.37  | 15.87 | 233.18  |
| SMF<br>(U)             | 6.50 | 30.15    | 65.55                               | 18.31  | 5.13 | 1.54  | 9.47    | 5.53                                        | 2.30      | ND   | 45.72                  | 8.96  | 10.78 | 666.56  |
| SMF<br>(I)             | 6.16 | 30.36    | 63.23                               | 17.985 | 5.75 | 2.36  | 10.68   | 4.68                                        | 2.285     | ND   | 53.51                  | 6.35  | 12.47 | 299.67  |
| SFF<br>เกลือสูง<br>(c) | 5.40 | 32.43    | 61.32                               | 12.77  | 9.23 | 3.79  | 9.76    | 3.86-6.30                                   | 1.00-2.30 | 5:12 | 47.79                  | 5.66  | 10.58 | 328.55  |
| SFF<br>เกลือสูง<br>(U) | 6.63 | 30.34    | 68.62                               | 15.82  | 3.92 | 0.00  | 12.49   | 6.43                                        | 2.60      | ND   | ND                     | ND    | ND    | 626.56  |
| SFF<br>เกลือสูง<br>(I) | 6.68 | 30.36    | 68.85                               | 15.87  | 9.44 | 0.00  | 12.73   | 7.17                                        | 2.85      | ND   | ND                     | ND    | ND    | 393.57  |

TVC = Total viable count, Y&M = Yeast & Mold count, SA = *Staphylococcus aureus*

NA = วัดค่าไม่ได้เนื่องจากปลา มีขนาดเล็ก

ยกเว้น microbial population) ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ทุกรายการค่า  $\pm$  SD ไม่เกินร้อยละ 30 ของทุกค่า

ผลการวิเคราะห์สารระเหยง่ายของปลาร้าหมักด้วยกล้าเชื้อแต่ละแบบเปรียบเทียบกับปลาร้าดั้งเดิมเมื่อผลการวิเคราะห์ PCA จาก volatile metabolite profile พบว่าปลาร้าที่หมักจากกล้าเชื้อมีรูปแบบของสารระเหยง่ายอยู่ในกลุ่มเดียวกับปลาร้าที่หมักแบบดั้งเดิม (แสดงในภาคผนวก ๗) ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าปลาร้าที่หมักด้วยกล้าเชื้อสามารถเร่งการหมักให้เกิดการสร้างสารระเหยง่ายที่มีรูปแบบและปริมาณใกล้เคียงกับปลาร้าแบบดั้งเดิม ซึ่งเมื่อพิจารณาร่วมกับคุณสมบัติทางเคมี กายภาพ ดังแสดงในตารางที่ 34 ปลาร้าที่ได้จากการหมักด้วยกล้าเชื้อปลาร้าน่าจะมอบคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสใกล้เคียงกับปลาร้าดั้งเดิม จึงได้นำปลาร้าที่ได้ไปทดลองทางประสาทสัมผัสต่อไป ดังแสดงในหัวข้อ 2.5

## 2.5 การทดสอบคุณภาพของปลาร้าที่ผลิตได้จากการหมักโดยใช้กล้าเชื้อ

นำปลาร้าที่ได้จากกระบวนการหมักด้วยกล้าเชื้อ ทดสอบคุณภาพของปลาร้าที่หมักได้โดยการนำไปประกอบอาหารที่เป็นที่นิยม ในแต่ละพื้นที่และทดสอบทางประสาทสัมผัส

- ปลาร้าหมักจากกล้าเชื้อแบบ SSF แบบเกลือสูง ทดสอบโดยการเตรียมเป็นน้ำปลาร้าปรุงส้มตำ ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส
- ปลาร้าหมักจากกล้าเชื้อแบบ SSF แบบทั่วไป ทดสอบโดยการทำเป็นปลาร้าบองและประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส
- ปลาร้าหมักจากกล้าเชื้อแบบ SMF ทดสอบโดยการผสมในแกงลาวและประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

### 2.5.1 การทดสอบคุณภาพปลาร้าหมักจากกล้าเชื้อแบบ SSF แบบเกลือสูง

โดยการเตรียมเป็นน้ำปลาร้าปรุงส้มตำ (วิธีการทำน้ำปลาร้าส้มตำ ดังแสดงใน ภาคผนวก ฏ) ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ชิม 50 คน ในการเปรียบเทียบตัวอย่างปลาร้า 3 ชนิด ได้แก่ ปลาร้าสูตรมาตรฐาน (รหัสตัวอย่าง 495) ปลาร้าสูตรทดลองใส่กล้าเชื้อ (712) และ = ปลาร้าสูตรควบคุม ไม่ใส่กล้าเชื้อ (368) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 35 และ 36

จากแบบทดสอบคุณภาพตัวอย่างของส้มตำปลาร้าจากผู้ทดสอบทั้งหมด 50 คน โดยสอบถามการยอมรับต่อส้มตำปลาร้าแต่ละตัวอย่าง ผู้ชิมมีสิทธิเลือกว่า ยอมรับหรือไม่ยอมรับ ในแต่ละตัวอย่าง ผู้ทดสอบชิมได้ให้คะแนนกับทุกตัวอย่าง ดังนี้ คือ มีผู้ทดสอบชิมยอมรับตัวอย่าง 495 มี 46 คน ตัวอย่าง 712 มี 38 คน และตัวอย่าง 368 มี 22 คน จาก 50 คน และได้สอบถามถึงรสชาต ซึ่งหมายถึงรสชาติ “อร่อย” ของส้มตำปลาร้า ผู้ทดสอบชิมให้ความเห็นว่า ตัวอย่าง 495 มีรสชาต จำนวน 36 คน ตัวอย่าง 712 จำนวน 25 คน และ ตัวอย่าง 368 จำนวน 8 คน จาก 50 คน จากตาราง Minimum Numbers of Correct Judgments แบบ Two-tailed (Herbert Stone, Rebecca N. Bleibaum and Heather A. Thomas. 2012. Sensory Evaluation practice, 4<sup>th</sup> edition

Academic Press ELSEVIER) ที่ ระดับความเชื่อมั่น = 0.05 ระบุว่า ถ้ามีจำนวนผู้ทดสอบที่ตอบถูก หรือเลือกด้านใด ด้านหนึ่งในสองด้าน มากกว่า หรือเท่ากับ 33 คน แสดงว่า ผู้ทดสอบทั้งหมดสามารถแยกแยะตัวอย่างได้ หรือ มีความเห็นไปด้านนั้น ๆ จากผลทดสอบชิมขั้นตอนแสดงว่า ผู้ทดสอบชิม ให้การยอมรับตัวอย่าง 495 และ 712 และผู้ทดสอบชิมยอมรับรสใหม่ของตัวอย่าง 495 เท่านั้น

**ตารางที่ 35** ค่าการยอมรับต่อลักษณะต่าง ๆ ต่อส้มตำปลาร้าแต่ละตัวอย่าง จากผู้ทดสอบชิม 50 คน

|            | สีของน้ำปลาร้า        | กลิ่นของ<br>น้ำปลาร้า | รสชาติของ<br>ส้มตำ    | รสชาติของ<br>น้ำปลาร้า | ความชอบ               |
|------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| <b>495</b> | 6.6 <sup>B</sup> ±1.4 | 6.4 <sup>B</sup> ±1.6 | 6.8 <sup>C</sup> ±1.7 | 6.7 <sup>C</sup> ±1.7  | 7.0 <sup>C</sup> ±1.5 |
| <b>712</b> | 6.5 <sup>B</sup> ±1.4 | 5.7 <sup>A</sup> ±1.4 | 6.1 <sup>B</sup> ±1.5 | 6.0 <sup>B</sup> ±1.6  | 6.3 <sup>B</sup> ±1.5 |
| <b>368</b> | 5.1 <sup>A</sup> ±1.9 | 5.2 <sup>A</sup> ±1.7 | 4.8 <sup>A</sup> ±1.7 | 4.8 <sup>A</sup> ±1.8  | 5.1 <sup>A</sup> ±1.7 |

คะแนนในตารางคือ 9-point hedonic scale; 1 = ไม่ชอบมากที่สุด, 9 = ชอบมากที่สุด

A, B และ C อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในแต่ละแถว แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

**ตารางที่ 36** ความเข้มของลักษณะของตัวอย่างส้มตำปลาร้า จากผู้ทดสอบชิม 50 คน

|            | รสเค็มของส้มตำ          | กลิ่นหอมของน้ำปลาร้า    |
|------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>495</b> | 49.5 <sup>B</sup> ±17.7 | 61.5 <sup>C</sup> ±23.1 |
| <b>712</b> | 42.1 <sup>B</sup> ±15.9 | 47.6 <sup>B</sup> ±19.3 |
| <b>368</b> | 30.2 <sup>A</sup> ±23.4 | 32.2 <sup>A</sup> ±23.4 |

คะแนนในตารางมีระดับ 0-100; 0 = ไม่เค็มเลย, 100 = เค็มมาก; 0 = ไม่มีกลิ่นหอมเลย, 100 = มีกลิ่นหอมมาก

A, B และ C อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในแต่ละแถว แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการทดสอบบ่งชี้ให้เห็นว่าปลาร้าหมักแบบ SFF แบบเกลือสูงที่หมักจากการเติกกัลล่าเชื้อได้รับการยอมรับทางประสาทสัมผัสในเรื่องของ สี ไม่ต่างจากปลาร้าสูตรมาตรฐานที่ทำจากปลาร้าทางการค้า ส่วนในเรื่องของ กลิ่น รสชาติและความชอบได้รับการยอมรับต่ำกว่าปลาร้าสูตรมาตรฐาน ทั้งนี้หากต้องการให้ลักษณะทางประสาทสัมผัสได้รับการยอมรับเท่ากับปลาร้าทางการค้าครบทุกด้านอาจเพิ่มเวลาการหมักขึ้นอีกเล็กน้อย ซึ่งเมื่อประเมินปลาร้าที่หมักด้วยกัลล่าเชื่อนานขึ้นอีก 2 พบว่ากลิ่นของปลาร้ามีการพัฒนาขึ้นจากปลาร้าที่หมักเพียง 1.5 เดือนอย่างเห็นได้ชัด (อาจทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสอีกครั้ง)

### 2.5.2 การทดสอบคุณภาพปลาร้าหมักจากกล้าเชื้อแบบ SMF

การทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสผู้ทำวิจัยได้นำปลาร้าหมักโดยใช้กล้าเชื้อเปรียบเทียบกับปลาร้าที่หมักโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ มาทดสอบในสองรูปแบบ คือ การใช้น้ำปลาร้าสดผสมในแกง และการแปรรูปเป็นปลาร้าผง แล้วจึงผสมแกง โดยนำปลาร้าสดมาเปรียบเทียบการยอมรับของผู้บริโภค เมื่อนำมาปรุงเป็นแกงเห็ด โดยแกงเห็ด 2 กิโลกรัม เติมปลาร้าสด 200 กรัม คิดเป็นร้อยละ 10 และปลาร้าผง เติม 50 กรัม คิดเป็นร้อยละ 2.5 ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 37-40 และภาพที่ 30

ตารางที่ 37 การผลิตน้ำแกงเห็ดแบบเติมปลาร้าสด

| ตัวอย่าง              | ปริมาณการเติมในแกงร้อยละ |
|-----------------------|--------------------------|
| ปลาร้าสดชุดควบคุม     | 10                       |
| ปลาร้าสดเติมกล้าเชื้อ | 10                       |

ตารางที่ 38 การผลิตน้ำแกงเห็ดแบบเติมปลาร้าผง

| ตัวอย่าง              | ปริมาณการเติมในแกงร้อยละ |
|-----------------------|--------------------------|
| ปลาร้าผงชุดควบคุม     | 2.5                      |
| ปลาร้าผงเติมกล้าเชื้อ | 2.5                      |



ภาพที่ 30 การทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสแกงเห็ดที่ใช้ปลาร้าชุดควบคุม และปลาร้าที่เติมกล้าเชื้อ

ตารางที่ 39 คะแนนความชอบของตัวอย่างปลาร้า 9 point hedonic scale

| Treatment                                                                      | สี                     | กลิ่น <sup>ns</sup> | รสชาติ                 | ความชอบโดยรวม          |
|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| ปลาร้าสดควบคุม                                                                 | 6.20±1.30 <sup>B</sup> | 6.47±1.21           | 6.15±1.14 <sup>B</sup> | 5.75±1.29 <sup>B</sup> |
| ปลาร้าสดกลั้เชื้อ                                                              | 7.00±1.08 <sup>A</sup> | 6.52±0.96           | 6.57±1.08 <sup>A</sup> | 6.62±0.97 <sup>A</sup> |
| หมายเหตุ N=40 คน ns หมายถึง ค่าคะแนนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ |                        |                     |                        |                        |

A, B อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าคะแนน

การศึกษาความชอบของแกงเห็ดที่เติมปลาร้าสดร้อยละ 10 พบว่าผู้ประเมินจำนวน 40 คน ให้คะแนนความชอบปลาร้าสดสูตรควบคุมและปลาร้าสดสูตรกลั้เชื้อ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) ในด้าน สี รสชาติ และความชอบโดยรวม โดยสูตรปลาร้าที่เติมกลั้เชื้อได้รับคะแนนความชอบสูงกว่า แต่ในด้านกลิ่นคะแนนความชอบไม่มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 40 คะแนนความชอบของตัวอย่างปลาร้า 9 point hedonic scale

| Treatment                                                             | สี <sup>ns</sup> | กลิ่น                   | รสชาติ                 | ความชอบโดยรวม          |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| ปลาร้าผงสดควบคุม                                                      | 6.37±1.46        | 6.23± 0.99 <sup>B</sup> | 5.77±1.73 <sup>B</sup> | 6.50±1.17 <sup>B</sup> |
| ปลาร้าผงเติมกลั้เชื้อ                                                 | 6.25±1.17        | 6.52± 0.93 <sup>A</sup> | 6.12±1.30 <sup>A</sup> | 6.72±0.93 <sup>A</sup> |
| N=40 คน ns หมายถึง ค่าคะแนนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ |                  |                         |                        |                        |

A, B อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าคะแนน

การศึกษาความชอบของแกงเห็ดที่เติมปลาร้าผงร้อยละ 2.5 พบว่าผู้ประเมินจำนวน 40 คน ให้คะแนนความชอบปลาร้าผงสูตรควบคุมและปลาร้าผงสูตรกลั้เชื้อ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) ในด้าน กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม โดยสูตรปลาร้าผงที่เติมกลั้เชื้อได้รับคะแนนความชอบสูงกว่า แต่ในด้านสีคะแนนความชอบไม่มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 41 จำนวนผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัสที่ให้การยอมรับปลาร้าในน้ำแกงเห็ด

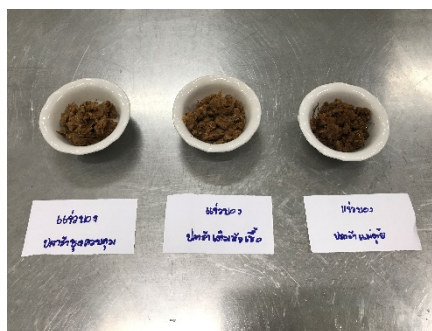
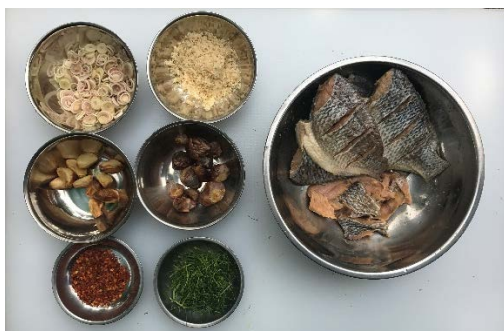
| Treatment         | การยอมรับ |           |
|-------------------|-----------|-----------|
|                   | ยอมรับ    | ไม่ยอมรับ |
| ปลาร้าสดควบคุม    | 34        | 6         |
| ปลาร้าสดกล้าเชื้อ | 36        | 4         |
| ปลาร้าผงควบคุม    | 33        | 7         |
| ปลาร้าผงกล้าเชื้อ | 35        | 5         |

N=40 คน

จากตารางที่ 41 แสดงผลการยอมรับปลาร้าสดและปลาร้าผง ที่ผ่านการปรุงแกงเห็ด จำนวนผู้ทดสอบ 40 คน จากตาราง Minimal numbers of correct judgments แบบ two tailed ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ระบุว่า ถ้ามีคนตอบให้การยอมรับมากกว่า 27 คนจากจำนวนผู้ทดสอบ 40 คน แสดงว่าผู้ทดสอบให้การยอมรับตัวอย่างปลาร้าในทุกชุดการทดลอง เมื่อพิจารณาจากจำนวนผู้ให้การยอมรับ พบว่าปลาร้าสดที่ใช้กล้าเชื้อในการหมักได้รับคะแนนการยอมรับมากที่สุด ตามด้วยปลาร้าผงที่ได้จากสูตรกล้าเชื้อ จึงอาจกล่าวได้ว่า ปลาร้าสดและปลาร้าผงที่ผลิตจากกล้าเชื้อมีคุณภาพเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากกว่าปลาร้าที่หมักแบบไม่เติมกล้าเชื้อ

### 2.5.3 การทดสอบคุณภาพปลาร้าหมักจากกล้าเชื้อแบบ SSF แบบทั่วไป

การทดลองผู้ทำวิจัยได้นำปลาร้าสูตรควบคุม(หมักโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ) ปลาร้าที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ และปลาร้าสูตรมาตรฐาน(ปลาร้าแม่ตุ๋นทำตุ๋น) มาเป็นส่วนผสมหลักของปลาร้าบองของผู้บริโภค (วิธีการทำปลาร้าบองดังแสดงใน ภาคผนวก ก) เพื่อนำมาทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ชิม 30 คน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 42-43 และภาพที่ 31



ภาพที่ 31 วัตถุดิบที่ใช้ปรุงปลาร้าบอง และปลาร้าบองสูตรต่างๆ

ตารางที่ 42 คะแนนการยอมรับต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ปลาร้าบอง

| Treatment                  | สี                       | กลิ่น                     | รสชาติ                    | เนื้อสัมผัส              | ความชอบโดยรวม             |
|----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| ปลาร้าควบคุม               | 5.13 <sup>A</sup> ± 1.56 | 5.13 <sup>AB</sup> ± 2.11 | 4.83 <sup>AB</sup> ± 1.68 | 5.43 <sup>A</sup> ± 1.61 | 5.33 <sup>AB</sup> ± 1.62 |
| ปลาร้ากล้าเชื้อ            | 5.83 <sup>A</sup> ± 1.66 | 6.30 <sup>A</sup> ± 1.51  | 6.13 <sup>A</sup> ± 1.68  | 6.20 <sup>A</sup> ± 1.24 | 6.47 <sup>A</sup> ± 1.70  |
| ปลาร้ามาตรฐาน<br>(แม่ตุ๋น) | 5.62 <sup>A</sup> ± 1.59 | 5.67 <sup>AB</sup> ± 1.88 | 5.60 <sup>AB</sup> ± 1.77 | 5.97 <sup>A</sup> ± 1.71 | 6.20 <sup>AB</sup> ± 1.75 |

คะแนนในตารางคือ 9-point hedonic scale; 1 = ไม่ชอบมากที่สุด, 9 = ชอบมากที่สุด (N = 30)

A, B, C อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแนวดังแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าคะแนน

การศึกษาความชอบของปลาร้าบองที่ปรุงด้วยปลาร้าต่างกัน พบว่าผู้ประเมินจำนวน 30 คน ให้คะแนนความชอบปลาร้าบองสูตรควบคุม และสูตรกล้าเชื้อ แตกต่างกันในด้านกลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม แต่โดยภาพรวมสูตรปลาร้ากล้าเชื้อมีแนวโน้มคะแนนความชอบอยู่ในเกณฑ์ชอบเล็กน้อยเพราะปลาร้าบองทุกสูตรนั้นต้องนำปลาร้ามาทำให้สุกก่อนแล้วจึงแกะเนื้อไปทำปลาร้าบอง ซึ่งโดยทั่วไปจะนำปลาร้าดิบมาทำปลาร้าบอง ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ปลาร้าบองทุกสูตรจะมีลักษณะคล้ายกับน้ำพริกปลาแบบแห้ง ซึ่งไม่เป็นที่คุ้นเคยของผู้บริโภค เมื่อแปลผลแต่ละด้านนั้น พบว่า ในด้านสีทุกอย่างตัวอย่างได้คะแนนในระดับเฉยๆ ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองต้องทำให้เนื้อปลาร้าให้สุกโดยการนึ่งก่อนนำมาปรุงเป็นน้ำพริกจึงมีปริมาณน้ำในเนื้อปลาร้ามากกว่าปลาร้าดิบสีของปลาร้าบองจึงอ่อนกว่าที่ผู้ประเมินคุ้นเคย ในด้านกลิ่นปลาร้าบองสูตรควบคุมยังมีกลิ่นคาวปลา และสูตรแม่ตุ๋นมีกลิ่นปลาร้าแรงมากเกินไป ในด้านรสชาติปลาร้าบองสูตรควบคุมใช้ปลาร้าที่ยังไม่เป็นและมีกลิ่นคาวปลามาผลิตจึงมีรสชาติที่ยังไม่นัว ส่วนสูตรแม่ตุ๋นมีความเค็มสูงมากเพราะใช้ปลาหมักนาน 12 เดือน ในด้านเนื้อสัมผัสปลาร้าบองสูตรควบคุมมีแนวโน้มคะแนนต่ำที่สุดเพราะทำจากปลาร้าที่หมักเพียง 5 เดือน เซลล์ของเนื้อปลายังไม่ถูกย่อยเมื่อนำมาทำปลาร้าบองจึงมีเนื้อสัมผัสหยาบ ไม่เป็นเนื้อเดียวกันเหมือนปลาร้าที่เป็นแล้วในสูตรกล้าเชื้อ และสูตรมาตรฐาน(แม่ตุ๋น)

ตารางที่ 43 จำนวนผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัสที่ให้การยอมรับปลาร้าในปลาร้าบอง

| Treatment              | การยอมรับ |           |
|------------------------|-----------|-----------|
|                        | ยอมรับ    | ไม่ยอมรับ |
| ปลาร้าควบคุม           | 19        | 11        |
| ปลาร้ากล้าเชื้อ        | 27        | 3         |
| ปลาร้ามาตรฐาน(แม่ตุ๋น) | 30        | -         |

N=30 คน

จากตารางที่ 43 แสดงผลการยอมรับปลาร้าของสูตรต่างๆ จำนวนผู้ทดสอบ 30 คน จากตาราง Minimal numbers of correct judgments แบบ two tailed ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ระบุว่า ถ้ามีคนตอบให้การยอมรับมากกว่า 21 คนจากจำนวนผู้ทดสอบ 30 คน แสดงว่าผู้ทดสอบให้การยอมรับตัวอย่างปลาร้าในทุกชุดการทดลอง เมื่อพิจารณาจากจำนวนผู้ให้การยอมรับ พบว่าปลาร้าของสูตรปลาร้ามาตรฐานได้รับคะแนนการยอมรับมากที่สุด ตามด้วยสูตรปลาร้ากล้าเชื้อ จึงอาจกล่าวได้ว่า ปลาร้าของที่ใช้ปลาร้ากล้าเชื้อซึ่งหมัก 5 เดือน มีคุณภาพเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคเช่นเดียวกับสูตรปลาร้าที่หมักแบบมาตรฐาน(แม่ตุ๋ย) เป็นเวลา 12 เดือน

## 2.6 การพัฒนาผลิตภัณฑ์รูปแบบใหม่จากปลาร้าที่ได้จากการหมักด้วยกล้าเชื้อ

สร้างผลิตภัณฑ์รูปแบบใหม่โดยนำปลาร้าที่หมักได้จากการหมักโดยใช้กล้าเชื้อ โดยเลือกพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาร้าที่ได้จากการหมัก แบบ SSF แบบทั่วไป และการหมักแบบ SMF โดยการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ปลาร้าผงพร้อมปรุงจากปลาร้าแท้ และปลาร้าพูทรวงเครื่อง โดยประเมินวิธีการผลิต ศึกษากระบวนการผลิต พัฒนาสูตร ทดสอบ คุณภาพ และคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์

2.6.1 การผลิตปลาร้าผงด้วยการทำแห้งแบบลูกกลิ้งคู่ (Drum Dryer) เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ปลาร้าผงพร้อมปรุงจากปลาร้าแท้

การกล่าวถึงความสำคัญ ที่มา และวิธีทดลองดังแสดงในภาคผนวก ฎ ผลการศึกษาแบ่งออกเป็น 3 ตอน คือ การเตรียมปลาร้าเข้มข้น การทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบลูกกลิ้งคู่ และการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคเมื่อใช้ปลาร้าเป็นส่วนประกอบอาหาร มีผลการศึกษาดังนี้

### การเตรียมปลาร้าเข้มข้น

ปลาร้าชุดควบคุม (P1) และปลาร้าที่ผ่านการเติมกล้าเชื้อ 1 (P2) และปลาร้าที่ผ่านการเตรียมกล้าเชื้อ 2 (P3) เมื่อการหมักผ่านไป 1 เดือน นำมาตรวจสอบคุณภาพแสดงผลในตารางที่ 44 พบว่าปลาร้าที่ได้ค่า pH อยู่ในช่วง 5.03-5.07 และค่าความเค็มประมาณ 28.00-28.80 % psu ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) จากการพิจารณาลักษณะปรากฏ พบว่าปลาร้าชุดควบคุม และปลาร้าที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ มีลักษณะปรากฏที่เหมือนกัน มีกลิ่นหอมของปลาร้าและกลิ่นคาวของปลาสดลดลง แต่ปลาร้าที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อเนื้อสัมผัสจะนุ่ม และเนื้อนุ่มกว่าเล็กน้อย แสดงในรูปที่ 32



ตารางที่ 44 สภาวะที่ศึกษาการทำปลาร้าผง

| ปลาร้าที่ใช้ทดลอง | pH <sup>ns</sup> | Salinometer<br>(pratical salinity unit; psu %) <sup>ns</sup> |
|-------------------|------------------|--------------------------------------------------------------|
| P1                | 5.07 ± 0.30      | 28.00 ± 0.20                                                 |
| P2                | 5.03 ± 0.10      | 28.80 ± 0.10                                                 |
| P3                | 5.04 ± 0.10      | 28.00 ± 0.50                                                 |

ns หมายถึง ค่าคะแนนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



(ก)

(ข)

(ค)

ภาพที่ 32 ปลาร้าที่หมักด้วยสภาวะต่าง ๆ (ก) ชุดควบคุม (P1) (ข) หมักด้วยกล้าเชื้อ 1 (P2) (ค) หมักด้วยกล้าเชื้อ 2 (P3)

จากนั้นนำปลาร้าเฉพาะส่วนของตัวปลา มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เนื้อปลาจะนิ่มและเป็นน้ำปลาร้าเข้มข้น นำไปปั่นเพื่อลดขนาดก้าง และกรองผ่านตะแกรงร้อนเพื่อแยกก้างออกจะได้เป็นน้ำปลาร้าเข้มข้น แสดงในรูปที่ 33



ภาพที่ 33 ขั้นตอนการเตรียมปลาร้าเข้มข้น

ตารางที่ 45 ร้อยละของผลผลิตปลาร้าเข้มข้นจากปลาร้าสดในแต่ละสภาวะ

|     | ปลาร้าที่ใช้ทดลอง | ปริมาณปลาร้าสด | ปลาร้าเข้มข้น | ร้อยละผลผลิต |
|-----|-------------------|----------------|---------------|--------------|
|     |                   | (g)            | (g)           |              |
| ดาว | P1                | 2,000          | 1,250         | 62.50        |
|     | P2                | 2,000          | 1,400         | 70.00        |
|     | P3                | 2,000          | 1,450         | 72.50        |

างที่ 45 แสดงร้อยละของผลผลิตปลาร้าเข้มข้นจากปลาร้าในแต่ละสูตร พบว่าปลาร้าสดเมื่อนำมาให้ความร้อนจะ

สามารถแยกก้างและเนื้อปลาได้ เมื่อผ่านการให้ความร้อนโปรตีนกลั่นเนื้อปลาเริ่มสลายพันธะนอกจากนี้ความร้อนยังช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายโปรตีนให้สูงขึ้น (Wang, Tai and Chen, 2008) ปลาจำสดเมื่อผลิตเป็นน้ำปลาร้าเข้มข้น มีร้อยละผลผลิตในช่วง 62.50 – 72.50 โดยในสูตรควบคุมสามารถผลิตเป็นปลาร้าเข้มข้นได้ต่ำที่สุด ปลาร้าในสูตรเดิมกล้าเชื่อให้ปริมาณผลผลิตสูงกว่า

### **การทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบลูกกลิ้งคู่**

นำน้ำปลาร้าเข้มข้นที่ได้จากตอนที่ 1 มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำแห้งแบบลูกกลิ้งคู่ โดยแบ่งสภาวะการทดลองออกเป็น 6 สภาวะ การเติมข้าวคั่วที่ร้อยละ 25 และที่ร้อยละ 5 ของน้ำปลาร้าเข้มข้น นำไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบลูกกลิ้งคู่ ที่อุณหภูมิลูกกลิ้ง 120 – 130 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 0.5 rpm ระยะห่างลูกกลิ้ง 0.1 มิลลิเมตร นำตัวอย่างปลาร้าที่ได้ไปปั่นโดยใช้เครื่องปั่นอาหารแบบแห้ง ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 150 Mesh และบรรจุในถุงอลูมิเนียมและปิดผนึก



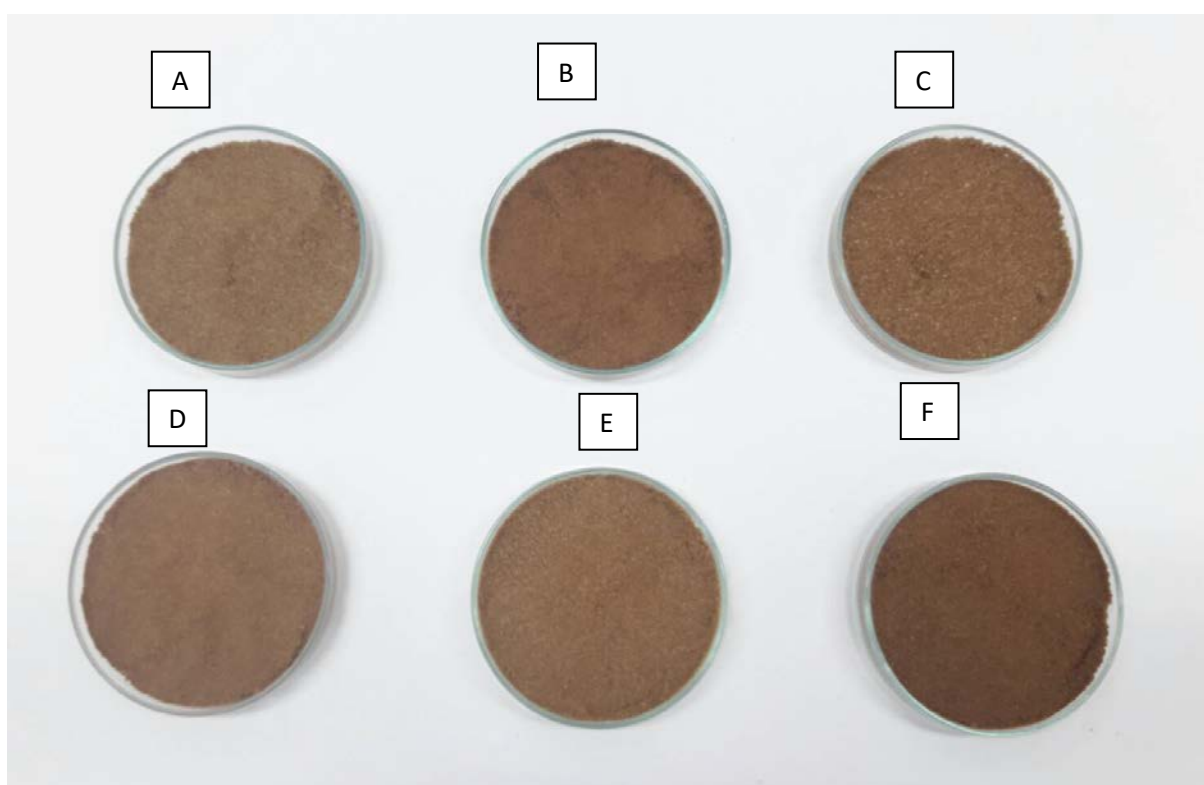


ภาพที่ 34 ขั้นตอนการทำปลาร้าผงโดยการทำแห้งแบบบลูกกลิ้งคู่

ตารางที่ 46 สภาวะที่ศึกษาการทำปลาร้าผง

| Treatment | ร้อยละผลผลิต | ลักษณะปรากฏ                                        |
|-----------|--------------|----------------------------------------------------|
| 1         | 41.30        | ปลาร้าผงที่ได้มีสีน้ำตาลอ่อนปนขาว เป็นผงร่วน       |
| 2         | 31.06        | ปลาร้าที่ได้มีสีน้ำตาลเข้ม เป็นผงร่วน              |
| 3         | 62.45        | ปลาร้าผงที่ได้มีสีน้ำตาลอ่อนปนขาว ผงมีความชื้นอยู่ |
| 4         | 33.90        | ปลาร้าที่ได้มีสีน้ำตาลเข้ม เป็นผงร่วน              |
| 5         | 38.59        | ปลาร้าผงที่ได้มีสีน้ำตาลอ่อนปนขาว เป็นผงร่วน       |
| 6         | 30.33        | ปลาร้าที่ได้มีสีน้ำตาลเข้ม เป็นผงร่วน              |

จากการศึกษาการทำแห้งปลาร้าผงเบื้องต้น (preliminary) พบว่า การไม่เติมข้าวคั่วในสูตร ทำให้ปลาร้าผงที่ได้ทำแห้งได้ยากเนื่องจากมีน้ำมันที่ออกมาจากเนื้อปลาร้าเยิ้มเคลือบลูกกลิ้ง และเนื้อปลาร้าแห้งที่ได้มีสีดำคล้ำ เมื่อแปรปริมาณข้าวคั่วที่ร้อยละ 5 พบว่า ผงปลาร้าที่ได้มีความชื้นเมื่อออกจากเครื่อง drum dryer แห้งดี เมื่อเติมที่ร้อยละ 25 พบว่าผงที่ได้ไม่แห้งต้องนำไปอบต่อที่ตู้อบลมร้อน อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง จึงนำมาบดได้เป็นผงปลาร้า และเมื่อเติมที่ร้อยละ 50 พบว่าปลาร้าขึ้นเหนียวมากจนไม่สามารถทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้ง drum dryer ได้ ในตารางที่ 46 แสดงร้อยละของปลาร้าเข้มข้นที่เติมข้าวคั่วพบว่า มีร้อยละผลผลิตในช่วง 30.33-62.45 ภาพที่ 34 แสดงลักษณะปรากฏของปลาร้าผงที่ได้



**ภาพที่ 35** ปลาร้าผงที่ได้จากสภาวะต่าง ๆ (A) ปลาร้าจากชุดควบคุม P1 + 25% ข้าวคั่ว (B) ปลาร้าจากชุดควบคุม P1 + 5% ข้าวคั่ว (C) ปลาร้าจากชุดควบคุม P2 + 25% ข้าวคั่ว (D) ปลาร้าจากชุดควบคุม P2 + 5% ข้าวคั่ว (E) ปลาร้าจากชุดควบคุม P3 + 25% ข้าวคั่ว (F) ปลาร้าจากชุดควบคุม P3 + 5% ข้าวคั่ว

ตารางที่ 47 การวัดสีปลาแรด

| Treatment | $L^*$                 | $a^*$              | $b^*$                 | $C$                | $h^\circ$          |
|-----------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|
| 1         | $41.53 \pm 1.46^{AB}$ | $6.68 \pm 1.20^B$  | $20.42 \pm 1.0^B$     | $21.48 \pm 2.07^B$ | $71.87 \pm 1.25^A$ |
| 2         | $40.20 \pm 1.50^{AB}$ | $10.09 \pm 2.11^A$ | $22.02 \pm 2.10^{AB}$ | $24.79 \pm 1.24^A$ | $66.13 \pm 1.98^B$ |
| 3         | $41.79 \pm 0.2^{AB}$  | $7.89 \pm 1.01^B$  | $22.13 \pm 0.23^{AB}$ | $22.85 \pm 1.89^B$ | $70.45 \pm 1.54^A$ |
| 4         | $43.70 \pm 0.71^A$    | $10.39 \pm 0.89^A$ | $19.22 \pm 0.25^C$    | $20.16 \pm 0.69^C$ | $66.46 \pm 1.65^B$ |
| 5         | $43.84 \pm 0.98^A$    | $8.57 \pm 1.00^B$  | $24.85 \pm 1.25^A$    | $26.20 \pm 0.78^A$ | $70.87 \pm 0.97^B$ |
| 6         | $38.89 \pm 1.11^C$    | $10.02 \pm 1.05^A$ | $23.41 \pm 0.90^B$    | $25.63 \pm 0.02^A$ | $67.55 \pm 0.23^B$ |

A, B, C อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแนวดิ่งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าคะแนน

จากตารางที่ 47 แสดงค่าสีของปลาร้าผงในแต่ละสภาวะ พบว่า ค่าสีแดงของปลาร้าผงสูตรที่ 2, 4 และ 6 มีค่าสูงเพราะเติมข้าวคั่วในระดับร้อยละ 5 การเติมข้าวคั่วจะทำให้โทนสีของปลาร้าผงที่ได้สว่างขึ้น

ตารางที่ 48 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบโดยประมาณ (Proximate Analysis)

| Treatment | ความชื้น             | โปรตีน             | ไขมัน              | เยื่อใย           | เถ้า               | คาร์โบไฮเดรต          |
|-----------|----------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|
| 1         | $6.00 \pm 0.04^C$    | $26.71 \pm 2.02^C$ | $14.20 \pm 2.14^A$ | $5.55 \pm 0.32^B$ | $28.43 \pm 1.45^D$ | $19.20 \pm 1.50^{AB}$ |
| 2         | $5.95 \pm 0.77^C$    | $33.68 \pm 0.91^A$ | $12.64 \pm 0.24^B$ | $3.10 \pm 0.81^B$ | $27.54 \pm 1.50^C$ | $17.09 \pm 0.25^{AB}$ |
| 3         | $7.69 \pm 0.02^A$    | $28.33 \pm 2.87^A$ | $12.28 \pm 1.08^A$ | $6.34 \pm 0.33^A$ | $24.22 \pm 1.07^C$ | $21.12 \pm 0.77^A$    |
| 4         | $6.71 \pm 0.26^{BC}$ | $35.66 \pm 1.05^A$ | $13.68 \pm 2.14^B$ | $3.19 \pm 0.66^B$ | $28.50 \pm 0.28^B$ | $12.23 \pm 0.89^C$    |
| 5         | $6.91 \pm 0.73^{AB}$ | $22.93 \pm 0.78^D$ | $12.07 \pm 0.33^B$ | $6.85 \pm 0.57^A$ | $29.15 \pm 0.31^B$ | $22.07 \pm 0.75^A$    |
| 6         | $6.64 \pm 0.22^{BC}$ | $31.45 \pm 0.31^B$ | $11.83 \pm 0.51^B$ | $3.59 \pm 1.54^B$ | $30.52 \pm 0.51^A$ | $15.97 \pm 0.21^C$    |

(หน่วย ปริมาณ (กรัม)/ 100 กรัมตัวอย่าง)

A, B, C, D อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแนวดิ่งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าคะแนน

ผลของการวิเคราะห์องค์ประกอบโดยประมาณ (Proximate Analysis) แสดงในตารางที่ 48 ค่าความชื้นของผงปลาร้ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 5.95 – 7.69 ซึ่งทุกสภาวะความชื้นเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนปลาร้าผง (มผช. 134/2556 ภาคผนวก ฅ) ที่กำหนดให้ไม่เกินร้อยละ 8 โดยน้ำหนัก

ปริมาณโปรตีนของผงปลาร้ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ซึ่งอยู่ในช่วง 22.93-35.66 ตามเกณฑ์ มผช. ปลาร้าผง ต้องมีโปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก การเติมข้าวคั่วที่ร้อยละ 25 คือ

T1, T3 และ T5 จะทำให้ปริมาณโปรตีนในสูตรต่ำลง โดยเฉพาะ T5 ที่ปริมาณโปรตีนต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนด การเติมข้าวคั่วที่ร้อยละ 5 ปลาธำรงที่ได้มีโปรตีนอยู่ในช่วง 31-35 ซึ่งผ่านเกณฑ์มาตรฐานในทุกสภาวะจึงมีความเหมาะสมมากกว่าที่ร้อยละ 25 ปลาธำรงในการทดลองนี้ได้มาจากน้ำปลาธำรงเข้มข้นที่ผลิตจากเนื้อปลาล้วนๆ จึงเป็นแหล่งที่ดีของโปรตีน

ปริมาณไขมันของผงปลาร้ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ซึ่งอยู่ในช่วง ร้อยละ 11.83-14.20 ปริมาณไขมันมีผลต่ออายุการเก็บรักษา ถ้าปริมาณไขมันสูงส่งผลให้เกิดการหืนได้ง่ายกว่า ปลาที่ใช้ในการผลิตปลาร้าคือปลาสวายและปลาทู

ปริมาณเยื่อใยของผงปลาร้ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ซึ่งอยู่ในช่วง ร้อยละ 3.10-6.85 การเติมข้าวคั่วทำให้ปริมาณเยื่อใยเพิ่มมากขึ้น เพราะในองค์ประกอบของข้าวมีใยอาหาร

ปริมาณเถ้าของผงปลาร้ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ซึ่งอยู่ในช่วงร้อยละ 24.22-30.52 เถ้าในปริมาณสูงในปลาร้าผง มาจากก้างปลาร้าที่เปื่อยจากกระบวนการหมักและจากความร้อน จึงทำให้ปริมาณเถ้ามีค่อนข้างสูง

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตของผงปลาร้ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ซึ่งอยู่ในช่วงร้อยละ 12.23-22.07 การเติมข้าวคั่วทำให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในสูตรอยู่ในช่วงร้อยละ 19-22 และสูตรที่ไม่เติมข้าวคั่วมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตในช่วง 12-17

#### ตารางที่ 49 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของปลาร้าผงสภาวะต่างๆ

| Treatment | $a_w^{ns}$ | pH                      | NaCl<br>(g/kg)          |
|-----------|------------|-------------------------|-------------------------|
| 1         | 0.47 ±0.01 | 5.72±0.03 <sup>A</sup>  | 37.51±2.24 <sup>B</sup> |
| 2         | 0.36 ±0.00 | 5.18±0.02 <sup>C</sup>  | 50.00±2.23 <sup>A</sup> |
| 3         | 0.56±0.01  | 5.55±0.26 <sup>AB</sup> | 31.85±1.50 <sup>B</sup> |
| 4         | 0.53±0.00  | 5.57±0.03 <sup>AB</sup> | 49.50±2.60 <sup>A</sup> |
| 5         | 0.52±0.01  | 5.42±0.03 <sup>AB</sup> | 32.40±1.02 <sup>B</sup> |
| 6         | 0.53±0.01  | 5.18±0.61 <sup>C</sup>  | 48.25±1.31 <sup>A</sup> |

ns หมายถึง ค่าคะแนนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

A, B, C อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าคะแนน

ตารางที่ 50 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) และยีสต์ ราในปลาร้าผง

| Treatment | จุลินทรีย์ทั้งหมด (TPC)<br>(CFU/g) | ยีสต์ / รา<br>(CFU/g) |
|-----------|------------------------------------|-----------------------|
| 1         | $3.30 \times 10^3$                 | $2.50 \times 10^2$    |
| 2         | $8.27 \times 10^3$                 | $8.6 \times 10^1$     |
| 3         | $7.23 \times 10^3$                 | $5.00 \times 10^2$    |
| 4         | $2.25 \times 10^3$                 | $1.50 \times 10^1$    |
| 5         | $1.73 \times 10^3$                 | $9.66 \times 10^2$    |
| 6         | $8.33 \times 10^3$                 | $6.50 \times 10^2$    |

การเติมข้าวคั่วที่ร้อยละ 25 ทำให้ตัวอย่างปลาร้าได้รับความร้อนที่ส่งผ่านเข้าไปได้น้อยกว่าการเติมข้าวคั่วที่ร้อยละ 5 ทำให้พบปริมาณยีสต์และราเกินมาตรฐานที่กำหนด ตามมาตรฐาน มพช. 134/2546 มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนปลาร้าผง กำหนดจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน 10,000 โคโลนี ต่อตัวอย่าง 1 กรัม และราต้องไม่เกิน 200 โคโลนี ต่อตัวอย่าง 1 กรัม ซึ่งทุกสภาวะปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดผ่านเกณฑ์มาตรฐาน แต่ด้านเชื้อรา มีเฉพาะสภาวะที่ 2 และ 4 ที่พบต่ำกว่า 200 โคโลนี จึงคัดเลือกปลาร้าผงในสภาวะที่ 2 และ 4 ไปทำการทดลองทางประสาทสัมผัสในการเป็นส่วนประกอบของอาหารต่อไปในตอนที่ 3

ตารางที่ 51 ผลคะแนนความชอบของตัวอย่างปลาร้า 9 point hedonic scale

| Treatment | ลักษณะปรากฏ       | สี                   | กลิ่น                | รสชาติ <sup>ns</sup> | ความชอบโดยรวม <sup>ns</sup> |
|-----------|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------|
| 1         | $6.94 \pm 1.21^B$ | $6.68 \pm 0.25^{AB}$ | $5.71 \pm 0.47^B$    | $6.34 \pm 1.26$      | $6.71 \pm 0.23$             |
| 2         | $6.74 \pm 1.05^B$ | $6.31 \pm 0.21^C$    | $6.77 \pm 0.33^A$    | $6.82 \pm 0.68$      | $6.94 \pm 1.25$             |
| 3         | $6.91 \pm 0.98^B$ | $6.97 \pm 0.72^A$    | $6.68 \pm 1.16^A$    | $6.85 \pm 0.36$      | $6.94 \pm 1.16$             |
| 4         | $7.31 \pm 0.79^A$ | $7.02 \pm 0.71^A$    | $6.77 \pm 0.08^A$    | $6.65 \pm 1.69$      | $6.91 \pm 1.00$             |
| 5         | $6.71 \pm 1.14^A$ | $6.68 \pm 1.44^{AB}$ | $6.25 \pm 1.02^{AB}$ | $6.45 \pm 1.90$      | $6.74 \pm 0.36$             |
| 6         | $7.08 \pm 1.44^A$ | $7.00 \pm 1.25^A$    | $6.45 \pm 1.47^A$    | $6.57 \pm 0.95$      | $6.74 \pm 0.47$             |

หมายเหตุ N=35 คน ns หมายถึง ค่าคะแนนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

A, B, C อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าคะแนน

การคัดเลือกสูตรทั้ง 6 สภาวะ พบว่าคะแนนความชอบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p \leq 0.05$  โดยปลาร้าผงในสภาวะ T4 ได้คะแนนความชอบมากที่สุดเมื่อเทียบกับทุกสภาวะ ได้คะแนนประมาณ 7 คือความชอบปานกลาง ทั้งด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น ส่วนด้านรสชาติและความชอบโดยรวมไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ



จากเกณฑ์การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสตามมาตรฐาน มพช. ปลาร้า ระบุว่า ลักษณะทั่วไปของ ปลาร้าผง ต้องมีลักษณะเป็นผงแห้ง เป็นเนื้อเดียวกันและไม่จับตัวเป็นก้อน สีต้องมีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลแก่ ไม่มีสีน้ำตาลดำคล้ำ กลิ่นต้องมีกลิ่นหอมของปลาร้า ไม่มีกลิ่นคาว กลิ่นไหม้ กลิ่นหืนหรือกลิ่นอับ และด้านรสชาติ ต้องมีรส เค็มกลมกล่อมตามรสชาติของปลาร้า

สรุปปลาร้าผงที่ผ่านการคัดเลือก ที่เป็นไปตามเกณฑ์ มพช. คือ ปลาร้าที่หมักด้วยกล่ำเชื้อ (P2) นำมาผลิต ปลาร้าเข้มข้นโดยการเติมน้ำคั่วที่ร้อยละ 5 คือปลาร้าผงในสูตรที่ 4 โดยสูตรนี้เป็นสูตรที่ได้รับคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสมากที่สุด โดยมีร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 33.90 ปลาร้าผงที่ได้มีองค์ประกอบ ดังนี้ความชื้นร้อยละ 6.71 โปรตีนร้อยละ 35.66 ไขมันร้อยละ 13.68 เยื่อใยร้อยละ 3.19 เกลือร้อยละ 28.5 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 12.23  $a_w$  0.53 pH 5.57 จุลินทรีย์ทั้งหมด  $2 \times 10^3$  และยีสต์รา 150 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม ซึ่งผ่านเกณฑ์มาตรฐาน มพช. ปลาร้าผง (134/2546)

การทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคเมื่อใช้ปลาร้าเป็นส่วนประกอบอาหาร แสดงผลการทดลองในหัวข้อ 2.5.2 การทดสอบคุณภาพปลาร้าหมักจากกล่ำเชื้อแบบ SMF

### การคำนวณต้นทุนการผลิตปลาร้าผง

#### ตารางที่ 52 ต้นทุนการผลิตปลาร้าผง

| สถานะ     | ต้นทุน (บาท; ต่อการบรรจุถุง 30 กรัม) |        |            |             | รวม<br>(บาท) |
|-----------|--------------------------------------|--------|------------|-------------|--------------|
|           | ค่าวัตถุดิบ                          | ค่าแรง | บรรจุภัณฑ์ | Overhead30% |              |
| ชุดควบคุม | 11.53                                | 11.25  | 9          | 9.30        | 40.55        |
| หัวเชื้อ  | 9.56                                 | 11.25  | 9          | 8.90        | 38.71        |

### การคำนวณ

#### 1. ต้นทุนวัตถุดิบ

1.1 ชุดควบคุม : ปลาร้า 10 กิโลกรัม ราคา 500 บาท

ปลาร้า 10 กิโลกรัม ผลิตปลาร้าผงได้ 1.3 กิโลกรัม ต้นทุนวัตถุดิบ 500 บาท

ถ้าปลาร้าผง 30 กรัม คิดเป็นต้นทุนปลาร้า  $(500/1300) \times 30 = 11.53$  บาท

1.2 ชุดเติมหัวเชื้อ : ปลาร้า 10 กิโลกรัม ราคา 510 บาท

ปลาร้า 10 กิโลกรัม ผลิตปลาร้าผงได้ 1.6 กิโลกรัม ต้นทุนวัตถุดิบ 510 บาท

ถ้าปลาร้าผง 30 กรัม คิดเป็นต้นทุนปลาร้า  $(510/1600)*30 = 9.56$  บาท

## 2. ต้นทุนค่าแรง

ค่าแรง 8 ชั่วโมง แรงงาน 2 คน คิดเป็น  $300*2 = 600$  บาท

ใน 8 ชั่วโมงผลิตปลาร้าผงได้ประมาณ 1.6 กิโลกรัม

ค่าแรงเฉลี่ยในการผลิตผงปลาร้าจำนวน 30 กรัม เท่ากับ 11.25 บาท

## 3. บรรจุภัณฑ์

3.1 ถุงอลูมิเนียมฟอยล์ 4 บาท

3.2 สติกเกอร์ 4 บาท

3.3 oxygen absorber 1 บาท

รวม 9 บาท

## 4. Overhead คำนวณร้อยละ 30 ของต้นทุน 1-3

### 2.6.2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาร้าฟูทรงเครื่องจากปลาร้าหมักแบบ SSF แบบทั่วไปที่หมักด้วยกล้าเชื้อ

ขั้นตอนการผลิตปลาร้าฟูทรงเครื่อง และการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคเมื่อใช้ปลาร้ากล้าเชื้อ และปลาร้ามาตรฐาน(แม่ดัย) เป็นส่วนผสมหลักในการทำปลาร้าฟูทรงเครื่อง มีผลการศึกษาดังนี้

## วิธีทำปลาร้าพุทธรังเครื่อง



ล้างปลาร้าปลานิลให้สะอาดแล้วนำไปนึ่ง 15 นาที



แกะเอาเฉพาะส่วนของเนื้อปลาร้าไปอบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที



สับด้วยเครื่องบดสับอาหารจนได้เนื้อปลาร้าที่ขึ้นฟู







นำปลาร้าพามาผัดในกระทะ ปรงรสด้วยน้ำตาลทราย และน้ำมะขามเปียก



ใส่พริกป่น หอมเจียว กระเทียมเจียว ข่าทอด ตะไคร้ทอด และใบมะกรูดทอดลงไปคลุกเคล้าให้เข้ากัน



บรรจุปลาร้าฟูทรงเครื่องลงในบรรจุภัณฑ์

เมื่อนำปลาร้าฟูทรงเครื่องมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้นและค่า Water activity พบว่า ผลิตภัณฑ์มีความชื้น 2.08 % และมีค่า Water activity เท่ากับ 0.32 และเมื่อนำผลิตภัณฑ์มาวิเคราะห์องค์ประกอบ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 53

**ตารางที่ 53** องค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ปลาร้าฟูทรงเครื่อง 100 กรัม

| องค์ประกอบ         | ปริมาณ (กรัม)/ 100 กรัมตัวอย่าง |
|--------------------|---------------------------------|
| Carbohydrate       | 39.2                            |
| Moisture           | 4.52                            |
| Ash                | 11.17                           |
| Total Fat          | 17.20                           |
| Protein (N x 6.25) | 27.91                           |

การทดลองผู้ทำวิจัยได้นำปลาร้าสูตรควบคุม(หมักโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ) ปลาร้าที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ และปลาร้าสูตรมาตรฐาน(ปลาร้าแม่ตุ๋นทำตุ๋ม) มาเป็นส่วนผสมหลักของปลาร้าบองของผู้บริโภค เพื่อนำมาทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ชิม 30 คน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 54-55 และภาพที่ 36ก, 36ข, 37ก และ 37ข

**ตารางที่ 54** ค่าคะแนนการยอมรับต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ปลาร้าฟูทรงเครื่อง

| Treatment                  | สี                       | กลิ่น                    | รสชาติ                   | เนื้อสัมผัส              | ความชอบโดยรวม            |
|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| ปลาร้ากล้าเชื้อ            | 7.53 <sup>A</sup> ± 0.86 | 7.26 <sup>A</sup> ± 0.91 | 7.17 <sup>A</sup> ± 1.02 | 6.57 <sup>A</sup> ± 1.14 | 7.46 <sup>A</sup> ± 0.97 |
| ปลาร้ามาตรฐาน<br>(แม่ตุ๋น) | 4.57 <sup>B</sup> ± 1.77 | 4.30 <sup>B</sup> ± 1.80 | 4.90 <sup>B</sup> ± 1.95 | 5.50 <sup>B</sup> ± 1.61 | 5.67 <sup>B</sup> ± 1.56 |

คะแนนในตารางคือ 9-point hedonic scale; 1 = ไม่ชอบมากที่สุด, 9 = ชอบมากที่สุด (N = 30)

A, B, C อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าคะแนน

การศึกษาความชอบของปลาร้าฟูทรงเครื่องที่ปรุงด้วยปลาร้าต่างกัน พบว่าผู้ประเมินจำนวน 30 คน ให้คะแนนความชอบปลาร้าฟูทรงเครื่องสูตรกล้าเชื้อ และสูตรมาตรฐาน(แม่ตุ๋น) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) ในทุกด้าน โดยได้รับคะแนนในด้านสี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวมระดับชอบปานกลาง ส่วนด้านเนื้อสัมผัสได้รับคะแนนระดับชอบเล็กน้อย



ภาพที่ 36ก ปลา ร้าฟูทรงเครื่องสูตรกล้าเชื้อ



ภาพที่ 36ข ปลา ร้าฟูทรงเครื่องสูตรมาตรฐาน



ภาพที่ 37ก เนื้อปลาร้าหนึ่งสูตรกล้าเชื้อ



ภาพที่ 37ข เนื้อปลาร้าหนึ่งสูตรมาตรฐาน

ตารางที่ 55 จำนวนผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัสที่ให้การยอมรับปลา ร้าฟูทรงเครื่อง

| Treatment              | การยอมรับ |           |
|------------------------|-----------|-----------|
|                        | ยอมรับ    | ไม่ยอมรับ |
| ปลาร้ากล้าเชื้อ        | 30        | -         |
| ปลาร้ามาตรฐาน(แม่ตุ๋น) | 23        | 7         |

N=30 คน

จากตารางที่ 55 แสดงผลการยอมรับปลา ร้าฟูทรงเครื่องสูตรต่างๆ จำนวนผู้ทดสอบ 30 คน จากตาราง Minimal numbers of correct judgments แบบ two tailed ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ระบุว่า ถ้ามีคนตอบให้การยอมรับมากกว่า 21 คนจากจำนวนผู้ทดสอบ 30 คน แสดงว่าผู้ทดสอบให้การยอมรับตัวอย่างในทุกชุดการทดลอง เมื่อพิจารณาจากจำนวนผู้ให้การยอมรับ จึงถือว่าปลา ร้าฟูทรงเครื่องได้รับการยอมรับผู้ทดสอบทั้งสองสูตร โดยปลา ร้าฟูจากปลาร้ามาตรฐานได้รับการยอมรับจากผู้ทดสอบ 23 คน และพบว่าปลา ร้าฟูจากปลาร้าที่หมักจากกล้าเชื้อได้รับ

คะแนนการยอมรับมากกว่าสูตรสูตรปลาที่หมักแบบมาตรฐาน(แม่ตุ๋น)ที่หมักเป็นเวลา 12 เดือน อย่างมีนัยสำคัญ โดยผู้ทดสอบให้การยอมรับในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวทั้ง 30 คน

เมื่อพิจารณาผลการยอมรับผลิตภัณฑ์ร่วมกับคะแนนการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสในแต่ละด้านร่วมกัน พบว่า ปลาที่ปรุงเครื่องสูตรเกลือได้รับคะแนนการยอมรับในด้านสีสูงกว่าเนื่องจากมีสีน้ำตาลอ่อน น่ารับประทานเพราะทำจากปลาที่มีสีส้มอมชมพู (ภาพที่ 36ก และ 37ก) ส่วนปลาที่ปรุงเครื่องสูตรมาตรฐานมีสีน้ำตาลเข้มจนเกือบดำ ดูไม่น่ารับประทานเพราะทำจากปลาที่มีสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 36ข และ 37ข) ในด้านกลิ่น ปลาที่ปรุงเครื่องสูตรเกลือได้รับคะแนนสูงกว่าเพราะมีกลิ่นหอมของปลาที่พอเหมาะไม่มีกลิ่นปลาแรงมากเหมือนปลาที่ปรุงเครื่องสูตรมาตรฐาน ในด้านรสชาติ ปลาที่ปรุงเครื่องสูตรเกลือได้รับคะแนนสูงกว่าเพราะเนื้อปลามีความเค็มไม่มากนักเมื่อนำมาทำปลาที่ปรุงเครื่องจึงมีความเค็มพอเหมาะ ขณะที่ปลาที่ปรุงเครื่องสูตรมาตรฐานมีรสชาติเค็มมากเกินไป ในด้านเนื้อสัมผัส ปลาที่ปรุงเครื่องสูตรเกลือได้รับคะแนนสูงกว่าเพราะปลาที่เกลือที่นำมาทำนั้นผ่านการหมักเพียง 5 เดือน เส้นใยโปรตีนในเนื้อปลาจึงถูกย่อยไปบางส่วนทำให้เมื่อเนื้อปลาทำปลาที่ปรุงเครื่องจะยังคงมีเส้นใยยาว ร่วนซุย ในขณะที่ปลาที่สูตรมาตรฐานที่หมัก 12 เดือน โปรตีนในเนื้อปลาถูกย่อยมากกว่า นำมาทำปลาที่ปรุงเนื้อปลาจะป็นเนื้อติดกันเป็นก้อน และเมื่อทำปลาที่ปรุงเครื่องจึงเกาะกันเป็นก้อนใหญ่ๆ ดูไม่น่ารับประทาน

### การคำนวณต้นทุนการผลิตปลาที่ปรุงเครื่อง

ตารางที่ 56 ต้นทุนการผลิตปลาที่ปรุงเครื่อง

| Treatment            | ต้นทุน บาท/การบรรจุ 80 กรัม |                 |                              | รวม<br>(บาท) |
|----------------------|-----------------------------|-----------------|------------------------------|--------------|
|                      | ค่าวัตถุดิบ<br>(บาท)        | ค่าแรง<br>(บาท) | ค่าใช้จ่ายในการผลิต<br>(บาท) |              |
| สูตรเกลือ            | 18.90                       | 4.8             | 7.11                         | 30.80        |
| สูตรมาตรฐาน(แม่ตุ๋น) | 24.91                       | 4.8             | 8.91                         | 38.62        |

## 1. ต้นทุนวัตถุดิบ

ปลาข้าวฟ่างเครื่องสูตรกล้าเชื้อ

ตารางที่ 57 ต้นทุนวัตถุดิบในการผลิตปลาข้าวฟ่างเครื่องสูตรกล้าเชื้อ

| วัตถุดิบ                        | ราคาต่อหน่วย<br>(บาท/1 กิโลกรัม) | ปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ในการทำ<br>ปลาข้าวฟ่างเครื่องปริมาณ<br>1 กิโลกรัม<br>(กรัม) | ราคา<br>(บาท) |
|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| ปลาร้า                          | 55                               | 1670                                                                            | 91.85         |
| น้ำตาลทราย                      | 27                               | 250                                                                             | 6.75          |
| หอมแดง                          | 35                               | 230                                                                             | 8.05          |
| กระเทียม                        | 65                               | 136                                                                             | 8.84          |
| ข่า                             | 60                               | 75                                                                              | 4.50          |
| ตะไคร้                          | 110                              | 25                                                                              | 2.75          |
| ใบมะกรูด                        | 50                               | 12                                                                              | 0.60          |
| มะขามเปียก                      | 110                              | 20                                                                              | 2.20          |
| พริกแห้ง                        | 70                               | 10                                                                              | 0.70          |
| น้ำมันพืช(สำหรับ<br>ทอดสมุนไพร) | 55                               | 2000                                                                            | 110           |
| รวมทั้งสิ้น                     |                                  |                                                                                 | 236.24        |

ปลาข้าวฟ่างเครื่องสูตรกล้าเชื้อบรรจุปริมาตรสุทธิ 80 กรัม

$$\text{ดังนั้นต้นทุนต่อหน่วยบรรจุเท่ากับ } \frac{236.24 \times 80}{1000} = 18.90 \text{ บาท}$$



ปลาร้าฟูทรงเครื่องสูตรมาตรฐาน

ตารางที่ 58 ต้นทุนวัตถุดิบในการผลิตปลาร้าฟูทรงเครื่องสูตรมาตรฐาน

| วัตถุดิบ                        | ราคาต่อหน่วย<br>(บาท/1 กิโลกรัม) | ปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ในการทำ<br>ปลาร้าฟูทรงเครื่องปริมาณ<br>1 กิโลกรัม<br>(กรัม) | ราคา<br>(บาท) |
|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| ปลาร้า                          | 100                              | 1670                                                                            | 167.00        |
| น้ำตาลทราย                      | 27                               | 250                                                                             | 6.75          |
| หอมแดง                          | 35                               | 230                                                                             | 8.05          |
| กระเทียม                        | 65                               | 136                                                                             | 8.84          |
| ข่า                             | 60                               | 75                                                                              | 4.50          |
| ตะไคร้                          | 110                              | 25                                                                              | 2.75          |
| ใบมะกรูด                        | 50                               | 12                                                                              | 0.60          |
| มะขามเปียก                      | 110                              | 20                                                                              | 2.20          |
| พริกแห้ง                        | 70                               | 10                                                                              | 0.70          |
| น้ำมันพืช<br>(สำหรับทอดสมุนไพร) | 55                               | 2000                                                                            | 110           |
| รวมทั้งสิ้น                     |                                  |                                                                                 | 311.39        |

ปลาร้าฟูทรงเครื่องสูตรกล้าเชื้อบรรจุปริมาตรสุทธิ 80 กรัม

$$\text{ดังนั้นต้นทุนต่อหน่วยบรรจุเท่ากับ } \frac{311.39 \times 80}{1000} = 24.91 \text{ บาท}$$

## 2. ต้นทุนค่าแรง

การผลิตปลาร้าฟูทรงเครื่อง 10 กิโลกรัม/วัน ต้องใช้แรงงาน 2 คน ซึ่งจ้างโดยค่าแรงขั้นต่ำ 300 บาท/วัน

ในการผลิตปลาร้าฟู 10 กิโลกรัม/วัน มีต้นทุนค่าแรงเท่ากับ 600 บาท

ดังนั้นในการผลิตปลาร้าฟู 0.08 กิโลกรัม/วัน มีต้นทุนค่าแรงเท่ากับ  $\frac{600}{10} \times 0.08$  บาท

10

= 4.8 บาท/หน่วยบรรจุ

## 3. ค่าใช้จ่ายในการผลิต (manufacturing overhead)

คิดค่าใช้จ่ายในการผลิต 30% จากต้นทุนวัตถุดิบ และต้นทุนค่าแรง

ในการผลิตปลาร้าฟูทรงเครื่อง 1 หน่วยบรรจุ มีค่าใช้จ่ายในการผลิต =  $\frac{30 \times (18.9 + 4.8)}{100}$

100

= 7.83 บาท/หน่วยบรรจุ

สัญญาเลขที่ RDG RDG5950116

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การพัฒนากระบวนการผลิตปลาร้าเพื่อเพิ่มอัตราการผลิตและสร้างอัตลักษณ์ของผลิตภัณฑ์

### สรุปรายงานฉบับสมบูรณ์

ตาราง เปรียบเทียบผลผลิต (Output) ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ดำเนินการได้จริงในรอบ 12 เดือน

| ผลผลิต (Output)                                                                                                                  |                 | ในกรณีล่าช้า (ผลสำเร็จไม่ถึง 100%) ให้ท่าน<br>ระบุสาเหตุและการแก้ไขที่ท่านดำเนินการ |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ/หรือจากการ<br>ปรับเปลี่ยน                                                                                | ผลสำเร็จ<br>(%) |                                                                                     |
| 1. สำรวจข้อมูลการผลิตปลาร้าและการเก็บ<br>ตัวอย่าง และศึกษาอัตลักษณ์ของปลาร้า                                                     | 100%            |                                                                                     |
| 2. ศึกษารูปแบบการหมักและจุลินทรีย์ที่<br>เกี่ยวข้องกับการ หมักปลาร้าเพื่อการ<br>พัฒนาเทคโนโลยีการผลิตโดยการเร่ง<br>กระบวนการหมัก | 100%            |                                                                                     |
| 3. พัฒนากล้าเชื้อปลาร้าเพื่อใช้เร่ง<br>กระบวนการหมัก                                                                             | 100%            |                                                                                     |
| 4. การพัฒนาผลิตภัณฑ์รูปแบบใหม่จากปลา<br>ร้าที่ได้จากการหมักด้วยกล้าเชื้อ                                                         | 100%            |                                                                                     |

ลงนาม

รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา  
(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

วันที่ 2 พ.ค. 2560

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่นๆ ต่อ สกว.

ไม่มี

### เอกสารอ้างอิง

- ศูนย์วิจัยกสิกรไทย. ผลิตภัณฑ์ปลาร้า : ธุรกิจเล็กพริกขี้หนู...ส่งออกปีละกว่า 20 ล้านบาท [ระบบออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.positioningmag.com/content/> (เข้าถึงเมื่อ 26 ตุลาคม 2558)
- นันทา เป็งเนตร์. 2549. การพัฒนาน้ำปลาร้าปรุงรสบรรจุภาชนะปิดสนิท. รายงานการวิจัยราชภัฏ-อุดรธานี. มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี, อุดรธานี.
- Beddow, C.G. & Arseshir, A.G. 1979. The production of soluble fish protein solution for use in fish sauce manufacture II. The use of acid at ambient temperature. *International Journal of Food Science & Technology*, 14, 612-623.
- Degre, R. 1993. Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. In: G. H. Fleet (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology* (pp. 421-448). Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers.
- Chanprasartsuk, O & Prakitchaiwattana, C. 2015. Impacts of Allochthonous and Autochthonous Yeast Starters: Case Studies in Fruit Wine Fermentations In : *Food Microbiology: Fundamentals, Challenges and Health Implications*. Elaine Perkins (Ed.) ISBN: 978-1-63483-412-4 ©Nova Publisher, Inc. Hauppauge, New York. 117-159.
- Cubero-Leon, E., Peñalver, R., & Maquet, A., 2014. Review on metabolomics for food authentication. *Food Research International*, 60, 95-107.
- Fleet, G. H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 11-12.
- Gildberg, A. 2002. Enhancing returns from greater underutilization. P. 425-450. In: H.A. Bremner. *Safety and Quality Issues in Fish Processing*, Woodhead Publishing, New York.
- Herbert, S., Bleibaum, R.N. and Heather, A. T. 2012. Sensory Evaluation practice, 4th edition Academic Press ELSEVIER.
- Hui, Y. H., L. M. Goddik, A. S. Hansen, J. Josephsen, W. K. Nip, P. S. Stanfield, & F. Toldra. 2004 *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*, New York: Marcel Dekker. 919 p.

- Ibáñez, E. & Cifuentes, A., 2014. Foodomics: Food science and nutrition in the postgenomic era, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 64, 395-440.
- Juthong, T. Chooral., W., Prasertsan., P. & Suntinalert, P. 2000. Screening and charaterisation of protease from halophillic bacterium. The 12<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. "Biotechnology": Impact and Trends.
- Kim, M.S. & Park, E.J. 2014. Predominance and Metabolic Potential of *Halanaerobium* spp. in Produced Water from Hydraulically Fractured Marcellus Shale Wells. *Journal of Food Science*, 79(5), 927-934.
- Lipus, D., Vikram, A., Ross, D., Bain, D., Gulliver, D., Hammack, R. & Bibby, K. 2017. Predominance and metabolic potential of *Halanaerobium* spp. in produced water from hydraulically fractured Marcellus Shale wells. *Applied and Environmental Microbiology*, 83, 815 e02659-16.
- Machida, M., K. Asai, M. Sano, T. Tanaka, T. Kumagai, G. Terai, K. I. Kusumoto, T. Arima, O. Akita, Y. Kashiwagi, K. Abe, K. Gomi, H. Horiuchi, K. Kitamoto, T. Kobayashi, M. Takeuchi, D. W. Denning, J. E. Galagan, W. C. Nierman, J. Yu, D. B. Archer, J. W. Bennett, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, N. D. Fedorova, O. Gotoh, H. Horikawa, A. Hosoyama, M. Ichinomiya, R. Igarashi, K. Iwashita, P. R. Juvvadi, M. Kato, Y. Kato, T. Kin, A. Kokubun, H. Maeda, N. Maeyama, J. Maruyama, H. Nagasaki, T. Nakajima, K. Oda, K. Okada, I. Paulsen, K. Sakamoto, T. Sawano, M. Takahashi, K. Takase, Y. Terabayashi, J. R. Wortman, O. Yamada, Y. Yamagata, H. Anazawa, Y. Hata, Y. Koide, T. Komori, Y. Koyama, T. Minetoki, S. Suharnan, A. Tanaka, K. Isono, S. Kuhara, N. Ogasawara, and H. Kikuchi. 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 43, 1157-1161.
- Murakami, H. 1971. Classification of the koji mold. *Journal of General and Applied Microbiology*, 17, 281-309.

- Mozzi, F., Ortiz, M.E., Bleckwedel, J., De Vuyst, L., & Pescuma, M., 2013. Metabolomics as a tool for the comprehensive understanding of fermented and functional foods with lactic acid bacteria. *Food Research International*, 54, 1152-1161.
- Namwong, S., Tanasupawat, S., Smitinont, T., Visessanguan, W., Kudo, T. & Itoh, T. 2005. Isolation of *Lentibacillus salicampi* strains and *Lentibacillus juripiscarius* sp. nov. from fish sauce in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 315-320.
- Narahara, H., Y. Koyama, T. Yoshida, S. Pichangkura, R. Ueda, & H. Taguchi. 1982. Growth and enzyme production in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *Fermentation Technology*, 60, 311-319.
- Sánchez-Porro, C., Mellado, E., Bertoldo, C., Antranikian, G. & Ventosa, A. 2003. Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudalteromonas* sp. strain CP76. *Extremophiles*, 7, 221-228.
- Settachaimongkon, S., Nout, M. J. R., Antunes Fernandes, E.C., van Hooijdonk, A.C.M., Zwietering, M.H., Smid, E.J., & van Valenberg, H.J.F., 2014b. The impact of selected strains of probiotic bacteria on metabolite formation in set-yoghurt. *International Dairy Journal*, 38, 1-10.
- Settachaimongkon S., Nout M.J.R., Antunes Fernandes E.C., Hettinga K.A., Vervoort J.M., van Hooijdonk T.C.M., Zwietering M.H., Smid E.J., & van Valenberg H.J.F., 2014a. Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the metabolite profile of set-yoghurt. *International Journal of Food Microbiology* 177, 29-36.
- Settachaimongkon S., van Valenberg H.J.F., Winata V., Wang X., Nout M.J.R., van Hooijdonk A.C.M., Zwietering M.H., & Smid, E.J., 2015. Effect of sublethal preculturing on the survival of probiotics and metabolite formation in set-yoghurt. *Food Microbiology*, 49, 104-115.
- Skov, T., Honoré, A.H., Jensen, H.M., Næs, T., & Engelsen, S.B., 2014. Chemometrics in foodomics: Handling data structures from multiple analytical platforms. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 60, 71-79.

- Tanasupawat, S., Shido, O., Okada, S. & Komogata 2000. *Lactobacillus acidipiscis* and *Weissella thailandensis* isolated from fermented fish in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1472-1485.
- Tattersson, I. N. & Windsor, M. L. 2010. Fish silage. Available from <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5937e/x5937e00.htm>. Accessed August, 15 2010.
- Ventosa, A., Nieto, J.N. & OREN, A. 1998. Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 504-544.

# ภาคผนวก



## ภาคผนวก ก1

## การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของปลาร้า

## 1. Proximate analysis (AOAC, 2000)

โดยการวิเคราะห์หาความชื้น เถ้า คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และ โปรตีน

## 1.1 การวิเคราะห์ความชื้น

นำครุชีเบลเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2-3 นาที่ แล้วนำครุชีเบลที่อบแห้งแล้ว ใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น ชั่ง บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนไว้ ชั่งตัวอย่างอาหารใส่ครุชีเบล ให้ได้น้ำหนักประมาณ 1-2 กรัม นำตัวอย่างอาหารเข้าตู้อบ อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง นำตัวอย่างอาหารที่อบแล้ว ใส่โถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนัก บันทึกน้ำหนัก จากนั้นนำเข้าตู้อบอีกครั้งจนได้เวลาตามต้องการ ใส่โถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงนำมาชั่ง ทำซ้ำจนกระทั่งได้ค่าน้ำหนักคงที่ คำนวณค่าความชื้นตามสมการข้างล่าง

$$\% \text{ความชื้น} = (a-b) \times 100w$$

เมื่อ  $a$  = น้ำหนักของอาหารก่อนอบแห้ง

$b$  = น้ำหนักของอาหารหลังอบแห้ง

$w$  = น้ำหนักของอาหารก่อนอบแห้ง

หรือ  $\%$  ของวัตถุแห้ง (DM) =  $100 - \% \text{ความชื้น}$

## 1.2 การวิเคราะห์เยื่อใย

อบถ้วยกระเบื้องเคลือบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5-6 ชั่วโมงแล้ว นำมาใส่โถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนัก บันทึกไว้ ชั่งตัวอย่างอาหารประมาณ 2 กรัมใส่ถ้วยกระเบื้องเคลือบที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้วนำไป เเผาในตู้คว้นจนหมดควัน และเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนเถ้าเป็นสีขาว นำเข้าโถอบแห้ง เมื่อตัวอย่างอาหารเย็นแล้ว นำออกมาชั่ง บันทึกผล

$$\% \text{เถ้า} = (b-a) \times 100 w$$

เมื่อ  $a$  = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบ

$b$  = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของเถ้าภายหลังการเผา

$w$  = น้ำหนักของอาหารก่อนเผา

### 1.3 การวิเคราะห์ไขมัน

อบปีกเกอร์สำหรับหาไขมัน ในตูบไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นใน โถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก ถ้าตัวอย่างมีไขมันมาก ให้ชั่ง 1-2 กรัม ถ้าตัวอย่างมีไขมันน้อย ให้ชั่ง 3-5 กรัม ห่อให้มิดชิด แล้วใส่ในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง (Thimble) คลุมด้วย สำลีเพื่อให้ตัวทำละลายมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ นำหลอดใส่ตัวอย่างใส่ในปีกเกอร์ เติมตัวทำละลาย (ปิโตรเลียม อีเทอร์) ในปีกเกอร์ประมาณ 150 มิลลิลิตร หรือจนท่วม ตัวอย่าง ประกอบชุดสกัดไขมัน พร้อมทั้งเปิดน้ำ เย็นหล่ออุปกรณ์ควบแน่น เปิดเครื่องปั่นลม และเปิด เครื่องควบคุมความร้อน ใช้เวลาในการสกัดไขมัน ประมาณ 1 ชั่วโมง (ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ ชนิด และปริมาณ ไขมันใน ตัวอย่าง) ล้าง (Rinse) โดยปรับปุ่มที่ด้านข้าง(ขวามือ) ให้อยู่ใน ตำแหน่ง Recovery จนตัวทำละลายลดต่ำกว่าตัวอย่าง แล้วปรับปุ่มที่ด้านข้างมาที่ตำแหน่ง Circulation นาน 30 นาที ระเหยตัวทำละลายออก โดยปรับปุ่มที่ด้านข้างให้อยู่ในตำแหน่ง Recovery จนตัวทำละลายระเหยหมด นำปีกเกอร์มาอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาทีทิ้งให้เย็นใน โถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักปีกเกอร์ แล้วอบ นาน 30 นาทีจนกระทั่งผลต่างของน้ำหนัก 2 ครั้งติดกัน ไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

$$\% \text{ ไขมัน} = \text{น้ำหนักไขมันหลังอบ} \times 100 \text{ น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}$$

$$\text{หรือ } \% \text{ ไขมัน} = b-a \times 100 w$$

เมื่อ  $a =$  น้ำหนักปีกเกอร์

$b =$  น้ำหนักปีกเกอร์รวมไขมัน

$w =$  น้ำหนักตัวอย่าง

### 1.4 การวิเคราะห์โปรตีน (โดยวิธีของ Kjeldahl)

ชั่งตัวอย่างอาหารให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.1 กรัม (ถ้าตัวอย่างมีโปรตีนน้อย ให้ใช้ตัวอย่างปริมาณมากขึ้น) โดยชั่งด้วยกระดาษกรองที่ไม่มีสารไนโตรเจน (ใช้กระดาษกรอง Whatman 541) ห่อให้มิดชิดแล้วใส่ในหลอดย่อย โปรตีน หาปริมาณไนโตรเจน ตามขั้นตอนดังนี้

- ขั้นตอนการย่อย (digestion)

เติมสารเร่งรวม 5 กรัม เพื่อเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อย แล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มล. (ถ้าใช้ ตัวอย่างมากกว่า 2 กรัมขึ้นไป ให้เพิ่มกรดซัลฟูริกเข้มข้นอีก โดยเพิ่ม 10 มล. ต่อ กรัมของตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น) นำไปต้ม บนเครื่องย่อย โดยในครั้งแรกให้ใช้ความร้อน (350 องศาเซลเซียส) จนกระทั่งสารละลายในหลอดย่อยโปรตีน มีสี เขียวใส ปิดไฟเอาหลอดย่อยออกจากเครื่องย่อยแล้วทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่นอีกเล็กน้อย ต้มต่อไปอีก 2 นาที เพื่อทำลายกรดซัลฟูริกที่อาจเกิดขึ้น

- ขั้นตอนการกลั่น (distillation)

เตรียมกรดบอริก โดยใส่กรดบอริกในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. จำนวน 40 มล. แล้วหยดอินดิเคเตอร์ลงในกรดบอริก 2-3 หยด จากนั้นนำไปวางที่เครื่องกลั่นโปรตีน โดยให้ปลายของหลอดแก้วที่ต่อจากกระบอกแก้วควมแน่นของเครื่องกลั่นโปรตีน จุ่มอยู่ในกรดบอริกต่อหลอดย่อยโปรตีนเข้ากับเครื่องกลั่น

- ขั้นตอนการไทเทรต (titration)

นำขวดรูปชมพู่ (จากขั้นตอนการกลั่น) ไปไทเทรตด้วยกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (0.1 นอร์มอล) จนถึงจุดยุติ (end point) ใช้เมทิลเรด เป็นอินดิเคเตอร์สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน จดปริมาตรกรดไว้เพื่อคำนวณต่อไป

$$\% \text{ โปรตีน} = 1.4 (V1 - V2) N \times 6.25 W$$

เมื่อ  $V1$  = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

$V2$  = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไทเทรตตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบ

$N$  = เป็นความเข้มข้นของกรดเกลือเป็นนอร์มอล

$W$  = น้ำหนักตัวอย่างอาหาร (กรัม)

## 1.5 การคำนวณหาปริมาณคาร์โบไฮเดรต

การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในตัวอย่าง โดยทั่วไปคำนวณจากผลต่างของน้ำหนักแห้งกับปริมาณองค์ประกอบส่วนที่เป็นโปรตีน ไขมันและเถ้า

$$\text{ปริมาณคาร์โบไฮเดรต} = \text{น้ำหนักแห้ง} - (\text{โปรตีน} + \text{ไขมัน} + \text{เถ้า})$$

## 2. การวิเคราะห์ปริมาณเกลือ (ดัดแปรจาก Zhang and Xia (2008))

การเตรียมสารละลาย

- ละลาย zinc acetate 2.195 กรัม (I) ด้วยน้ำในบีกเกอร์ เทลงขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติก 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้ถึงขีด 1000 มิลลิลิตร (สารละลายนี้สามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน)

- ละลาย potassium hexacyanoferrate 1.060 กรัม (II) ด้วยน้ำในบีกเกอร์ เกล็ดขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้ถึงขีด 1000 มิลลิลิตร (สารละลายนี้สามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน)

#### การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง 20 กรัม เติมสารละลาย zinc acetate และ potassium hexacyanoferrate อย่างละ 4 มิลลิลิตร เติมน้ำให้มีปริมาตรรวม 250 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษ Whatman เบอร์ 1

#### การเตรียมกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายเกลือมาตรฐาน (0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10 และ 12 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เติม กรดไนตริก (เจือจาง 1:4) 5 มิลลิลิตร เจลาตินคอลลอยด์ (เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร) 5 มิลลิลิตร สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (0.5%) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำให้ถึงขีด อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 385 นาโนเมตรไปสร้างกราฟมาตรฐาน

#### การวิเคราะห์

นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ 3 มิลลิลิตร เติมกรดไนตริก (เจือจาง 1:4) 5 มิลลิลิตร เจลาตินคอลลอยด์ (เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร) 5 มิลลิลิตร สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (0.5%) 5 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเติมน้ำให้ถึงขีด อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 385 nm คำนวณความเข้มข้นเกลือ โดยคำนวณค่าจากกราฟมาตรฐาน

## ภาคผนวก ก2

## การตรวจวิเคราะห์หาชนิด และปริมาณของจุลินทรีย์

## การเตรียมตัวอย่างปลาร้า

ชั่งตัวอย่างปลาร้า 25 กรัม ใส่ในถุง stomacher เติมน้ำละลายเปปโตนเข้มข้น 1% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตบด้วยเครื่องตบอาหารความถี่ 200 rpm เป็นเวลา 1 นาที เจือจางตัวอย่างแบบเจือจางตามลำดับ (Serial dilution) นำไปตรวจสอบจุลินทรีย์

## 1. จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

ปิเปตตัวอย่างสารละลายปลาร้าที่ความเจือจางที่เหมาะสม 1 มิลลิลิตร หยดลงบนเพลทตรวจเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Compact Dry TC for Total Viable Counts) ปลอຍให้สารละลายซึมทั่วฟิล์มแห้ง นำไปบ่มที่  $35\pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏ

## 2. จำนวนยีสต์และรา

ปิเปตตัวอย่างสารละลายปลาร้าที่ความเจือจางที่เหมาะสม 1 มิลลิลิตร หยดลงบนเพลทตรวจยีสต์และรา (Compact Dry YM for Yeast and Mold) ปลอຍให้สารละลายซึมทั่วฟิล์มแห้ง นำไปบ่มที่  $25-30\pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏ

3. จำนวน *Staphylococcus aureus*

ปิเปตตัวอย่างสารละลายปลาร้าที่ความเจือจางที่เหมาะสม 1 มิลลิลิตร หยดลงบนเพลทตรวจ *Staphylococcus aureus* (Compact Dry x-SA for *Staphylococcus aureus*) ปลอຍให้สารละลายซึมทั่วฟิล์มแห้ง นำไปบ่มที่  $35-3\pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏ

## 4. วิธีการตรวจวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อ 3 สายพันธุ์ในระหว่างการหมัก

ปิเปตตัวอย่างสารละลายปลาร้าที่ความเจือจางที่เหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนเพลทอาหารวุ้น Nutreint agar ที่มีเกลือ 5% เกลี่ยด้วยแท่งแก้วให้ทั่ว กลับเพลทแล้วนำไปบ่มที่  $35\pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏ ดังนี้

- โคโลนีขนาดกลางแบนเนื้อโคโลนีเป็นรอยพับขอบหยัก นับเป็น *Bacillus atropha*
- โคโลนีขนาดเล็กสีครีมค่อนข้างใสขอบเรียบ นับเป็น *Tetragenococcus halophilus*
- โคโลนีขนาดกลางสีส้มแดงเนื้อครีม นับเป็น *Salinicoccus hispanicus* UDBD82-1
- โคโลนีนอกเหนือจากสามชนิดข้างต้นให้นับเป็นจุลินทรีย์อื่นๆ

## ภาคผนวก ข1

**วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในตัวอย่างปลาร้าด้วยเทคนิค Headspace Solid Phase Micro-Extraction coupled with Gas chromatography/Mass spectrometry (headspace SPME-GC/MS)**

วิเคราะห์องค์ประกอบโดยรวมของสารเมตาโบไลต์ชนิดระเหยง่าย (volatile metabolites) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาร้า โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย Headspace Solid Phase Micro-Extraction coupled with Gas chromatography/Mass spectrometry (headspace SPME-GC/MS) โดยนำตัวอย่างน้ำและเนื้อปลาร้าที่ผสมให้เข้ากันปริมาณ 3 กรัม บรรจุลงในขวดแก้ว GC vial ขนาด 20 มิลลิลิตร นำไปสกัดสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายด้วยเทคนิค Solid Phase Micro Extraction (SPME) โดยนำตัวอย่างไปให้ความร้อนเบื้องต้นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นดูดซับสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายบริเวณช่องว่างเหนือตัวอย่าง (headspace) ด้วยไฟเบอร์ชนิด Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) (Supelco, Bellefonte, PA, USA) ที่มีความหนา 50/30 ไมครอน โดยควบคุมอุณหภูมิขณะดูดซับไว้ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไฟเบอร์ไปสกัดสารเมตาบอไลต์เข้าสู่เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมทรี (Gas Chromatography/Mass Spectrometry) (Agilent 7890A GC-7000 Mass Triple Quad) โดยดำเนินการชะสารเมตาบอไลต์ออกจากไฟเบอร์ที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นสารเมตาบอไลต์จะถูกแยกด้วยแคปิลารีคอลัมน์ DB-WAX ขนาด 60 เมตร × 0.25 มิลลิเมตร × 0.25 ไมครอน (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) โดยตั้งสภาวะการฉีดตัวอย่างแบบ split mode มีค่าอัตราส่วน split ratio 5:1 ที่อุณหภูมิ injector เท่ากับ 240 องศาเซลเซียส ค่าโปรแกรมอุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้นจาก 32 องศาเซลเซียส (คงไว้ 10 นาที) และเพิ่มขึ้นในอัตรา 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จนเป็น 40 องศาเซลเซียส (คงไว้ 15 นาที) และเพิ่มขึ้นในอัตรา 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จนเป็น 160 องศาเซลเซียส และเพิ่มขึ้นในอัตรา 4 องศาเซลเซียสต่อนาที จนเป็น 230 องศาเซลเซียส (คงไว้ 5 นาที) อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียมซึ่งเป็นแก๊สตัวพามีค่าเท่ากับ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที แมสสเปกโตรเมทรีเป็นชนิด quadrupole mass detector โดยตั้งค่าที่ electron ionization mode มีค่าอุณหภูมิของส่วนไอออนเซชันคือ 230 องศาเซลเซียส มีค่า ionization energy ที่ 70 eV และมีช่วงในการวิเคราะห์ที่ 25 ถึง 400 m/z หลังจากนั้น แปลผลการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ที่ได้ด้วย Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis B.04.00 software โดยระบุชนิด (identification) ของสารเมตาบอไลต์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NIST mass spectral libraries (National Institute of Standards, 2011 version) คำนวณเปรียบเทียบปริมาณพื้นที่ใต้กราฟของสารเมตาบอไลต์แต่ละชนิด และรายงานเป็นค่าปริมาณความเข้มข้นสัมพัทธ์ (relative concentration)

## ภาคผนวก ข2

### วิเคราะห์องค์ประกอบโดยรวมของกรดอะมิโน

วิเคราะห์องค์ประกอบโดยรวมของกรดอะมิโนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาร้า โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography

#### การวิเคราะห์ผลทางสถิติสำหรับข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายและกรดอะมิโนในตัวอย่างปลาร้า

1. นำข้อมูลปริมาณสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายและกรดอะมิโนในตัวอย่างปลาร้าที่ได้มาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติแบบตัวแปรเดียว (univariate statistical analysis) โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance: ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบพหุคูณ (multiple comparison) ด้วยวิธี Tukey's test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistics package ระบุนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
2. ประมวลผลข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของโปรไฟล์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย (volatile metabolite profile) และกรดอะมิโน (amino acid profile) ระหว่างตัวอย่าง ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติหลายตัวแปร (multivariate statistical analysis) ได้แก่ การหารูปแบบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis: PCA) และการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม ด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) และแสดงความสัมพันธ์ของตัวอย่างปลาร้าด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Pearson correlation) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Multi-Experiment Viewer (MeV) และ Metaboanalyst

## ภาคผนวก ค1

### การคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างปลาร้าและการทดสอบคุณสมบัติ

#### 1. Cultural plating and isolation

ซังตัวอย่างปลาร้า จำนวน 10 กรัม ใส่ในถุงใส่ตัวอย่างที่ปราศจากเชื้อ (stomacher bag) เติม 5% NaCl solution ปลอดเชื้อ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ตบตัวอย่างด้วยเครื่อง Stomacher ที่ 200 rpm 1 นาที ปิเปิดตัวอย่าง หลังตบด้วยเครื่องตบอาหาร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำเจือจาง 5% NaCl solution และนำ 0.1 มิลลิลิตร ไปเกลี่ยบน อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ Collected sample was NA ที่มีเกลือ 5% และ skim milk 1% บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี และสุมเก็บโคโลนี เพื่อนำไประบุชนิดด้วย Harison disc methods.

#### 2. คุณสมบัติในการทนเกลือ

เลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่มีค่า OD600 = 0.5 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ในอาหาร NB supplemented with 3% NaCl ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยการแปรความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0, 5, 10, 15 และ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เพื่อสังเกตการณ์เจริญของเชื้อ (Harrigan, 1998)

#### 3. ความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส

คัดเลือกเบื้องต้นโดย นำ isolate จากข้อหนึ่งมาทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส โดยการ spot บน อาหาร NA ที่มีเกลือ 5% และเคซีน 1% (หรือ skim milk 1%) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการวัดขนาดวงใส เก็บเชื้อโดยการเลี้ยงในหลอดอาหารเลี้ยง NA ที่มีเกลือ 5% เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่มีค่า OD600 = 0.5 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน NB supplemented with 3% NaCl ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บส่วนใส 100 ไมโครลิตร มาเติม TrisHCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, pH 9 ที่มี  $\text{CaCl}_2$  ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ 50 ไมโครลิตร และเติม azocasein ความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย Trichloroacetic acid ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร เพื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสจากแบคทีเรียแต่ละตัว



#### 4. การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์และจัดทำ culture collection

ระบุสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยา ดังขั้นตอนต่อไปนี้

##### 4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีเกลือ 5% บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง นำคัลเจอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ด้านบนทิ้งและนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด เก็บสารสกัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

##### 4.2 การเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

เพิ่มจำนวน DNA ที่ตำแหน่ง 16S rRNA ด้วยวิธี PCR นำ DNA มา 20 นาโนกรัม สำหรับทำ PCR reaction 50 ไมโครลิตร ตาม instruction ที่ผู้ผลิตระบุ การทำ PCR ใช้ primers 1 ไมโครโมลาร์ 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'), 357F with GC clamp: (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') และ 517R: (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง หรือตรวจละเอียดด้วย Agarose gel electrophoresis

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยรีเอเจนต์ดังนี้

1x taq buffer with KCl, 0.1 mM dNTPs, 1  $\mu$ M forward และ reverse primers, 2 mM  $MgCl_2$  2 U taq DNA polymerase ,DNA template 20 ng และ Water, nuclease-free

สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ

|                         |                          |   |      |
|-------------------------|--------------------------|---|------|
| 1) Initial denaturation | อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส | 8 | นาที |
| 2) Denaturation         | อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส | 1 | นาที |
| 3) Annealing            | อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส | 3 | นาที |
| 4) Extension            | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | 1 | นาที |
| 5) Final extension      | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | 4 | นาที |

ทำข้อ 2) ถึงข้อ 4) ซ้ำเป็นจำนวน 35 รอบ

#### 4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่ง PCR amplicon ไปวิเคราะห์ที่ Macrogen ประเทศสิงคโปร์ วิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย blastn ของ 16S ribosomal RNA sequences database ของ the NCBI (National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.gov/>)).

#### 5. จัดทำ culture collection ของสายพันธุ์จุลินทรีย์

เก็บรักษาเชื้อใน glycerol stock โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีเกลือ 5% บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง นำคัลเจอร์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 100% glycerol ปลอดเชื้อ ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่ -40 องศาเซลเซียส ให้เก็บไอโซเลทละ 2 หลอด จัดทำบัญชีจุลินทรีย์พร้อมข้อมูลลำดับกรดนิวคลีอิก (รายการ Accession number)

## ภาคผนวก ค2

### ตรวจสอบรูปแบบของจุลินทรีย์และบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการหมักในแต่ละช่วงของการหมักด้วยเทคนิค cultural independent RT-PCR DGGE analysis

#### 1. การเตรียมตัวอย่างปลาร้า

ซังตัวอย่างปลาร้า จำนวน 10 กรัม ใส่ในถุงใส่ตัวอย่างที่ปราศจากเชื้อ (stomacher bag) เติม 5% NaCl solution ปลอดเชื้อ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ตบตัวอย่างด้วยเครื่อง Stomacher ที่ 200 rpm 1 นาที นำตัวอย่าง หลังตบด้วยเครื่องตบอาหาร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บในหลอด Microcentrifuge สกัดอาร์เอ็นเอและเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น cDNA

#### 2. การสกัดอาร์เอ็นเอและเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น cDNA

ดูดเชื้อที่เตรียมตามข้อ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ด้านบนทิ้งและนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit จากนั้นเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็น complementary DNA (cDNA) โดยใช้ชุดสังเคราะห์ Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit ตามวิธีใช้ที่ระบุไว้ในคู่มือการใช้ (แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ก) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

#### 3. การเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

เพิ่มจำนวน cDNA ที่ตำแหน่ง 16S rRNA ด้วยวิธี nested PCR (Kim et al [10]). นำ cDNA จากข้อ 2 มา 20 ng สำหรับทำ PCR reaction 50  $\mu$ l ตาม instruction ที่ผู้ผลิตระบุ

เพิ่มจำนวน DNA ที่ตำแหน่ง 16S rRNA ด้วยวิธี nested - PCR นำ DNA มา 20 ng สำหรับทำ PCR reaction 50  $\mu$ l ตาม instruction ที่ผู้ผลิตระบุ การทำ PCR ใช้ primers 1  $\mu$ M 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), และ 1492R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'), 357F with GC clamp: (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') และ 517R: (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง หรือตรวจละเอียดด้วย Agarose gel electrophoresis ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยรีเอเจนต์ดังนี้

1x taq buffer with KCl, 0.1 mM dNTPs, 1  $\mu$ M forward และ reverse primers

2mM MgCl<sub>2</sub>, 2 U taq DNA polymerase, DNA template 20 ng และ Water, nuclease-free

สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ

|                         |                          |   |      |
|-------------------------|--------------------------|---|------|
| 1) Initial denaturation | อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส | 8 | นาที |
| 2) Denaturation         | อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส | 1 | นาที |
| 3) Annealing            | อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส | 3 | นาที |
| 4) Extension            | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | 1 | นาที |
| 5) Final extension      | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | 4 | นาที |

ทำข้อ 2) ถึงข้อ 4) ซ้ำเป็นจำนวน 35 รอบ

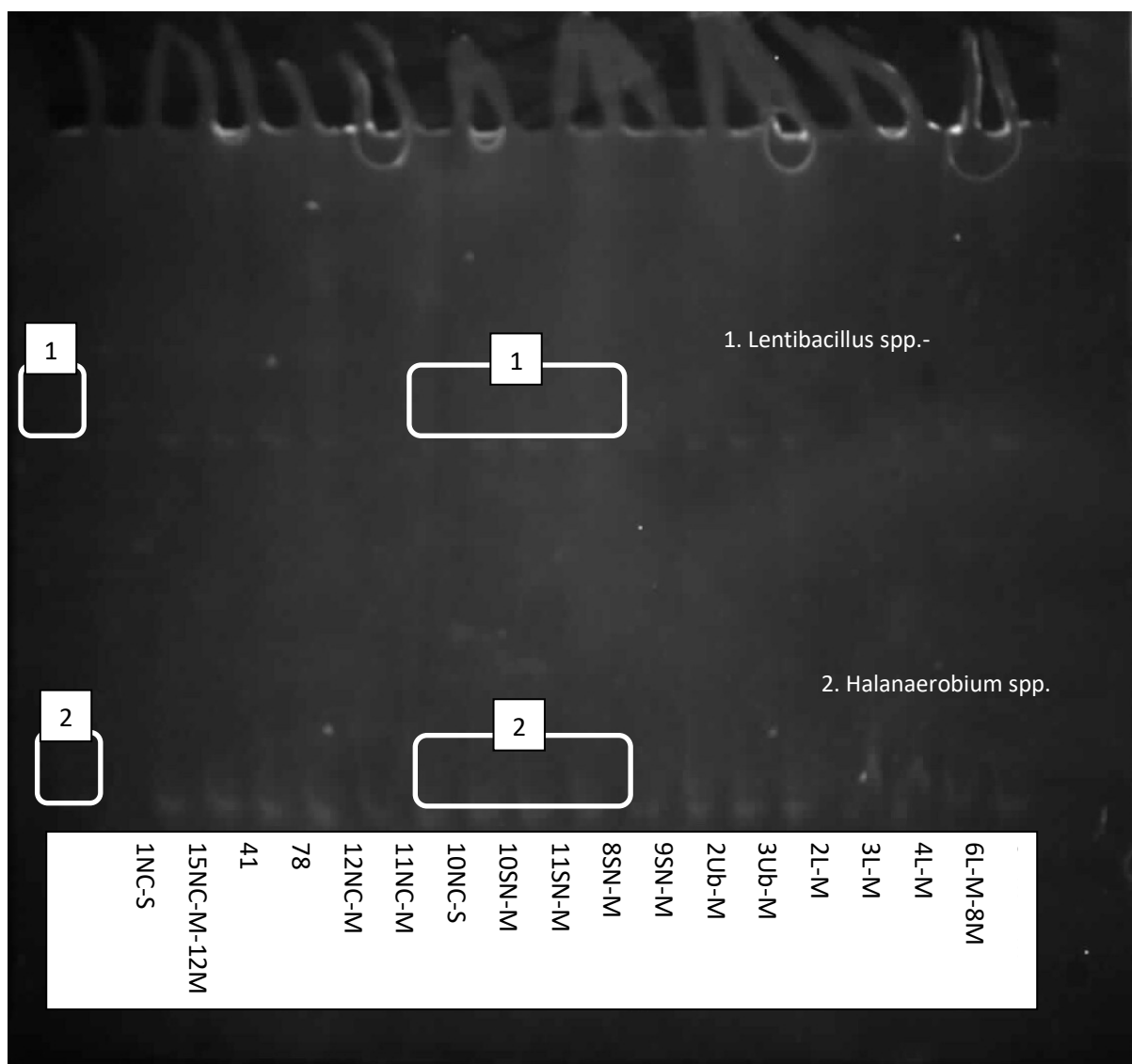
#### 4. การแยกแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

เตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลโดยแปรความเข้มข้นของเจลเป็นร้อยละ 10% (w/v) (acrylamide-bis-acrylamide 37.5:1) โดยใช้เกรเดียนต์ (gradient) ของยูเรียและฟอร์มามาไมด์ที่ความเข้มข้นจากร้อยละ 40–70 (100% denaturation corresponds to 7 M urea and 40% (v/v) formamide) ตามรายงานของ ผสมสารเคมีสำหรับใช้ทำ DGGE และบรรจุในกระจุกตามวิธีการบรรจุเจลสำหรับการทำ DGGE (แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ค.) วิเคราะห์โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 10 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายสี (Loading Dye) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แยกแถบดีเอ็นเอบนเจลภายใต้สภาวะความต่างศักย์ไฟฟ้า 120 โวลต์ V ใน 1×Tris-acetate/EDTA buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) เป็นเวลา 3.5 h ที่ 60 °C ด้วยเครื่อง DCode Universal Mutation Detection System นำแผ่นเจลไปแช่ใน Ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร นาน 30 นาที จากนั้นล้าง Ethidium bromide ออกโดยการแช่แผ่นอะกาโรสในน้ำกลั่นนาน 30 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ (DNA band) ที่ปรากฏบนเจลด้วยเครื่อง Gel Documentation เปรียบเทียบรูปแบบการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐาน และตัดแถบ DNA เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

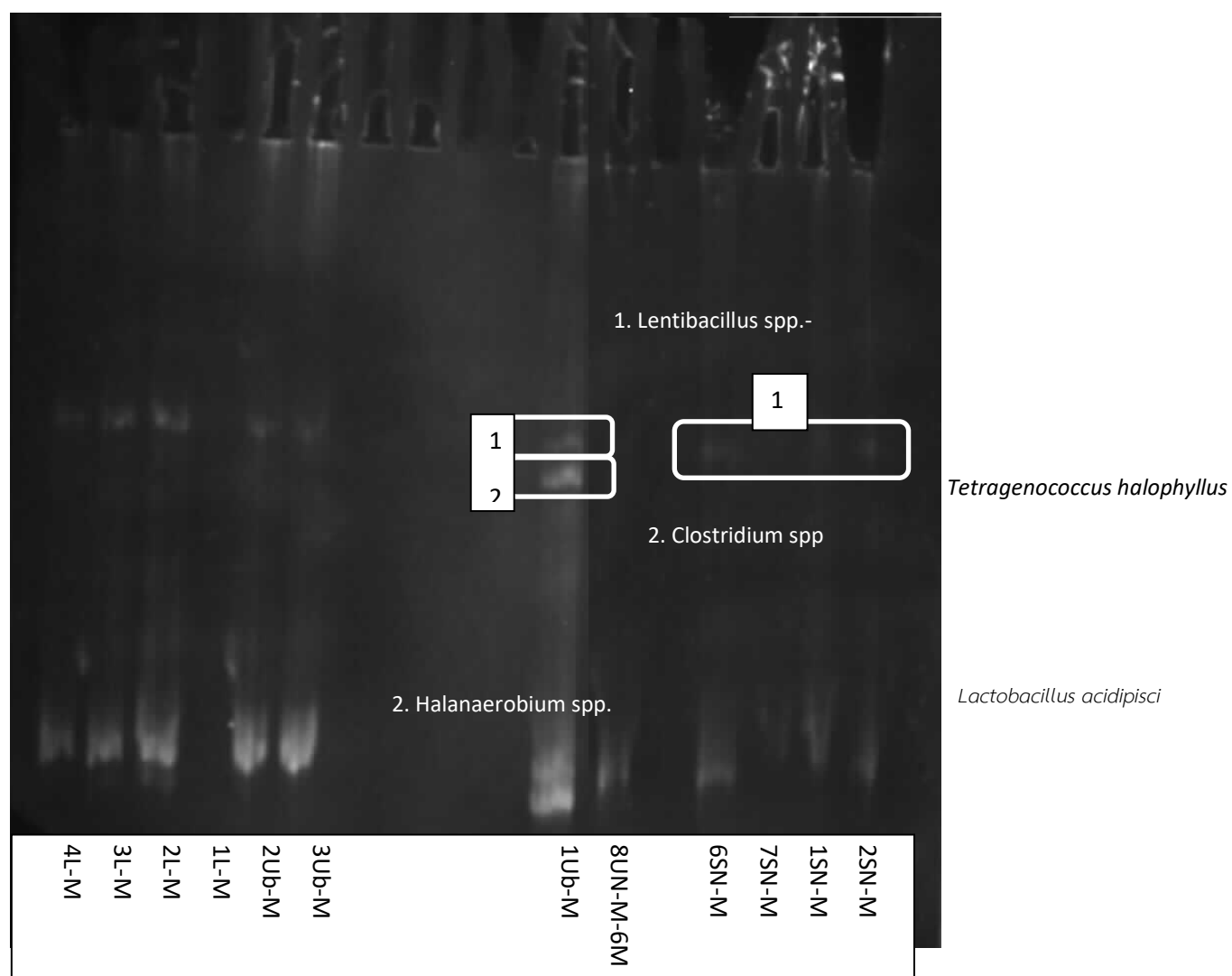
#### 5. การแยกแถบ DNA เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ตัดแถบ DNA จาก DGGE gel ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ใช้เป็น template PCR โดยใช้ primers, 357F และ 517R ตรวจสอบคุณภาพ PCR product และส่งไปวิเคราะห์ที่ Macrogen ประเทศสิงคโปร์ วิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย blastn ของ 16S ribosomal RNA sequences database ของ the NCBI (National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.gov/>)).

ผลการตรวจสอบชุมชนของจุลินทรีย์ในตัวอย่างปลาร้าที่หมักจากสภาวะที่ต่างกัน



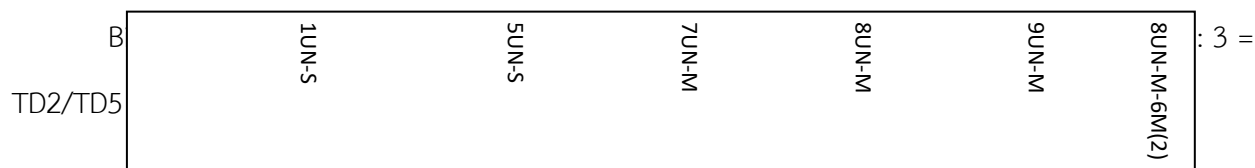
ภาพที่ ค2-1 แถบ cDNA ของจุลินทรีย์หลักที่พบในการหมักปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและชัยภูมิ

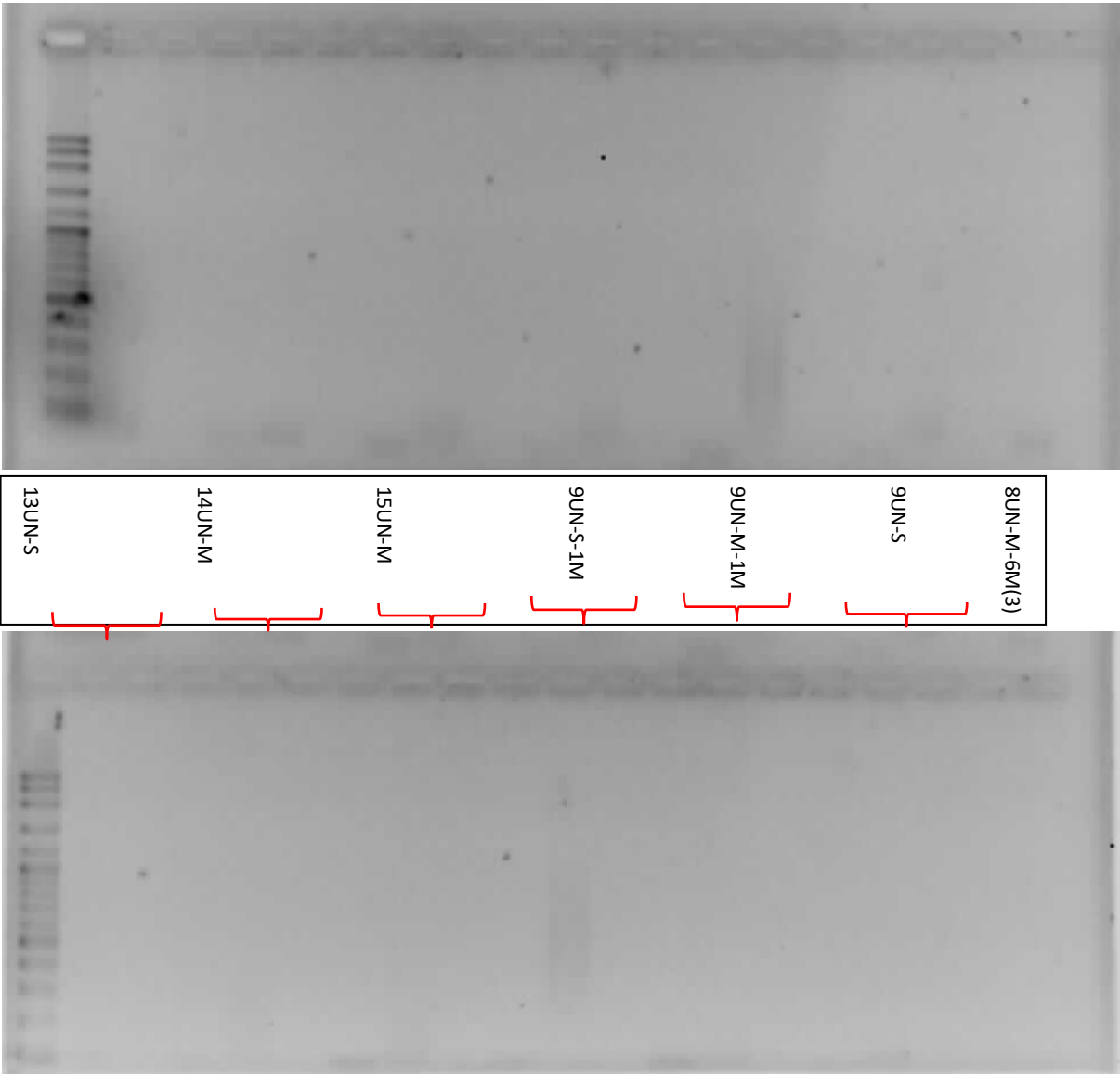


ภาคที่ ค2-2 แถบ cDNA ของจุลินทรีย์หลักที่พบในการหมักปลาร้าที่ผลิตในพื้นที่จังหวัดสกลนคร นครพนม  
อุบลราชธานีและลาว

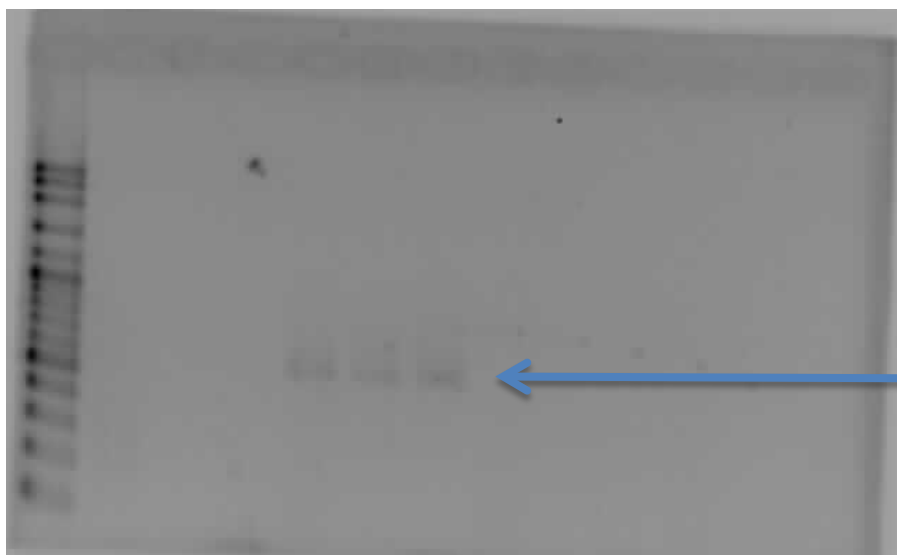
## การตรวจสอบความปลอดภัยของปลาร้า

ตรวจสอบความเสี่ยงต่อการมีสารก่อภูมิแพ้โดยการประเมินการแสดงออกของ gene ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Biogenic amine









ภาพที่ ค2-3 การตรวจสอบ gene ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร Biogenic amine

สรุป พบการแสดงออกของ gene ทั้งสามชนิดในตัวอย่างปลาร้าที่หมักใน 1 พื้นที่

## ภาคผนวก ง

## ผลการทดสอบสมบัติ ความปลอดภัยและคุณสมบัติพิเศษของจุลินทรีย์

## 1. การสร้างสารกลุ่ม Biogenic amine

ประเมินสมบัติในการสร้างสารกลุ่ม Biogenic amine ด้วยการตรวจการมี hitidinedecarboxylase (hdc) gene

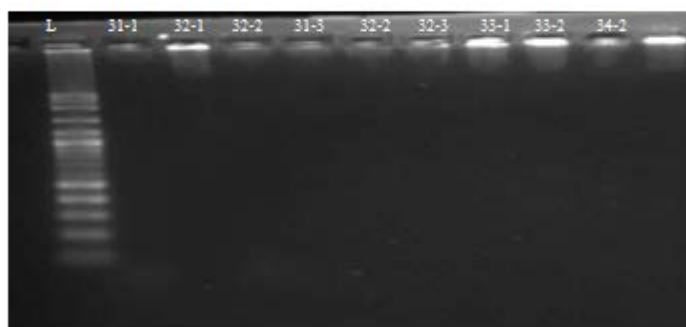
เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีเกลือ 5% บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง นำคัลเจอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายที่อยู่ด้านบนทิ้งและนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด เก็บสารสกัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป การเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) เพิ่มจำนวน DNA ที่ตำแหน่ง 16S rRNA ด้วยวิธี PCR นำ DNA มา 20 ng สำหรับทำ PCR reaction 50  $\mu$ l ตาม instruction ที่ผู้ผลิตระบุ การทำ PCR ใช้ primers 1  $\mu$ M JV16HD (5'-AGA TGG TAT TGT TTC TTA TG-3') และ JV16HD (5'-AGA CCA TAC ACC ATA ACC TT-3') หรือ HDC3 (5'-GAT GGT ATT GTT TCK TAT GA-3') และ HDC4 (5'-CAA ACA CCA GCA TCT TC-3') เพิ่มจำนวนขึ้นดีเอ็นเอในเครื่อง cycler ด้วยสภาวะมาตรฐาน ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR (PCR amplicon) จากทั้งไพรเมอร์ทั้งสองคู่ด้วย Agarose gel electrophoresis เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยขนาดของ DNA amplicon ของ JV16HD และ JV16HD จะต้องมีความยาวประมาณ 367 base pair และ DNA amplicon ของ HDC3 และ HDC4 จะต้องมีความยาวประมาณ 440 base pair

ผลการทดสอบการมี Biogenic amine ในปลาร้าหมักโดยใช้กล้องเชื้อ

### Biogenic amines (Histamine, Tyramine, Petrescine)



### Biogenic amines (Histamine, Tyramine, Petrescine)

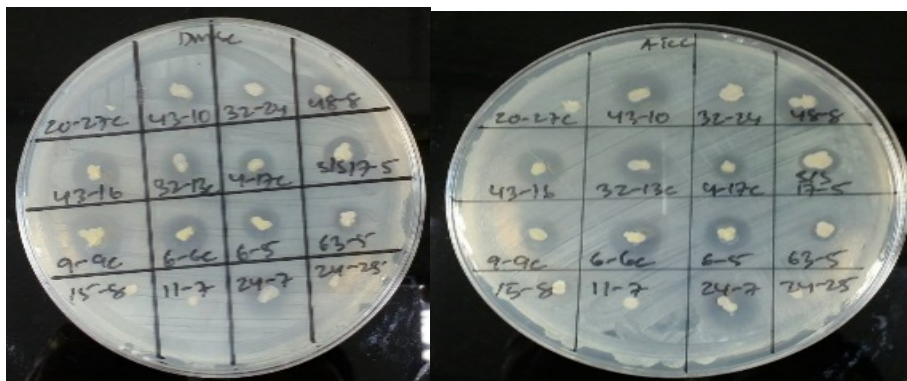


ภาพที่ 1 แถบ cDNA ของ Biogenic amine gene ทั้ง 3 ชนิด (ก) ตัวอย่างปลาร้าหมักแบบ SSF แบบทั่วไป (ข) ตัวอย่างปลาร้าหมักแบบ SSF แบบเกลือสูง (ค) ตัวอย่างปลาร้าหมักแบบ SMF

สรุป ไม่พบการแสดงออกทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ที่มีในระบบการหมักปลาร้าทุกตัวอย่าง

## 2. คุณสมบัติการสร้างสารต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus*

การคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีสมบัติในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ของไอโซเลทสำหรับนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อเพื่อต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus*



ภาพที่ ๖2 การยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ทั้งสายพันธุ์ก่อโรคและสายพันธุ์ที่คัดแยกจากปลาร้าของไอโซเลท

ตาราง ๖1 ฤทธิ์การยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ทั้งสายพันธุ์ก่อโรคและสายพันธุ์ที่คัดแยกจากปลาร้าของไอโซเลท ตรวจสอบด้วยระบบ disc diffusion

| Testing isolates (inhibitory zone diameter cm) |              |               |                |                      |
|------------------------------------------------|--------------|---------------|----------------|----------------------|
| Isolates                                       | ATCC 25922   | DMSC 6538     | FT 30-7        | Mix <i>S. aureus</i> |
| <i>B. pumilus</i>                              | 0.95±0.78a   | 0.8±0.00bcde  | 0.45±0.07def   | 0.20±0.28de          |
| <i>B. pumilus</i>                              | 0.85±0.07ab  | 1.05±0.21ab   | 0.60±0.00bcde  | 0.45±0.21abcd        |
| <i>B. pumilus</i>                              | 0.80±0.14abc | 0.90±0.14abc  | 0.60±0.00bcde  | 0.50±0.14abcd        |
| <i>B. pumilus</i>                              | 1.00±0.00a   | 1.10±0.14a    | 0.80±0.28ab    | 0.60±0.00abc         |
| <i>B. pumilus</i>                              | 0.70±0.14abc | 0.40±0.00fg   | 0.30±0.00f     | 0.00±0.00e           |
| <i>B. pumilus</i>                              | 0.75±0.21abc | 0.85±0.21abcd | 0.75±0.07abc   | 0.70±0.14ab          |
| <i>B. pumilus</i>                              | 0.50±0.00abc | 0.65±0.07cdef | 0.90±0.14a     | 0.55±0.07abcd        |
| <i>B. subtilis</i>                             | 0.70±0.14abc | 0.80±0.28bcde | 0.70±0.00abcd  | 0.65±0.07abc         |
| <i>B. subtilis</i>                             | 0.40±0.00bc  | 0.40±0.00fg   | 0.45±0.07def   | 0.40±0.00e           |
| <i>B. subtilis</i>                             | 0.70±0.14abc | 0.90±0.14abc  | 0.50±0.14cdef  | 0.30±0.00cde         |
| <i>B. amyloliquefaciens</i>                    | 0.30±0.14abc | 0.35±0.14g    | 0.30±0.00f     | 0.35±0.07bcde        |
| <i>B. amyloliquefaciens</i>                    | 0.30±0.00c   | 0.00±0.00h    | 0.40±0.14ef    | 0.00±0.00e           |
| <i>B. amyloliquefaciens</i>                    | 1.00±0.00a   | 0.70±0.14cde  | 0.90±0.14a     | 0.80±0.00a           |
| <i>B. amyloliquefaciens</i>                    | 0.55±0.07abc | 0.55±0.07efg  | 0.40±0.00ef    | 0.55±0.07abcd        |
| <i>B. licheniformis</i>                        | 0.50±0.14abc | 0.00±0.00h    | 0.50±0.00cdef  | 0.70±0.42ab          |
| <i>B. atrophaeus</i>                           | 0.60±0.00abc | 0.60±0.00defg | 0.65±0.07abcde | 0.60±0.00abc         |
| <i>B. atrophaeus</i>                           | 0.40±0.00abc | 0.00±0.00h    | 0.55±0.21bcdef | 0.30±0.00cde         |
| <i>B. altitudinis</i>                          | 1.00±0.00a   | 1.00±0.00ab   | 0.50±0.00cdef  | 0.20±0.28de          |

การตรวจสอบสมบัติการสร้างสาร bacteriocin ชนิด Subtilin และ Subtilisin ของไอโซเลตสำหรับนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อเพื่อดำเนินการเจริญของ *Staphylococcus aureus*

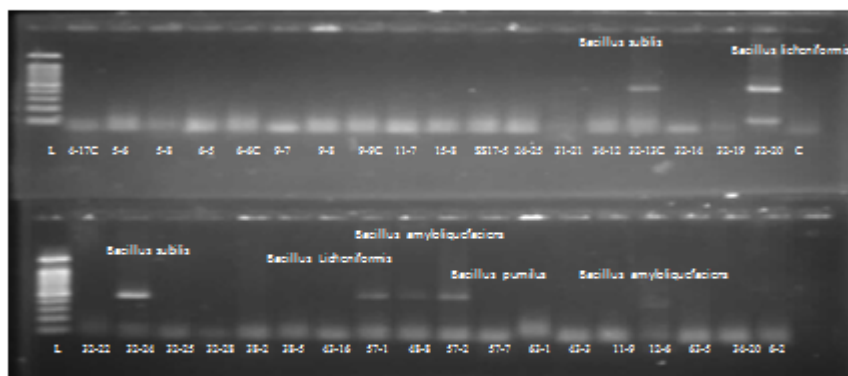


Figure 1.5% agarose gel for bacteriocin expression using subtilin (Spa) primer (566bp)  
Running electrophoresis for 35minutes 200voltage

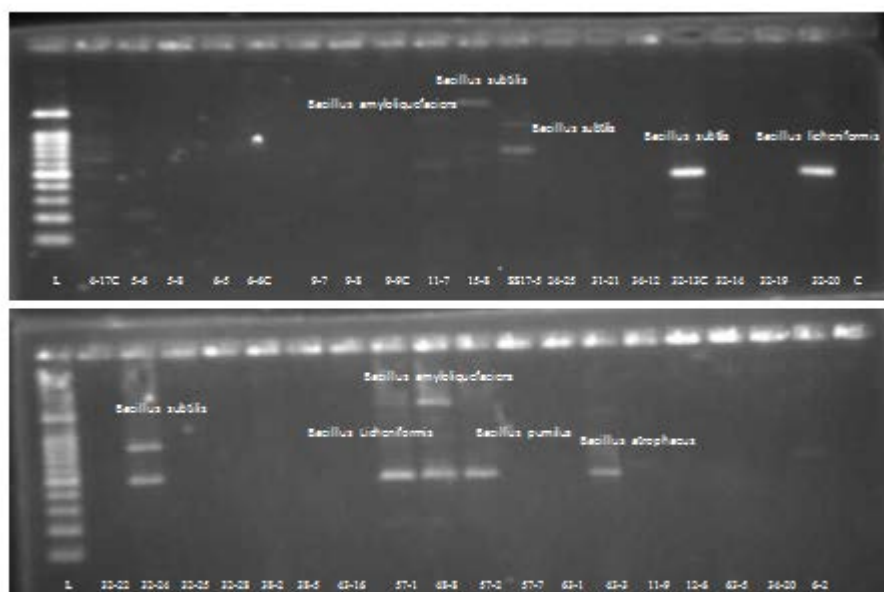
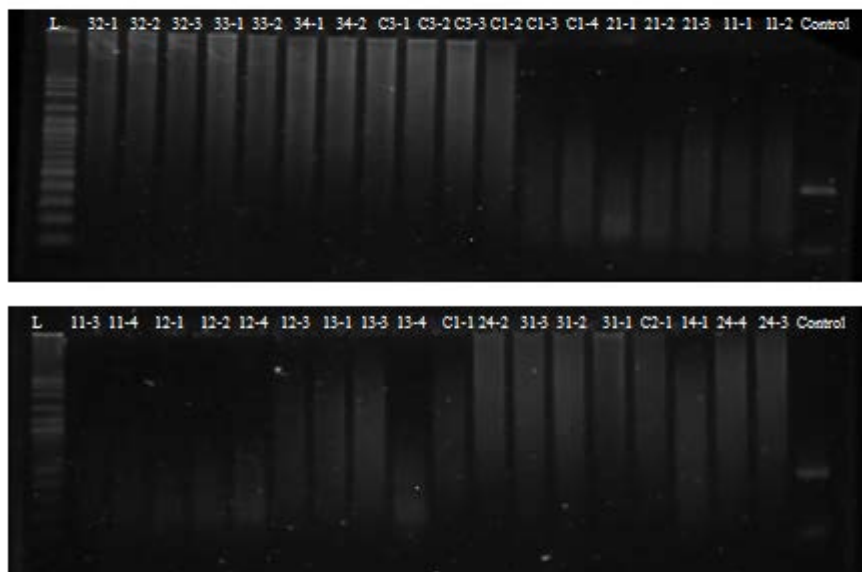


Figure 1.5% agarose gel for bacteriocin expression using subtilisin (Sbo) primer -734bp  
Running electrophoresis for 35minutes 200voltage

ภาพที่ 3 การตรวจสอบการแสดงออกของ gene ชนิด Subtilin และ Subtilisin ของไอโซเลตสำหรับนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อเพื่อดำเนินการเจริญของ *Staphylococcus aureus*

การตรวจสอบการสร้าง Subtilin และ Subtilisin ในปลาร้าที่หมักด้วยกล้าเชื้อ

#### Subtilisin and Subtilin Bacteriocin



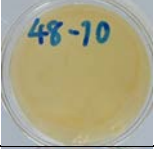
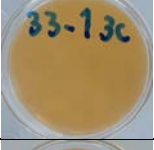
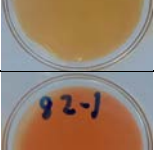
ภาพที่ ๔๔ การตรวจสอบการสร้าง Subtilin และ Subtilisin ในปลาร้าที่หมักด้วยกล้าเชื้อ

สรุป ไม่พบการแสดงออกของยีนที่สร้างสาร Subtilin และ Subtilisin แสดงให้เห็นว่าไม่มี *Staphylococcus aureus* ในระบบการหมักปลาร้า

### 3. สมบัติการสร้างสารสี

นำไอโซเลทที่โคโลนีการสร้างสารสีมาจัดกลุ่มตามเฉดสีและแหล่งที่พบ ทดสอบคุณสมบัติ ระบุสายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1 เฉพาะตัวแทนกลุ่ม แต่จุลินทรีย์สร้างสีที่ระบุชนิดในงานวิจัยมีทั้งหมด 48 ไอโซเลท ดังแสดงในภาพ

ตาราง ง2 คุณสมบัติและการระบุชนิดของจุลินทรีย์

| กลุ่มสี | แกรม | รูปร่าง | ลักษณะทางสัณฐานวิทยา              |                 |                                                           | ตัวแทนเชื้อ                                  | ตัวแทนไอโซเลท                                                                         | รายงานชนิดสี                             |
|---------|------|---------|-----------------------------------|-----------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
|         |      |         | รูปร่างของโคโลนี                  | ลักษณะโคโลนี    | ริมหรือขอบโคโลนี                                          |                                              |                                                                                       |                                          |
| 1       | +    | Cocci   | Circular<br>รูปร่างกลม            | Smooth<br>เรียบ | Entire ขอบ<br>เกลี้ยงไม่มี<br>รอยเว้า                     | <i>Kocuria</i><br>sp.                        |    | Carotenoid<br>(Reddy และคณะ,<br>2003)    |
| 2       | +    | Cocci   | Circular<br>รูปร่างกลม            | Smooth<br>เรียบ | Entire ขอบ<br>เกลี้ยงไม่มี<br>รอยเว้า                     | <i>S.</i><br><i>saprophyti</i><br><i>cus</i> |    | ไม่มีข้อมูลชนิด<br>pigment               |
| 3       | +    | Cocci   | Circular<br>รูปร่างกลม            | Smooth<br>เรียบ | Entire ขอบ<br>เกลี้ยงไม่มี<br>รอยเว้า                     | <i>S.</i><br><i>carnosus</i>                 |   | Carotenoid<br>(Wieland และคณะ<br>, 1994) |
| 4       | +    | Cocci   | Circular<br>รูปร่างกลม            | Smooth<br>เรียบ | Entire ขอบ<br>เกลี้ยงไม่มี<br>รอยเว้า                     | <i>T.</i><br><i>halophilus</i>               |  | non-pigmented<br>(Lee และคณะ,<br>2005)   |
| 5       | +    | Rod     | Irregular<br>รูปร่างไม่<br>แน่นอน | Rough<br>ขรุขระ | Entire ขอบ<br>เกลี้ยงไม่มี<br>รอยเว้า                     | <i>Halomona</i><br><i>s</i> sp.              |  | Carotenoid<br>(Moreno และคณะ,<br>2012)   |
| 6       | +    | Rod     | Irregular<br>รูปร่างไม่<br>แน่นอน | Smooth<br>เรียบ | Undulate<br>ขอบเป็น<br>คลื่น โค้ง<br>หรือเว้า<br>เล็กน้อย | <i>Bacillus</i><br>sp.                       |  | Carotenoid<br>(Moeller และคณะ,<br>2005)  |
| 7       | +    | Rod     | Circular<br>รูปร่างกลม            | Smooth<br>เรียบ | Entire ขอบ<br>เกลี้ยงไม่มี<br>รอยเว้า                     | <i>Lelliottia</i><br>sp.                     |  | Carotenoid<br>(Stephan และคณะ<br>, 2014) |
| 8       | +    | Cocci   | Circular<br>รูปร่างกลม            | Smooth<br>เรียบ | Entire ขอบ<br>เกลี้ยงไม่มี<br>รอยเว้า                     | <i>Salinicocc</i><br><i>us</i> sp.           |  | Xanthophylls<br>(Bhat และMarar,<br>2015) |

ตาราง ง3 อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ในเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ ของเชื้อสร้างสี

| กลุ่มสี | การเจริญบนอาหารแข็ง (NA) |         |          | การเจริญในอาหารเหลว (NB) |         |          |
|---------|--------------------------|---------|----------|--------------------------|---------|----------|
|         | 0 %NaCl                  | 5 %NaCl | 10 %NaCl | 0 %NaCl                  | 5 %NaCl | 10 %NaCl |
| 1       | 4.7500                   | 3.2250  | 2.4500   | ++                       | +       | +        |
| 2       | 4.9188                   | 4.0750  | 3.3813   | +++                      | ++      | ++       |
| 3       | 4.1750                   | 2.7125  | 2.0750   | +++                      | ++      | ++       |
| 4       | 1.8500                   | 1.7000  | 1.5000   | ++                       | ++      | +        |
| 5       | 4.7375                   | 5.1500  | 3.4125   | ++                       | +++     | +        |
| 6       | 8.7750                   | 6.9250  | 6.1000   | ++                       | +       | +        |
| 7       | 1.3000                   | 1.5500  | 1.1750   | ++                       | +       | +        |
| 8       | 3.5000                   | 3.7250  | 3.1500   | ++                       | +       | +        |



ภาพ ง5 เมดสีที่จุลินทรีย์ไอโซเลทสร้างและนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นเกล้าเชื้อเพื่อสร้างสีในปลาร้า



#### 4. Hemolysis

การทดสอบสมบัติการทำลายเม็ดเลือดแดงของไอโซเลท พบสมบัติการทำลายเม็ดเลือดแดงของไอโซเลท ทั้ง 3 ประเภท ได้แก่

- 4.1 beta hemolysis clear zone ใส เป็น complete hemolysis เกิดจาก virulence gene สร้างสารพิษทำลายเม็ดเลือดแดง ไอโซเลทที่มีสมบัติดังกล่าวได้แก่ *Bacillus* sp. และ *Staphylococcus* บางไอโซเลท
- 4.2 alpha hemolysin สร้างวงเขียว เกิดจากการสร้าง hydrogen peroxide ไป reduce hemoglobin ให้เกิด green oxidized derivative ที่เรียกว่า methemoglobin
- 4.3 gamma hemolysin ไม่เกิดวง ไม่ย่อย เป็น non-hemolytic รายงานผลเป็น gamma หรือ ผลลบ

มีรายงานกรณี *Bacillus* ที่สร้าง bacteriocin ก็ทำให้เกิด clear zone แต่ไม่ใช่กรณีก่อโรค ดังนั้น หากทดสอบ *bacillus* เรื่องนี้ให้หนักถึงการสร้าง bacteriocin ประกอบด้วย กรณีไอโซเลท *B.atrophaeus* UD6-28\* พบ gene subtilin และ subtiocin ด้วย

ตารางที่ 4 การทดสอบสมบัติการทำลายเม็ดเลือดแดงของไอโซเลท

| Isolates                         | ผลการทดสอบ 3 generation |       |       | Hemolysis      |
|----------------------------------|-------------------------|-------|-------|----------------|
|                                  | R1                      | R2    | R3    |                |
| <i>B.atrophaeus</i><br>UD6-28*   | gamma                   | alpha | gamma | non-heamolytic |
| <i>B.atrophaeus</i><br>NC58-2    | gamma                   | gamma | gamma | non-heamolytic |
| <i>B.atrophaeus</i> .SN7<br>8-1  | gamma                   | gamma | gamma | non-heamolytic |
| <i>T.halophilus</i><br>NCFF-2    | gamma                   | gamma | gamma | non-heamolytic |
| <i>S. hispanicus</i><br>UDBD82-1 | gamma                   | gamma | gamma | non-heamolytic |

จุลินทรีย์ชนิดนี้มี gene สร้าง bacteriocin



ภาพที่ ง6 การย่อยเม็ดเลือดแดงของไอโซเลทในแบบต่างๆ

## ภาคผนวก จ

## สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ในการเตรียมน้ำเชื้อปลาร้า

ตาราง จ1 สูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในการเตรียมน้ำเชื้อ

| Medium Code | Cultural medium | Supplement |                                           |
|-------------|-----------------|------------|-------------------------------------------|
|             |                 | NaCl (%)   | Fermented fish solution (20-25% NaCl) (%) |
| A           | 1% peptone      | 5          | 0                                         |
| B           | 1% peptone      | 10         | 1                                         |
| C           | 1% peptone      | 15         | 5                                         |

## ภาคผนวก จ

## แบบสัมภาษณ์ผู้ผลิตปลาร้า

( ) รายย่อย ( ) กลุ่มวิสาหกิจเล็ก ( ) วิสาหกิจกลาง ( ) อุตสาหกรรม

## 1. ข้อมูลทั่วไป

1.1 ชื่อกลุ่ม/บริษัท .....

1.2 ชื่อ..... สกุล..... (ผู้ให้ข้อมูล)

1.3 อายุ.....ปี ตำแหน่ง .....

1.4 อาชีพหลัก..... (กรณีผู้ผลิตรายย่อย/กลุ่ม)

1.5 ที่อยู่ หมู่ที่..... ชื่อหมู่บ้าน.....ตำบล .....

อำเภอ..... จังหวัด.....

โทรศัพท์.....โทรสาร.....อีเมล .....

1.6 ผลิตปลาร้ามาแล้ว.....ปี ( ) เพื่อจำหน่าย ( ) เพื่อบริโภค

## 2. สภาพการผลิตปลาร้า ชื่อปลาร้าที่ผลิตคือ ( ) ปลาร้าข้าวคั่ว ( ) ปลาร้ารำข้าว ( ) อื่น ๆ .....

2.1 วัตถุประสงค์การผลิตปลาร้า (ข้อมูลของการผลิตปลาร้าที่เก็บตัวอย่าง ณ วันสัมภาษณ์)

2.1.1 ปลาใช้ปลาอะไรในการผลิตปลาร้า(ช่วงเวลาที่ได้รับวัตถุดิบ)

.....

2.1.2 ปลาที่ใช้มีลักษณะอย่างไร ขนส่งมาอย่างไร(ลดอุณหภูมิหรือไม่อย่างไร)

.....

2.1.3 ขนาดของปลาที่ใช้ในการผลิตปลาร้า

.....

2.2 การได้มาซึ่งวัตถุดิบ

2.2.1 แหล่งที่มาของปลา

.....

2.2.2 แหล่งที่มาของเกลือ

.....

2.2.3 แหล่งที่มาของรำหรือข้าวคั่ว

.....

## 3. กระบวนการผลิต

3.1 เตรียมวัตถุดิบอย่างไร (คำถามนำ เช่น แล่ คั่ว ไล่ ล้าง แหล่งน้ำที่ใช้ล้าง ชั่งน้ำหนัก เป็นต้น)

- ปลา.....
- เกล็ด.....
- ข้าวคั่ว.....

### 3.2 สัดส่วน สูตร ขั้นตอนการผสม (เท่าที่เปิดเผยได้)

.....

.....

### 3.3 ภาชนะที่ใช้

- ภาชนะที่ใช้ผสม.....
- ภาชนะที่ใช้หมัก.....

### 3.4 การหมักและระยะเวลาการหมัก (เวลา ให้ระบุเดือนที่ทำกิจกรรมนั้นๆ)

- วิธีทำให้ร้ออากาศ.....
- เวลาที่ปลาร้าหยุดสร้างฟองอากาศ.....
- จำนวนครั้งและเวลาที่พลิกปลาร้า.....
- ระยะเวลาการหมักรวมทั้งสิ้น.....
- ข้อบ่งชี้ในการยุติการหมัก.....
- อื่นๆ .....

### 3.5 ลักษณะปลาร้าที่ผลิตได้

- ลักษณะของเนื้อปลา .....
- สีของเนื้อปลา .....
- สีของน้ำปลาร้า.....
- สัดส่วนของเนื้อปลาร้าและน้ำปลาร้า .....

### 3.6 การเก็บ/การจำหน่าย

- ภาชนะที่ใช้บรรจุเพื่อ เก็บ/จำหน่าย.....
- สภาพการเก็บ.....
- ระยะเวลา รอ เก็บ/ จำหน่าย.....
- การเปลี่ยนแปลงระหว่างเก็บ/รอจำหน่าย.....

### 4. ข้อมูลเพิ่มเติม

#### 4.1 ผู้ประกอบการพอใจกับปลาร้าที่ได้หรือไม่

- พอใจ เพราะ.....
  - อັตลัษณ์ปลาร้าของท่านคืออะไร.....
- ยังไม่พอใจ เพราะ .....
- อื่นๆ .....

#### 4.2 ลักษณะปลาร้าที่ตลาดต้องการ (ตามที่คุณประกอบการอยากได้)

- ลักษณะของเนื้อปลา .....
- สีของเนื้อปลา .....
- สีของน้ำปลาร้า.....
- สดสวนขอเนื้อปลาร้าและน้ำปลาร้า .....

#### 4.3 ระยะเวลาในการหมักปลาร้า มีผลต่อปลาร้าในด้านต่าง ๆ อย่างไร

- ด้านราคา.....
- ด้านคุณภาพ .....
- ด้านอื่น ๆ .....

#### 4.4 หากสามารถผลิตปลาร้าแบบหมักเร็ว (เวลาสั้นลงกว่าเดิมครึ่งหนึ่ง) ได้ปลาร้าที่มีคุณภาพตามด้านกลิ่นรสตามที่คุณประกอบการต้องการ และควบคุมสุขลักษณะการผลิตให้เป็นไปตามมาตรฐานได้ดีขึ้น ท่านคิดว่าจะเป็นประโยชน์ต่อท่านหรือไม่อย่างไร

.....

.....

#### 4.5 หากสามารถผลิตปลาร้าได้เร็ว มีปลาร้ามากพอที่จะนำมาแปรรูปแบบเป็นผลิตภัณฑ์ปลาร้ารูปแบบต่างๆ เพื่อเพิ่มมูลค่าท่านอยากได้ผลิตภัณฑ์ปลาร้ารูปแบบใดเพราะอะไร

.....

.....

## ภาคผนวก ข

## แบบสอบถามความพึงพอใจต่อ

กล้าซื้อปลาร้าพร้อมใช้สำหรับหมักปลาร้าจำเพาะตามรูปแบบการผลิตในแต่ละพื้นที่

เพื่อเป็นข้อมูลส่วนหนึ่งของโครงการวิจัย

การพัฒนากระบวนการผลิตปลาร้าเพื่อเพิ่มอัตราการผลิตและสร้างอัตลักษณ์ของผลิตภัณฑ์

**ข้อชี้แจง** กรุณาทำเครื่องหมาย ✓ ในข้อที่ตรงกับความคิดเห็นของท่านมากที่สุดและให้ความเห็นในช่องว่างที่กำหนดให้

**ตอนที่ 1 ข้อมูลทั่วไปของผู้ตอบแบบสอบถาม**

1. เพศ ☐ ชาย ☐ หญิง
2. อายุ ☐ ต่ำกว่า 20 ปี ☐ 21 - 40 ปี ☐ 41 - 60 ปี ☐ 60 ปีขึ้นไป
3. ระดับการศึกษาสูงสุด
 

|                                     |                                                             |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> ประถมศึกษา | <input type="checkbox"/> มัธยมศึกษาตอนต้น/ตอนปลาย/เทียบเท่า |
| <input type="checkbox"/> ปริญญาตรี  | <input type="checkbox"/> สูงกว่าปริญญาตรี                   |
4. สถานภาพ
 

|                                                          |                                                      |
|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> ผู้ประกอบการขนาดกลางและเล็ก     | <input type="checkbox"/> ผู้ประกอบการขนาดใหญ่        |
| <input type="checkbox"/> ประชาชนผู้สนใจทั่วไป            | <input type="checkbox"/> เครือข่ายองค์กรชุมชน/สหกรณ์ |
| <input type="checkbox"/> นักวิจัย โปรดระบุหน่วยงาน ..... |                                                      |
| <input type="checkbox"/> อื่น ๆ โปรดระบุ .....           |                                                      |

**ตอนที่ 2 ข้อมูลการนำกล้าซื้อปลาร้าไปใช้**

5. เมื่อได้รับข้อมูลจากนักวิจัย ท่านมีความสนใจต่อโครงการพัฒนากระบวนการผลิตปลาร้าเพื่อเพิ่มอัตราการผลิตและสร้างอัตลักษณ์ของผลิตภัณฑ์หรือไม่
 

|                                  |                                      |                                   |                               |                                  |
|----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> สนใจมาก | <input type="checkbox"/> สนใจปานกลาง | <input type="checkbox"/> สนใจน้อย | <input type="checkbox"/> เฉยๆ | <input type="checkbox"/> ไม่สนใจ |
|----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
6. เพราะเหตุใดท่านถึงตัดสินใจเข้าร่วมทดลองใช้กล้าซื้อปลาร้าจากโครงการวิจัยดังกล่าว และมีความคาดหวังอย่างไร
 

.....

.....

.....
7. ท่านได้รับฟังการอธิบายวิธีการนำกล้าซื้อปลาร้าไปใช้อย่างถูกต้อง ก่อนนำไปใช้งานหรือไม่
 

|                              |                                 |
|------------------------------|---------------------------------|
| <input type="checkbox"/> ใช่ | <input type="checkbox"/> ไม่ใช่ |
|------------------------------|---------------------------------|

8. ท่านมีความเข้าใจเกี่ยวกับวิธีการนำกล้าเชื้อปลาร้าไปใช้ได้อย่างถูกต้องหรือไม่

☐ ใช่

☐ ไม่ใช่ และท่านได้สอบถามข้อมูลเพิ่มเติมจากนักวิจัยหรือไม่ ☐ ใช่ ☐ ไม่ใช่

โดยประเด็นที่ท่านไม่เข้าใจเกี่ยวกับการนำกล้าเชื้อปลาร้าไปใช้คือ

.....  
 .....

9. ท่านมีความพึงพอใจในลักษณะภายนอกของกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้ในระดับใด

☐ พอใจมาก ☐ พอใจปานกลาง ☐ พอใจน้อย ☐ เฉยๆ

☐ ไม่พอใจ เนื่องจาก .....

ข้อเสนอแนะ (ถ้ามี) .....

10. ท่านนำกล้าเชื้อปลาร้าไปใช้ในอัตราส่วน กล้าเชื้อ ..... ก้อน ต่อปลาที่เตรียมหมักปริมาณ ..... กิโลกรัม

11. ท่านนำกล้าเชื้อปลาร้าไปใช้กับปลาที่เตรียมหมักประเภท

☐ ปลาเดี่ยว โดยชนิดของปลา คือ ..... จากแหล่ง .....

☐ ปลาผสม/ปลารวม โดยชนิดของปลา คือ ..... จากแหล่ง .....

☐ อื่นๆ โปรดระบุ .....

12. โดยส่วนผสมอื่นๆ ที่ท่านใส่ลงในปลาที่เตรียมหมัก ได้แก่

☐ เกลือ จากแหล่ง ..... โดยเติมในปริมาณสัดส่วน..... ต่อปลา .....

☐ ร้า จากแหล่ง ..... โดยเติมในปริมาณสัดส่วน..... ต่อปลา .....

☐ อื่นๆ โปรดระบุ .....จากแหล่ง.....โดยเติมในปริมาณสัดส่วน.....ต่อปลา.....

13. ท่านนำกล้าเชื้อปลาร้าไปใช้กับปลาที่เตรียมจากข้อ 10. และข้อ 11. โดยใส่กล้าเชื้อเมื่อใด

☐ ทันที หลังจากเตรียมปลาในข้อ 10. และเติมส่วนผสมในข้อ 11.

☐ หลังจากผสมปลาในข้อ 10. และส่วนผสมในข้อ 11. และปล่อยให้หมักไปก่อนเป็นระยะเวลา

..... วัน

..... สัปดาห์

..... เดือน

☐ ตัดสินใจเติมกล้าเชื้อ เมื่อ .....

14. ท่านมีความพึงพอใจในความสะดวกต่อการใช้งานของกล้าเชื้อปลาร้าในระดับใด

☐ พอใจมาก ☐ พอใจปานกลาง ☐ พอใจน้อย ☐ เฉยๆ

☐ ไม่พอใจ เนื่องจาก .....

ข้อเสนอแนะ (ถ้ามี) .....



15. ข้อมูลเพิ่มเติมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการนำกล้าเชื้อปลาร้าไปใช้ (ถ้ามี)

.....

.....

.....

### ตอนที่ 3 ข้อมูลความพึงพอใจต่อผลการนำกล้าเชื้อปลาร้าไปใช้

16. ท่านสามารถสังเกตความเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมักปลาร้า หลังจากได้ทดลองใช้กล้าเชื้อหรือไม่

- ☐ กล้าเชื้อส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมักไปในทางที่ดีขึ้นอย่างชัดเจน (เชิงบวก)
- ☐ กล้าเชื้อส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมักไปในทางที่ค่อนข้างดีขึ้น
- ☐ กล้าเชื้อไม่ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ในระหว่างกระบวนการหมัก
- ☐ กล้าเชื้อส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมักไปในทางที่ค่อนข้างแย่ลง
- ☐ กล้าเชื้อส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมักไปในทางที่แย่ลงอย่างชัดเจน (เชิงลบ)

17. โปรดอธิบายลักษณะการเปลี่ยนแปลงโดยรวมที่ท่านสังเกตได้ในข้อ 16.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

18. หากกระบวนการหมักปลาร้าหลังจากได้ทดลองใช้กล้าเชื้อ เปลี่ยนแปลงไปในทางที่ค่อนข้างดีขึ้นหรือดีขึ้นอย่างชัดเจน ท่านสังเกตพบเปลี่ยนแปลงในลักษณะดังต่อไปนี้หรือไม่

- ☐ กล้าเชื้อสามารถช่วยลดระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก

โดยสามารถลดระยะเวลาที่ใช้จาก ..... เดือน เหลือ ..... เดือน

ท่านสังเกตได้ว่ากระบวนการหมักเสร็จสิ้น หรือเป็นที่น่าพอใจได้จากลักษณะ

.....

.....

.....

.....

.....

- ☐ กล้าเชื้อสามารถช่วยเพิ่มกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ปลาร้าที่ได้
- ☐ ทำให้มีกลิ่นรส      ☐ เหมือนเดิม      ☐ คล้ายเดิม
- ☐ ทำให้มีกลิ่นรสแปลกใหม่เกิดขึ้น

โดยท่านสังเกตได้ว่าเป็นกลิ่นรสที่น่าพอใจได้จากลักษณะกลิ่นแบบใด

.....

.....

.....

.....

- ☐ กล้าเชื้อสามารถช่วยพัฒนาสีในผลิตภัณฑ์ปลาร้าที่ได้
- ☐ ในส่วนเนื้อปลารายนอก      ☐ ในส่วนเนื้อปลารายใน      ☐ ในส่วนน้ำปลาร้า

โดยทำให้มีลักษณะเจดสี ☐ เหมือนเดิม      ☐ คล้ายเดิม      ☐ ทำให้มีสีแปลกใหม่เกิดขึ้น

โดยท่านสังเกตได้ว่าเป็นสีที่น่าพอใจได้จากลักษณะสีแบบใด

.....

.....

.....

.....

- ☐ กล้าเชื้อสามารถช่วยพัฒนาเนื้อสัมผัสในผลิตภัณฑ์ปลาร้าที่ได้
- ☐ ทำให้มีเนื้อสัมผัส      ☐ เหมือนเดิม      ☐ คล้ายเดิม
- ☐ ทำให้มีเนื้อสัมผัสที่ดีขึ้น

โดยท่านสังเกตได้ว่าเป็นเนื้อสัมผัสที่น่าพอใจได้จากลักษณะแบบใด

.....

.....

.....

.....

19. ท่านมีความพึงพอใจโดยรวมต่อกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้ที่ได้พัฒนาขึ้นจากโครงการวิจัยนี้ในระดับใด

- ☐ พอใจมาก      ☐ พอใจปานกลาง      ☐ พอใจน้อย      ☐ เฉยๆ

☐ ไม่พอใจ เนื่องจาก .....

ข้อเสนอแนะ (ถ้ามี) .....

20. หากมีการผลิตกล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้จากโครงการวิจัยนี้ในเชิงการค้า ท่านคิดว่าจะนำมาใช้ในกระบวนการผลิตของท่านหรือไม่

- ☐ พร้อมนำมาใช้ในกระบวนการผลิต โดย
- ☐ ยินดี หากจำเป็นต้องซื้อ
- ☐ ไม่ยินดี หากจำเป็นต้องซื้อ เนื่องจาก .....
- ☐ อาจจะพร้อมนำมาใช้ในกระบวนการผลิต หาก .....
- ☐ ยังไม่พร้อมนำมาใช้ในกระบวนการผลิต เนื่องจาก .....

21. ปัญหา/ข้อสงสัย เพิ่มเติม (ถ้ามี)

.....

.....

.....

.....

.....

22. ข้อเสนอแนะอื่นๆ เพื่อปรับปรุง (ถ้ามี)

.....

.....

.....

.....

.....

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณในความร่วมมือที่ท่านได้เสียสละเวลาให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในครั้งนี้

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

## ภาคผนวก ซ

## แบบทดสอบคุณภาพของส้มตำปลาร้า

ให้ตื้มน้ำก่อนเริ่มชิม ชิมตัวอย่างจากซ้ายไปขวา และ ให้กินขนมปังก่อน 1 แผ่น ตามด้วยน้ำ เพื่อล้างรสชาติในปาก ก่อนชิมตัวอย่างถัดไป ให้ตอบคำถามต่อไปนี้

1 = ไม่ชอบมากที่สุด      2 = ไม่ชอบมาก      3 = ไม่ชอบ      4 = ไม่ชอบเล็กน้อย      5 = เฉยๆ

6 = ชอบเล็กน้อย      7 = ชอบปานกลาง      8 = ชอบมาก      9 = ชอบมากที่สุด

|                              | 495                                                          | 712                                                          | 368                                                          |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| สีของน้ำปลาร้า               | .....                                                        | .....                                                        | .....                                                        |
| กลิ่นของน้ำปลาร้า            | .....                                                        | .....                                                        | .....                                                        |
| รสชาติของส้มตำปลาร้า         | .....                                                        | .....                                                        | .....                                                        |
| รสชาติของน้ำปลาร้า           | .....                                                        | .....                                                        | .....                                                        |
| ความชอบโดยรวม                | .....                                                        | .....                                                        | .....                                                        |
| ท่านยอมรับตัวอย่างได้หรือไม่ | <input type="checkbox"/> ได้ <input type="checkbox"/> ไม่ได้ | <input type="checkbox"/> ได้ <input type="checkbox"/> ไม่ได้ | <input type="checkbox"/> ได้ <input type="checkbox"/> ไม่ได้ |

รสนัวของส้มตำปลาร้า      495      ☐ ยังไม่นัว      ☐ นัวแล้ว

712      ☐ ยังไม่นัว      ☐ นัวแล้ว

368      ☐ ยังไม่นัว      ☐ นัวแล้ว

ให้ระบุลักษณะของตัวอย่างต่อไปนี้ ลงในเส้นตรง ด้านล่าง ดังตัวอย่างเช่น

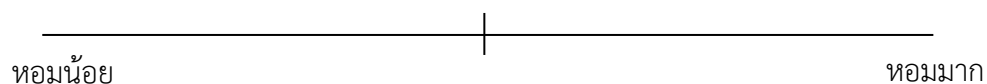


รหัสตัวอย่าง 495, 712 และ 368

รสเค็มของส้มตำปลาร้า



กลิ่นหอมของน้ำปลาร้า



ขอขอบคุณท่านที่สละเวลาทำแบบทดสอบ

**ภาคผนวก ฅ****บทความสำหรับเผยแพร่**

Vishal Chhetri, Chenujit Prakitchaiwattana and Sarn Settachaimongkon (2017). Halophilic bacteria from salty fermented foods as potential bio-preservative against *Staphylococcus aureus* contamination in foods. (Full research article) In : Food Innovation Asia Conference 2017 (FIAC 2017) *Innovative Food Science and Technology for Mankind: Empowering Research for Health and Aging Society*. 15-17 June 2017, Bitech Bangna Bangkok. Thailand.

## ภาคผนวก ก

### กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

#### การถ่ายทอดเทคโนโลยี

ในรูปแบบของการแนะนำเทคโนโลยีการใช้กล้าเชื้อปลาร้าโดยการทดลองใช้จริงในกระบวนการผลิตของผู้ประกอบการ ที่ผลิตเป็นวิสาหกิจขนาดกลาง และวิสาหกิจชุมชน

#### 1. การแนะนำเทคโนโลยีการใช้กล้าเชื้อปลาร้าโดยการทดลองใช้จริงในกระบวนการผลิตของผู้ประกอบการวิสาหกิจขนาดกลางที่ผลิตปลาร้าหมักแบบเติมน้ำ (SMF)

- ข้อมูลผู้ประกอบการ:
  - ชื่อผู้ประกอบการ นายวิโรจน์ บริษัทมิตรปลาร้าเงิน อำเภอปรางค์กู่ จังหวัดนครราชสีมา
- อัตราการผลิต: 1 ตันต่อวัน หมักในโถเอนกความจุ 250 กิโลกรัม
- การจำหน่าย: จำหน่ายให้กับพ่อค้าคนกลางเพื่อนำไปจำหน่ายปลีก
- รายรับเฉลี่ย: 300,000 บาทต่อเดือน
- รูปแบบการผลิต: ปลาร้าหมักแบบแบบเติมน้ำ (SMF)
- วัตถุดิบ: ปลาหมักเกลือจากเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์
- สูตรการผลิต: ปลา 100 กิโลกรัม เติมน้ำ 100 กิโลกรัม เติมเกลือ ที่ทำให้เกิดการหมักแบบ auto-fermentation เป็นเวลา 15 วัน (เริ่มหมัก 20 มกราคม 2560)
- กล้าเชื้อ: กล้าเชื้อพร้อมใช้สำหรับหมักแบบเติมน้ำ เติมน้ำในปลาร้าอัตราส่วน 40 กรัม ต่อปลาร้าสูตรเติมน้ำแล้วรวม 200 กิโลกรัม หลังจากนั้นเติมน้ำ 10 กิโลกรัม คนให้เข้ากัน ในวันที่ 3 กุมภาพันธ์ 2560
- ประเมินเทคโนโลยี : โดยการสัมภาษณ์ความพึงพอใจผ่านแบบสอบถาม (ภาคผนวก ก) ทุก 2 สัปดาห์



ภาพที่ ๑ ผู้ประกอบการผู้รับการทดสอบการหมักปลาร้าด้วยกล้าเชื้อในระดับการผลิต 100 กิโลกรัม

แจ้งให้ผู้ประกอบการเตรียมปลาร้าสูตรปกติ ในวันที่ 20 มกราคม 2560



ภาพที่ ๒ ชี้แจงลำดับการทดลองการหมักด้วยกล้าเชื้อ

วันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2560 นำกล้าเชื้อไปทดสอบการใช้งาน โดยทำความเข้าใจลำดับการทำงานก่อนการเริ่มกระบวนการ





(ก)



(ข)



(ค)



(ง)



(จ)

ภาพ ญ3 (ก-จ) เตรียมปลาร้าและเติมกล้าเชื้อ 40.5 กรัมต่อปลาร้าหลังเติมน้ำที่มีน้ำหนักรวม 200 กิโลกรัม เติมรำ และคนให้เข้ากัน



ภาพที่ ญ4 ปลาร้าหลังเติมกล้าเชื้อตั้งทิ้งไว้ตามกระบวนการปกติ

## ข้อมูลความพึงพอใจต่อผลการนำกล้าเชื้อปลาร้าไปใช้

สำหรับผู้ประกอบการรายนี้การลดระยะเวลาการหมักไม่มีส่วนในการเร่งกระบวนการผลิตเนื่องจากผู้ผลิตขายส่งไปยังพ่อค้าคนกลาง (ปกติมีผู้มารับไปจำหน่ายต่อหลังหมัก 15 วัน)

หลังจากใช้กล้าเชื้อพบว่าผู้ประกอบการเห็นว่าปลาร้าที่หมักด้วยกล้าเชื้อจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในปลาร้าเร็วกว่าปลาร้าที่ไม่เติมกล้าเชื้อและได้ปลาร้าที่สามารถจำหน่ายได้หลังการหมักในเวลา 1 เดือน ประเด็นที่สรุปจากการประเมินความพึงพอใจ มีดังนี้

1. กล้าเชื้อส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมักไปในทางที่ดีขึ้น
2. ลักษณะการเปลี่ยนแปลงโดยรวมที่ชัดเจน: เนื้อปลามีสีแดงมากขึ้นโดยเฉพาะส่วนที่ติดก้าง เนื้อปลานิ่มมากขึ้น
3. การเปลี่ยนแปลงในทางที่ดีขึ้นอย่างชัดเจน:
  - I. เนื้อปลามีสีแดงมากขึ้น
  - II. รูปแบบแบกกลิ่นรสคล้ายเดิมแต่มีกลิ่นหอมมากขึ้น
  - III. กล้าเชื้อสามารถช่วยพัฒนาสีในผลิตภัณฑ์ปลาร้าได้ ในส่วนเนื้อปลาภายใน ทำให้เนื้อแดงก้ำแดง
  - IV. ความพึงพอใจในเนื้อสัมผัสปลา มีความพอใจในเนื้อสัมผัส ปลานิ่มขึ้นแต่ไม่แข็งกระด้าง เนื้อไม่ยุ่ยไม่ยุบยังเป็นตัวตามต้องการเหมือนเดิม (ไม่ต้องการให้เนื้อปลายุ่ยหรือยุบเนื่องจากจะเสียน้ำหนัก)
4. ความพึงพอใจโดยรวม: มีความพึงพอใจปานกลาง
5. ความพร้อมในการใช้กล้าเชื้อปลาร้า: อาจจะพร้อมนำมาใช้ หากอยู่ในช่วงเร่งด่วนปลาร้าขาดตลาด ราคาที่พร้อมลงทุน กล้าเชื้อสำหรับหมักปลาร้า 100 กิโลกรัม สามารถรับได้ที่ราคา 100 บาท

## 2. การแนะนำเทคโนโลยีการใช้กล้ำเชื้อปลาร้าโดยการทดลองใช้จริงในกระบวนการผลิตของผู้ประกอบการ วิสาหกิจขนาดกลางที่ผลิตปลาร้าหมักแบบหมักแห้ง (SSF) แบบทั่วไป

ดำเนินกิจกรรม วันที่ 26 มกราคม 2560

### ● ข้อมูลผู้ประกอบการ:

○ กลุ่มวิสาหกิจชุมชน กลุ่มแม่บ้านเกษตรกรท่าตุม หัวหมากกลุ่ม นางวนิดา โคตรศาลา อำเภอมะนัง จังหวัดอุดรธานี

- อัตราการผลิต: 10 ตันต่อรอบการผลิต หมักปลา 100 กิโลกรัม ในโอ่งมังกรความจุ 400 กิโลกรัม
- การจำหน่าย: ผลิตปลาร้าเพื่อแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์: ปลาร้าบอง ปลาร้าตัวในน้ำเกลือ น้ำปลาร้า ส้มตำ เป็นต้น
- รายรับเฉลี่ย: 150,000 บาทต่อเดือน
- รูปแบบการผลิต: ปลาร้าหมักแบบแห้ง (SSF) แบบทั่วไป
- วัตถุดิบ: ปลาตะเพียนขนาดใหญ่จากกระชังแม่น้ำโขง
- สูตรการผลิต: ปลา 100 กิโลกรัม เติมน้ำเกลือ 3 ส่วน รำ 1 ส่วน ซึ่งให้เกิดการหมักแบบ auto-fermentation เป็นเวลา 1.5 เดือน (เริ่มหมัก 10 ธันวาคม 2559)
- กล้ำเชื้อ: กล้ำเชื้อพร้อมใช้สำหรับหมักแบบ SSF แบบทั่วไป เติมน้ำลงในปลาร้าอัตราส่วน 40 กรัม ต่อ ปลา 100 กิโลกรัม คนให้เข้ากัน ในวันที่ 26 มกราคม 2560
- ประเมินเทคโนโลยี : โดยการสัมภาษณ์ความพึงพอใจผ่านแบบสอบถาม ทุก 2 หรือ 4 สัปดาห์





ภาพที่ ๕5 ผู้ประกอบการผู้รับการทดสอบการหมักปลาร้าด้วยกล้าเชื้อในระดับการผลิต 100 กิโลกรัม

เป็นผู้ผลิตปลาร้าในโรงงานที่ได้รับการรับรอง GMP เพื่อแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ



ภาพที่ ๖6 ชี้แจงลำดับการทดลองการหมักด้วยกล้าเชื้อ



(ก)



(ข)





(ค)

ภาพที่ ๗ (ก-ค) เตรียมปลาร้าปลาเตรียมตามสูตรปกติและทิ้งให้เกิด auto-fermentation เป็นเวลา 1.5 เดือน และเติมกล้าเชื้อ 40.5 กรัม ต่อปลาร้า 100 กิโลกรัม คนให้เข้ากัน



ภาพที่ ๘ ปลาร้าหลังเติมกล้าเชื้อที่ตั้งทิ้งไว้ตามกระบวนการปกติ

หลังจากใช้กล้าเชื้อพบว่าผู้ประกอบการเห็นว่าปลาร้าที่หมักด้วยกล้าเชื้อจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในปลาร้าเร็วกว่าปลาร้าที่ไม่เติมกล้าเชื้อและได้ปลาร้าที่สามารถจำหน่ายได้หลังการหมักในเวลา 2 เดือน ซึ่งรวมเวลาการผลิตแล้วสามารถลดเวลาในการหมักสั้นลงกว่าร้อยละ 50 (การผลิตดั้งเดิมใช้เวลา 8 เดือน) ประเด็นที่สรุปจากการประเมินความพึงพอใจ มีดังนี้

1. กล้าเชื้อส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมักไปในทางที่ดีขึ้น
2. ลักษณะการเปลี่ยนแปลงโดยรวมที่ชัดเจน: เนื้อปลามีสีแดงมากขึ้นโดยเฉพาะส่วนที่ติดก้าง เนื้อปลานิ่มไม่ยุบ

### 3. การเปลี่ยนแปลงในทางที่ดีขึ้นอย่างชัดเจน:

- I. เนื้อปลามีสีแดงมากขึ้น
  - II. รูปแบบแบกกลี้นรสคล้ายเดิมแต่มีกลิ่นหอมเร็วขึ้น
  - III. กล้าเชื้อสามารถช่วยพัฒนาสีในผลิตภัณฑ์ปลาร้าได้ ในส่วนเนื้อปลาภายใน ทำให้เนื้อแดงมากขึ้น
  - IV. ความพึงพอใจในเนื้อสัมผัสปลา มีความพอใจในเนื้อสัมผัส ปลาน้ำขึ้นแต่ไม่แข็งกระด้าง เนื้อไม่ยุ่ยไม่ยุบยังเป็นตัวตามต้องการเหมือนเดิม (ไม่ต้องการให้เนื้อปลายุบหรือยุบเนื่องจากจะเสียน้ำหนัก เมื่อนำไปแปรรูปจะทำให้ได้ผลิตน้อย)
4. ความพึงพอใจโดยรวม: มีความพึงพอใจมาก และสนใจที่จะผลิตอย่างจำเพาะเพื่อนำไปผลิตปลาร้ารูปแบบใหม่ที่พัฒนาขึ้นในโครงการวิจัย คือ ปลาร้าฟูทรงเครื่อง
5. ความพร้อมในการใช้กล้าเชื้อปลาร้า: มีความสนใจหากราคากล้าเชื้อไม่สูงเกินไป

### 3. การถ่ายทอดกระบวนการผลิตปลาร้าฟูทรงเครื่องให้กับผู้รับถ่ายทอดตามสัญญาโครงการ

ดำเนินกิจกรรม วันที่ 11 มิถุนายน 2560

#### ● ข้อมูลผู้ประกอบการ:

○ กลุ่มวิสาหกิจชุมชน กลุ่มแม่บ้านเกษตรกรท่าตุม หัวหน้ากลุ่ม นางวนิดา ไครตศาลา อำเภอมือง จังหวัดอุดรธานี

- อัตราการผลิต: 10 ตันต่อรอบการผลิต หมักปลา 100 กิโลกรัม ในโองมั่งกรความจุ 400 กิโลกรัม
- การจำหน่าย: ผลิตปลาร้าเพื่อแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์: ปลาร้าบอง ปลาร้าตัวในน้ำเกลือ น้ำปลาร้าส้มตำ เป็นต้น
- รายรับเฉลี่ย: 150,000 บาทต่อเดือน
- รูปแบบการผลิต: ปลาร้าหมักแบบแห้ง (SSF) แบบทั่วไป
- วัตถุดิบ: ปลาตะเพียนขนาดใหญ่จากกระชังแม่น้ำโขง
- สูตรการผลิต: ปลา 100 กิโลกรัม เติมเกลือ 3 ส่วน ร้า 1 ส่วน ทั้งให้เกิดการหมักแบบ auto-fermentation เป็นเวลา 1.5 เดือน (เริ่มหมัก 10 ธันวาคม 2559)
- กล้าเชื้อ: กล้าเชื้อพร้อมใช้สำหรับหมักแบบ SSF แบบทั่วไป เติมลงในปลาร้าอัตราส่วน 40 กรัม ต่อปลาร้า 100 กิโลกรัม คนให้เข้ากัน ในวันที่ 26 มกราคม 2560
- นำปลาร้าที่ได้จากการหมักด้วยกล้าเชื้อมาผลิตเป็นปลาร้าฟูทรงเครื่อง ในวันที่ถ่ายทอดเทคโนโลยี





ภาพที่ ๘ ภาพประกอบการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตปลาร้าฟูทรงเครื่อง

ผู้ประกอบการมีความพึงพอใจมาก และได้ขอใช้ประโยชน์จากโครงการเพื่อผลิตปลาร้าฟูทรงเครื่องเพื่อนำไปจำหน่ายในงาน อีสานเอกซ์โป เดือนมิถุนายน 2560 ที่อิมแพคเมืองทองธานี

## ภาคผนวก ก

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ

| กิจกรรม*                                                                                                                     | เดือนที่ |     |     |       | ผลที่ได้รับ<br>(% สำเร็จ) |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----|-----|-------|---------------------------|
|                                                                                                                              | 1-3      | 4-6 | 7-9 | 10-12 |                           |
| 3.1 สํารวจข้อมูลการผลิตปลาร้าและการเก็บตัวอย่าง                                                                              |          |     |     |       |                           |
| - การศึกษากรรมวิธีผลิตปลาร้า คุณลักษณะของปลาร้า ในพื้นที่<br>จังหวัด นครราชสีมาและชัยภูมิ                                    | ←→       |     |     |       | 100                       |
| - การศึกษากรรมวิธีผลิตปลาร้า คุณลักษณะของปลาร้า ในพื้นที่<br>จังหวัด อุตรธานีและหนองคาย                                      | ←→       |     |     |       | 100                       |
| - การศึกษากรรมวิธีผลิตปลาร้า คุณลักษณะของปลาร้า ในพื้นที่<br>จังหวัด สกลนครและนครพนม                                         | ←→       |     |     |       | 100                       |
| - การศึกษาอัตลักษณ์และวิเคราะห์หาสารที่สามารถใช้เป็นตัว<br>บ่งชี้ทางชีวภาพ (Bio-markers) และจัดทำฐานข้อมูล                   | ←→       |     |     |       | 100                       |
| 3.2 ศึกษารูปแบบการหมักและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการ<br>หมักปลาร้าเพื่อการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตโดยการเร่ง<br>กระบวนการหมัก | ←→       | ←→  |     |       | 100                       |
| 3.3 การพัฒนาถ้ำเชื้อปลาร้าเพื่อใช้เร่งกระบวนการหมัก                                                                          |          | ←→  | ←→  |       | 100                       |
| 3.4 การพัฒนาผลิตภัณฑ์รูปแบบใหม่จากปลาร้าที่ได้จากการ<br>หมักด้วยถ้ำเชื้อ                                                     |          |     |     | ←→    | 100                       |

## เป้าหมายของผลผลิต (output) และตัวชี้วัด

| ผลผลิต                                                                                         | ตัวชี้วัดเป้าหมาย |                                                                                                                                                                                 |      | ผลที่ได้รับ<br>(%สำเร็จ) |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|--------------------------|
|                                                                                                | เชิงปริมาณ        | เชิงคุณภาพ                                                                                                                                                                      | เวลา |                          |
| 1. กล้าเชื้อสำหรับเร่งหมักปลาร้าพร้อมใช้                                                       | 3 ชนิด            | กล้าเชื้อสำหรับหมักปลาร้าตามกระบวนการผลิตในแต่ละพื้นที่ 3 ชนิด                                                                                                                  | 1 ปี | 100                      |
| 2. คู่มือการผลิตปลาร้าโดยใช้กล้าเชื้อ                                                          | 1 กระบวนการ       | คู่มือแสดงกระบวนการผลิตปลาร้า 3 แบบ โดยใช้กล้าเชื้อที่พัฒนาได้เพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีแก่ผู้ประกอบการในแต่ละพื้นที่                                                                | 1 ปี | 100                      |
| 3. ผลิตภัณฑ์ปลาร้ารูปแบบใหม่                                                                   | 2 ชนิด            | 3.1 ปลาร้าผงพร้อมปรุงจากปลาร้าแท้ 100%<br>3.2 ปลาร้าฟูทรงเครื่อง                                                                                                                | 1 ปี | 100                      |
| 4. แผนธุรกิจของกล้าเชื้อและผลิตภัณฑ์ปลาร้าที่พัฒนาได้ ในรูปแบบ Research Commercialization Plan | 1 แผน             | แผนการนำผลงานวิจัยไปสู่เชิงพาณิชย์ สำหรับใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาธุรกิจ                                                                                                          | 1 ปี | 100                      |
| 5. Out put เพิ่มเติม<br>ยื่นจดสิทธิบัตรเพื่อปกป้องสิทธิทางปัญญาให้กับผู้รับถ่ายทอดเทคโนโลยี    | 2 เรื่อง          | 1.ยื่นจดสิทธิบัตร เรื่อง กล้าเชื้อปลาร้าพร้อมใช้สำหรับเร่งการหมักปลาร้าและกรรมวิธีการผลิต<br>2.ยื่นจดสิทธิบัตร เรื่อง กรรมวิธีการผลิตปลาร้าโดยการเร่งกระบวนการหมักด้วยกล้าเชื้อ | 1 ปี | 100                      |

## ภาคผนวก ก

### การผลิตปลาร้าผงด้วยการทำแห้งแบบลูกกลิ้งคู่ (Drum Dryer)

ผศ.ดร.ปรรัตน์ ศุภมิตรโยธิน

#### บทคัดย่อ

การศึกษากระบวนการผลิตปลาร้าผง โดยผลิตเป็นน้ำปลาร้าเข้มข้น โดยผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที การใช้ปลาร้าสูตรควบคุม เปรียบเทียบกับปลาร้าที่เติมหัวเชื้อ พบว่า ปลาร้าในสูตรควบคุมมีร้อยละผลผลิต 62.5 และปลาร้าสูตรหัวเชื้อมีร้อยละผลผลิต 70-72 ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) การทำแห้งปลาร้าเข้มข้นโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบลูกกลิ้งคู่ พบว่าการเติมข้าวคั่วร้อยละ 5 เป็นสถานะที่ได้รับคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสมากที่สุด โดยมีร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 33.90 ปลาร้าผงที่ได้มีองค์ประกอบ ดังนี้ความชื้นร้อยละ 6.71 โปรตีนร้อยละ 35.66 ไขมันร้อยละ 13.68 เยื่อใยร้อยละ 3.19 เกลือร้อยละ 28.5 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 12.23  $a_w$  0.53 pH 5.57 จุลินทรีย์ทั้งหมด  $2 \times 10^3$  และยีสต์รา 150 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม ซึ่งผ่านเกณฑ์มาตรฐาน มพช. ปลาร้าผง (134/2546) เมื่อเปรียบเทียบการนำปลาร้าชุดควบคุมและชุดที่เติมหัวเชื้อมาปรุงอาหารเป็นแกงเห็ด ปลาร้าสดชุดที่เติมหัวเชื้อใช้เป็นส่วนประกอบร้อยละ 10 ได้รับคะแนนความชอบด้านสี รสชาติและความชอบโดยรวมสูงกว่าชุดควบคุม แต่กลิ่นไม่มีความแตกต่างกัน สำหรับปลาร้าผงสูตรที่ผลิตจากปลาร้าที่เติมหัวเชื้อและเติมข้าวคั่วที่ร้อยละ 5 (ของน้ำปลาร้าเข้มข้น) นำมาเป็นส่วนประกอบในแกงเห็ดที่ร้อยละ 2.5 ได้รับคะแนนความชอบสูงกว่าปลาร้าผงในสูตรควบคุมในด้านกลิ่น รสชาติและความชอบโดยรวม แต่ความชอบด้านสีไม่มีความแตกต่างกัน ผลการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคในการปรุงแกงเห็ด จำนวนผู้ทดสอบ 40 คน ผู้ทดสอบให้การยอมรับตัวอย่างปลาร้าในทุกชุดการทดลอง เมื่อพิจารณาจากจำนวนผู้ให้การยอมรับ พบว่าปลาร้าสดที่ใช้หัวเชื้อในการหมักได้รับคะแนนการยอมรับมากที่สุด ตามด้วยปลาร้าผงที่ได้จากสูตรหัวเชื้อ จึงอาจกล่าวได้ว่า ปลาร้าสดและปลาร้าผงที่ผลิตจากหัวเชื้อมีคุณภาพเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

## ที่มาและความสำคัญ

ปลาร้าเป็นอาหารกลุ่มปรุงรส ที่อยู่คู่กับวัฒนธรรมการบริโภคที่อยู่คู่กับวัฒนธรรมการบริโภคที่อยู่กับสังคมไทยมาเป็นระยะเวลาที่ยาวนาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งประชากรในภาคอีสานร้าเป็นรูปแบบการถนอมอาหารอย่างหนึ่งของชาวบ้านตั้งแต่ดั้งเดิม สามารถเก็บไว้รับประทานได้ระยะนาน โดยปลาร้าสามารถนำมาบริโภคได้โดยตรง และสามารถใช้เป็นเครื่องปรุงในอาหารพื้นบ้านของภาคอีสานและภาคเหนือ เพื่อทำการปรุงแต่งรสชาติของอาหารให้มีความกลมกล่อม เช่น ส้มตำปูปลาร้า แกงอ่อม น้ำพริก ปลาร้าสับ และแกงชนิดต่างๆตามความนิยมของผู้บริโภคในพื้นที่นั้นๆ ปลาร้ามีรูปแบบการบริโภคหลากหลายชนิด เช่น ปลาร้าทั้งตัว ปลาร้าชิ้น ปลาร้าบด หรือดัดแปลงให้อยู่ในรูปปลาร้าผงปัจจุบันการบริโภคปลาร้ายังคงเป็นที่นิยมไม่เสื่อมคลายไปจากสังคมพื้นบ้านของไทยตลอดจนสังคมเมือง และเป็นที่รู้จักของรสชาติปลาร้าที่ผ่านการปรุงแต่งเป็นอาหารชนิดต่างๆ แต่ด้วยความที่ปลาร้าเป็นอาหารจำพวกหมักดองที่มีกลิ่นค่อนข้างรุนแรง และเมื่ออยู่ในรูปแบบของปลาที่มีน้ำเป็นส่วนผสม ทำให้ประสบปัญหาเกี่ยวกับขั้นตอนการปรุงแต่งรสชาติอาหารสำหรับกลุ่มคนที่อยู่ในสังคมเมือง หรือเกิดปัญหาขึ้นระหว่างการขนส่ง เมื่อเกิดการหกหรือรั่วซึม เกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ขึ้น ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงได้มีแนวคิดนำปลาร้าทำปลาร้าผงด้วยเครื่องทำแห้งแบบลูกกลิ้งคู่ Drum dryer โดยใช้ข้าวคั่วเป็นตัวพองช่วยในการทำแห้งเนื่องจากข้าวคั่วเป็นส่วนประกอบของการผลิตปลาร้าอยู่แล้ว ซึ่งผลศึกษามีดังนี้

## วัสดุและอุปกรณ์

1. ปลาร้า ที่ผลิตจากอำเภอปรางค์ชัย จังหวัดนครราชสีมา หมักโดยกลุ่มผู้ประกอบการปลาร้าวิโรจน์ ซึ่งใช้ปลาสร้อยและปลาขาวหมักเกลือจากเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ หมักเมื่อวันที่ 20 มกราคม 2560 แบ่งออกเป็นปลาร้าชุดควบคุมที่ไม่เติมหัวเชื้อ (P1) ปลาร้าที่เติมหัวเชื้อ 1 (P2) และปลาร้าที่ผ่านการเตรียมหัวเชื้อ 2 (P3) เติมร้าและกล้าเชื้อเมื่อวันที่ 6 กุมภาพันธ์ 2560
2. ข้าวคั่ว ได้จากข้าวขาวตาแห้ง นำมาคั่วให้ร้อนบนกระทะจนสุกเหลืองอ่อน บดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 Mesh
3. เครื่องทำแห้งแบบลูกกลิ้งคู่ Drum Dryer รุ่น DOFM 19/26 บริษัท โอเนอร์ฟู้ด

## วิธีการทดลอง

### ตอนที่ 1 การเตรียมปลาร้าเข้มข้น

การศึกษาการผลิตปลาร้าผงดด้วยการทำแห้งแบบลูกกลิ้งคู่ ปลาร้าที่ใช้ในการศึกษาคือ แบ่งออกเป็น ปลาร้าชุดควบคุม (P1) และปลาร้าที่ผ่านการเติมหัวเชื้อ 1 (P2) และปลาร้าที่ผ่านการเตรียมหัวเชื้อ 2 (P3) เมื่อการหมักผ่านไป 1 เดือน ทำให้ได้ปลาร้ามีคุณภาพเป็นไปตามคุณภาพที่ผู้ผลิตต้องการ คือมีสีแดง กลิ่นหอมของปลาร้าเพิ่มขึ้น กลิ่นคาวปลาสดลดลงและเนื้อสัมผัสปลาร้าเริ่มนิ่ม จึงนำปลาร้าที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพเบื้องต้น ได้แก่ pH และความเค็ม โดยใช้ salinometer และนำปลาร้าที่ได้ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นและกรองแยกกาก จะได้เป็นน้ำปลาร้าเข้มข้น ตรวจสอบปริมาณผลผลิตที่ได้

### ตอนที่ 2 การทำแห้งน้ำปลาร้าเข้มข้น

นำน้ำปลาร้าเข้มข้นที่ได้จากตอนที่ 1 มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำแห้งแบบลูกกลิ้งคู่ โดยแบ่งสภาวะการทดลองออกเป็น 6 สภาวะ การเติมข้าวคั่วที่ร้อยละ 25 และที่ร้อยละ 5 (แสดงดังตารางที่ 1) นำไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบลูกกลิ้งคู่ ที่อุณหภูมิลูกกลิ้ง 120 – 130 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 0.5 rpm ระยะห่างลูกกลิ้ง 0.5 มิลลิเมตร นำตัวอย่างปลาร้าที่ได้ไปปั่นโดยใช้เครื่องปั่นอาหารแบบแห้ง ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 100 Mesh และบรรจุในถุงอลูมิเนียมและปิดผนึก

ตารางที่ ๑๑ สภาวะการทำแห้งปลาร้าผงดแบบลูกกลิ้งคู่

| Treatment | ปลาร้าสูตร               | น้ำปลาร้าเข้มข้น | ข้าวคั่วบดละเอียด |
|-----------|--------------------------|------------------|-------------------|
| 1         | ควบคุม (P1)              | 75               | 25                |
| 2         | ควบคุม (P1)              | 95               | 5                 |
| 3         | เติมหัวเชื้อ 1 (P2)      | 75               | 25                |
| 4         | เติมหัวเชื้อ 1 (P2)      | 95               | 5                 |
| 5         | การเตรียมหัวเชื้อ 2 (P3) | 75               | 25                |
| 6         | การเตรียมหัวเชื้อ 2 (P3) | 95               | 5                 |

ตรวจสอบคุณภาพทางเคมี กายภาพ จุลินทรีย์และประสาทสัมผัสของปลาร้าผง

1. ด้านกายภาพ ได้แก่ ลักษณะปรากฏ สี
2. ด้านเคมี ได้แก่ ความชื้น ไขมัน เถ้า โปรตีน เยื่อใย คาร์โบไฮเดรต  $a_w$  pH ตามวิธี AOAC
3. ด้านจุลินทรีย์ ได้แก่ จุลินทรีย์ทั้งหมด และยีสต์รา ตามวิธี BAM
4. ด้านประสาทสัมผัส ได้แก่ ความชอบ 9-point hedonic scale และการยอมรับ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด Completed Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan ด้วยโปรแกรม SPSS และคัดเลือกสถานะที่เหมาะสม ที่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน ปลาร้าผง 134/2546 และเป็นสูตรที่ได้รับการยอมรับทางประสาทสัมผัสเพื่อนำไปใช้ในตอนที่ 3

### ตอนที่ 3 การทดสอบการยอมรับของปลาร้าสูตรควบคุมและสูตรเติมหัวเชื้อเมื่อใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร

ทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส โดยเปรียบเทียบระหว่างปลาร้าสด ปลาร้าผง ทั้งชุดควบคุมและสูตรที่เติมหัวเชื้อแสดงในตารางที่ 2 โดยนำมาใช้ในการปรุงน้ำแกงเห็ด ประกอบด้วย

**ตารางที่ ๒** การทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคโดยเปรียบเทียบระหว่างปลาร้าในชุดควบคุมกับปลาร้าที่เติมหัวเชื้อในรูปปลาร้าสดและปลาร้าผง

| Treatment | ตัวอย่าง             |
|-----------|----------------------|
| 1         | ปลาร้าสดชุดควบคุม    |
| 2         | ปลาร้าสดเติมหัวเชื้อ |
| 3         | ปลาร้าผงชุดควบคุม    |
| 4         | ปลาร้าผงเติมหัวเชื้อ |

ส่วนประกอบของน้ำแกงเห็ด ประกอบด้วย

1. น้ำ 3000 มิลลิลิตร
2. น้ำใบย่านาง 500 มิลลิลิตร
3. พริกชี้ฟ้าแดง 30 กรัม
4. หอมแดง 50 กรัม
5. กระเทียม 50 กรัม

6. ใบมะกรูด 5 กรัม
7. ตะไคร้ 10 กรัม
8. ฟักทอง 50 กรัม
9. บวบ 50 กรัม
10. เห็ดนางฟ้า 100 กรัม
11. เห็ดฟาง 100 กรัม
12. เห็ดเข็มทอง 100 กรัม
13. เห็ดโคนญี่ปุ่นดำ 100 กรัม
14. เห็ดโคนญี่ปุ่นขาว 100 กรัม
15. เห็ดออริจิ 100 กรัม
16. ข้าวโพดฟักอ่อน 50 กรัม
17. ใบแมงลัก 50 กรัม

## วิธีทำ

นำน้ำใส่หม้อพร้อมตะไคร้ ใบมะกรูด ต้มไฟปานกลาง 10 นาที นำพริก หอม กระเทียม โคลงและ เติมลงไป จากนั้นใส่น้ำใบย่านางต้มด้วยไฟปานกลางให้เดือด 5 นาที ใส่ส่วนผสมของผักและเห็ดลงไปต้มให้เดือด 10 นาที ปิดแก๊สและเติมน้ำปลาร้าลงไป โดยในสูตรน้ำแกง 2 กิโลกรัม ปลาร้าสดจะใช้จำนวน 200 กรัม และปลาร้าผงจะใช้จำนวน 50 กรัม จากนั้นเติมใบแมงลักและส่วนผสมให้เข้ากัน จัดการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค ในสูตรนี้จะใช้ปลาร้าปรุงรสโดยไม่มีการเติมน้ำปลา หรือผงชูรส

นำแกงเห็ดที่ได้เสร็จตัวอย่างให้กับผู้ทดสอบ โดยเลขสุ่มสามหลักแทนรหัสตัวอย่าง ทำการสุ่มลำดับการเสร็จตัวอย่าง ใช้แบบทดสอบความชอบ 9-point hedonic scale คะแนน 1-9 โดย 1 คือ ไม่ชอบมากที่สุด 2 ไม่ชอบมาก 3 ไม่ชอบปานกลาง 4 ไม่ชอบเล็กน้อย 5 เฉยๆ 6 ชอบเล็กน้อย 7 ชอบปานกลาง 8 ชอบมาก 9 ชอบมากที่สุด นำคะแนนการยอมรับที่ได้วิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของรสเค็มและกลิ่นหอมเมื่อนำปลาร้าไปปรุงเป็นแกงเห็ดจะใช้แบบประเมินแบบเส้น scale 15 โดย 7.5 คือเค็มพอดีและหอมพอดี ถ้าค่าที่ได้น้อยกว่า 7.5 คือความเข้มข้นระดับน้อยเกินไปและถ้าสูงกว่า 7.5 คือเข้มข้นมากเกินไป



## ภาคผนวก ง

### การเตรียมปลาร้าสำหรับทดสอบทางประสาทสัมผัส

#### 1. การทำปลาร้าบอง

ปลาร้าที่ใช้ในการศึกษาในขั้นตอนนี้แบ่งออกเป็น 3 ชุด คือ ปลาร้าควบคุม, ปลาร้าเติมหัวเชื้อ และปลาร้าแม่  
ตุ๋ย

- ปลาร้าควบคุม หมายถึง ปลาร้าหมักด้วยวิธีปกติอายุ 5 เดือน ซึ่งหมักโดยนางวนิดา โคตร  
ศาลา ประธานกลุ่มวิสาหกิจชุมชนท่าตูม ซึ่งใช้ปลานิลหมักกับเกลือสินเธาว์บ้านดุง และรำ  
ข้าว โดยใช้ปลา 100 กิโลกรัม เกลือ 3 ส่วน รำ 1 ส่วน หมักวันที่ 10 ธันวาคม 2559
- ปลาร้าเติมหัวเชื้อ หมายถึง ปลาร้าที่หมักด้วยวิธีเร่งกระบวนการหมักด้วยกล้ำเชื้อซึ่งหมัก  
โดยนางวนิดา โคตรศาลา ประธานกลุ่มวิสาหกิจชุมชนท่าตูม โดยใช้ปลานิลหมักกับเกลือ  
สินเธาว์บ้านดุง และรำข้าว โดยใช้ปลา 100 กิโลกรัม เกลือ 3 ส่วน รำ 1 ส่วน หมักวันที่ 10  
ธันวาคม 2559 เติมกล้ำเชื้อหลังการหมักแบบปกติ 2 เดือน ในวันที่ 26 มกราคม 2560
- ปลาร้าแม่ตุ๋ย หมายถึง ปลาร้าหมักด้วยวิธีปกติอายุ 12 เดือน ซึ่งหมักโดยนางวนิดา โคตร  
ศาลา ประธานกลุ่มวิสาหกิจชุมชนท่าตูม ซึ่งใช้ปลานิลหมักกับเกลือสินเธาว์บ้านดุง และรำ  
ข้าว โดยใช้ปลา 100 กิโลกรัม เกลือ 3 ส่วน รำ 1 ส่วน

ทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส โดยเปรียบเทียบระหว่างปลาร้าควบคุม, ปลาร้าเติมหัวเชื้อ  
และปลาร้าแม่ตุ๋ย เมื่อใช้เป็นส่วนผสมของปลาร้าบองซึ่งมีส่วนผสมและวิธีทำดังนี้

#### ส่วนผสมปลาร้าบอง

|                               |     |          |
|-------------------------------|-----|----------|
| 1. ปลาร้า                     | 500 | กรัม     |
| 2. ข้าวแก่ปอกเปลือกสับละเอียด | 3   | ช้อนโต๊ะ |
| 3. ตะไคร้ซอย                  | 1/3 | ถ้วย     |
| 4. เนื้อมะขามเปียกสับละเอียด  | 20  | กรัม     |
| 5. หอมแดง                     | 10  | หัว      |
| 6. กระเทียมไทย                | 2   | หัว      |
| 7. พริกชี้หนูแห้งคั่วป่น      | 2   | ช้อนโต๊ะ |
| 8. ใบมะกรูดซอย                | 1/4 | ถ้วย     |

### วิธีทำปลาร้าบอง



ล้างปลาร้าให้สะอาดแล้วนำไปนึ่ง 15 นาที



แกะเนื้อปลาร้ามาสับผสมรวมกับข้าว ตะไคร้ และเนื้อมะขามเปียก



โขลกหอมและกระเทียมอย่างให้เข้ากันดีแล้วใส่ส่วนผสมของเนื้อปลาร้าสับ พริกป่น และใบมะกรูดหั่นฝอยลงไปโขลกให้เข้ากัน



ใส่น้ำมันพืชลงในกระทะ ยกขึ้นตั้งไฟ ใส่ส่วนผสมที่โขลกจนเข้ากันลงไปผัดให้สุก

ภาพที่ ฐ1 ขั้นตอนการผลิตปลาร้าบอง

## 2. น้ำปลาร้าทำส้มตำและส้มตำ

### สูตรน้ำปลาร้า

1. น้ำปลาร้า 1,040 g
2. กะปิ 30 g
3. มะขามเปียก 45 g
4. ชูรส 20 g
5. สับปะรด 245 g(หั่นเป็นชิ้นเล็กๆแล้วบีบน้ำกับเนื้อใส่)
6. น้ำกระเทียมดอง 2 กระบวย
7. คนอร์1 ก้อน
8. น้ำอ้อยก้อนนำมาทุบ ใส่ให้เต็ม 1 กระบวย

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันแล้วนำมาต้มให้เดือดแล้วปิดไฟ พักให้เย็น

### สูตรส้มตำปลาร้า

1. มะละกอ 500 g
2. พริกสด ½ ช้อนชา พริกแห้ง ½ ช้อนชา
3. กระเทียม ¼ ช้อนชา
4. ผงชูรส ½ ช้อนชา
5. น้ำมะนาว 3 ช้อนโต๊ะ น้ำปลาร้า 5 ช้อนโต๊ะ น้ำปลา 1 ช้อนโต๊ะ น้ำมะขาม 1 ช้อนโต๊ะ
6. น้ำตาล ¼ ช้อนชา
7. มะเขือเทศ 8 ชิ้น

## ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ข้อมูลโปรไฟล์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในตัวอย่างปลาร้าที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ (accelerated fermentation using selective starter cultures)

การอภิปรายผลดังแสดงในหัวข้อ 1 ถึง 4 ตามลำดับ

1. รายการตัวอย่างปลาร้าที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้และ analysis codes (12 samples)

ผู้วิจัยได้ดำเนินการทดสอบคุณสมบัติการหมักและคุณภาพของกล้าเชื้อที่คัดเลือกตัวอย่างปลาร้า ซึ่งเป็นตัวแทนของเขตพื้นที่การผลิตทั้ง 3 เขต ดังอภิปรายในหัวข้อ 2.4 ได้แก่

- กลุ่มวิสาหกิจชุมชนปลาร้าท่าตูม อำเภอเมือง จังหวัดอุดรธานี
- วิสาหกิจรายย่อยผลิตปลาร้าสำหรับทำน้ำปลาร้าส้มตำ อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร
- วิสาหกิจรายย่อย มิตรปลาร้าเงิน อำเภอปทุมธานี จังหวัดนครราชสีมา

หลังจากที่การหมักเกิดขึ้นเสร็จสมบูรณ์ ได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างเป็นจำนวน 12 ตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย (volatile metabolite) ดังแสดงในตารางที่ 14

**ตารางที่ ๗1** ข้อมูลตัวอย่างปลาร้าตัวแทนจากเขตพื้นที่การผลิตต่าง ๆ ที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ เพื่อมาวิเคราะห์ปริมาณสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายด้วยเทคนิค Headspace SPME-GC/MS

| รหัส GC/MS                                                   | รหัส ตัวอย่าง | อำเภอ/ จังหวัด*      | ชนิดปลาร้า/ปลา/แหล่ง น้ำ                       | ประเภทการหมัก   | หมายเหตุ                  |
|--------------------------------------------------------------|---------------|----------------------|------------------------------------------------|-----------------|---------------------------|
| 51                                                           | UN            | เมือง/ อุดรธานี      | ปลาร้าตัว ปลานิล กระชังน้ำโขง                  | SSF แบบทั่วไป   | Control (ไม่ใส่กล้าเชื้อ) |
| 52                                                           | UN            |                      |                                                |                 | 10 kg Chula-1             |
| 53                                                           | UN            |                      |                                                |                 | 10 kg Chula-2             |
| 54                                                           | SN            | เมือง/ สกลนคร        | ปลาร้ารวม ปลาขาว/ปลาตะเพียน ฯลฯ แม่น้ำสงคราม   | SSF แบบเกลือสูง | 10 kg CSC KU              |
| 55                                                           | SN            |                      |                                                |                 | 10 kg Chula-1             |
| 56                                                           | SN            |                      |                                                |                 | 10 kg Chula-2             |
| 57                                                           | SN            |                      |                                                |                 | Control (ไม่ใส่กล้าเชื้อ) |
| 58                                                           | NC            | ปักธงชัย/ นครราชสีมา | ปลาร้ารวม ปลาสร้อย/ปลาขาว เขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ | SMF             | 10 kg Chula-1             |
| 59                                                           | NC            |                      |                                                |                 | Control (ไม่ใส่กล้าเชื้อ) |
| 60                                                           | NC            |                      |                                                |                 | 10 kg Chula-2             |
| 61                                                           | NC            |                      |                                                |                 | 10 kg NRRU-1              |
| 62                                                           | NC            |                      |                                                |                 | 10 kg NRRU-2              |
| หมายเหตุ *สีที่ใช้ highlight เพื่อระบุจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง |               |                      |                                                |                 |                           |

2. การวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ตรวจพบปริมาณสูงสุดในตัวอย่างปลาร้า 10 ลำดับแรก โดยเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างปลาร้าที่หมักแบบวิธีปกติ (traditional method) และหมักแบบวิธีเร่งโดยใช้หัวเชื้อชีวภาพ (starter cultures) ในเขตพื้นที่การผลิตเดียวกัน

จากการวิเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในตัวอย่างปลาร้าด้วยเทคนิค headspace SPME-GC/MS พบว่า รูปแบบข้อมูลทางชีวโมเลกุลของสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายได้ที่ตรวจพบในแต่ละตัวอย่างพบได้ในช่วงระหว่าง 30-50 สาร และเมื่อจัดเรียงรายการสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่พบมากที่สุด 10 อันดับแรก โดยเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างปลาร้าที่หมักแบบวิธีปกติ (traditional method) และหมักแบบวิธีเร่งโดยใช้หัวเชื้อชีวภาพ (starter cultures) จำแนกตามเขตพื้นที่การผลิตหลัก จะได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 15-17

เมื่อพิจารณาตัวอย่างปลาร้าที่ได้จากการหมักแบบ SSF แบบทั่วไป ตามรูปแบบของจังหวัดอุดรธานี ดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่า ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ตรวจพบในปริมาณสัมพัทธ์รวมมากที่สุด 10 อันดับแรก ในตัวอย่างปลาร้าที่หมักหมักแบบวิธีเร่งโดยใช้หัวเชื้อชีวภาพ มีความใกล้เคียงกับตัวอย่างปลาร้าที่หมักแบบวิธีปกติ ซึ่งสัมพันธ์กับข้อมูลการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลาร้าในหัวข้อที่ 2.4 ซึ่งระบุว่าปลาร้าที่หมักโดยการเติมน้ำเชื้อจะมีกลิ่นหอมของสารระเหยจะเพิ่มมากขึ้นและมีกลิ่นใกล้เคียงกับที่หมักแบบดั้งเดิมในสัปดาห์ที่ 8 ในขณะที่ตัวอย่าง control (ไม่ใส่น้ำเชื้อ) มีรูปแบบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ตรวจพบแตกต่างออกไป ซึ่งทำให้ยังมีกลิ่นคาวของปลาอย่างชัดเจน

เมื่อพิจารณาตัวอย่างปลาร้าที่ได้จากการหมักแบบ SSF แบบเกลือสูง ตามรูปแบบของจังหวัดสกลนคร ดังแสดงในตารางที่ 16 พบว่า ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ตรวจพบในปริมาณสัมพัทธ์รวมมากที่สุด 10 อันดับแรกในตัวอย่างปลาร้าที่หมักหมักแบบวิธีเร่งโดยใช้หัวเชื้อชีวภาพ มีความใกล้เคียงกับตัวอย่างปลาร้าที่หมักแบบวิธีปกติ ซึ่งสัมพันธ์กับข้อมูลการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลาร้าในหัวข้อที่ 2.4 ซึ่งระบุว่าปลาร้าที่หมักโดยการเติมน้ำเชื้อจะมีกลิ่นใกล้เคียงกับที่หมักแบบดั้งเดิมในสัปดาห์ที่ 6 อย่างไรก็ตาม ตัวอย่าง control (ไม่ใส่น้ำเชื้อ) มีรูปแบบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ตรวจพบมากที่สุด 10 อันดับแรกแตกต่างออกไปไม่มากนัก ในขณะที่ผลการประเมินในหัวข้อที่ 2.4 ระบุว่าตัวอย่างปลาร้าดังกล่าวจะยังคงมีกลิ่นคาวเด่นชัด

เมื่อพิจารณาตัวอย่างปลาร้าที่ได้จากการหมักแบบ SMF ตามรูปแบบของจังหวัดนครราชสีมา ดังแสดงในตารางที่ 17 พบว่า ข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ตรวจพบในปริมาณสัมพัทธ์รวมมากที่สุด 10 อันดับแรกในตัวอย่างปลาร้าที่หมักหมักแบบวิธีเร่งโดยใช้หัวเชื้อชีวภาพ และตัวอย่าง control (ไม่ใส่น้ำเชื้อ) มีความใกล้เคียงกับตัวอย่างปลาร้าที่หมักแบบวิธีปกติ ในขณะที่ผลการประเมินในหัวข้อที่ 2.4 ระบุว่าตัวอย่างปลาร้าดังกล่าวจะยังคงมีกลิ่นคาว

เพื่อให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงรูปแบบข้อมูลโปรไฟล์สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในตัวอย่างปลาร้า  
ผู้วิจัยดำเนินการวิเคราะห์ HCA และ PCA ด้วยสารเมตาโบไลต์ 57 สาร (ดังอภิปรายในหัวข้อ 2.1.4.1-3)

**ตารางที่ ๓2** เปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ตรวจพบในปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) รวมมากที่สุด 10 อันดับแรกในตัวอย่างปลาร้าที่หมักแบบวิธีปกติ (traditional method) และหมักแบบวิธีเร่งโดยใช้หัวเชื้อชีวภาพ (starter cultures) ในเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด **อุดรธานี** ด้วยเทคนิค Headspace SPME-GC/MS

| ลำดับ | ปลาร้าจากอุดรธานี หมักแบบวิธีปกติ เก็บจากแหล่งผลิต (n=11) |                                                             | ปลาร้าจากอุดรธานี หมักแบบวิธีปกติ ในห้องปฏิบัติการ (n=1) Control (ไม่ใส่กล้าเชื้อ) |                                                            | ปลาร้าจากอุดรธานี หมักแบบวิธีเร่งโดยใช้หัวเชื้อชีวภาพ ในห้องปฏิบัติการ (n=2) |                                                           |
|-------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
|       | สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย                                | Relative abundance* (log <sub>10</sub> arbitrary unit ± SD) | สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย                                                         | Relative abundance (log <sub>10</sub> arbitrary unit ± SD) | สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย                                                   | Relative abundance (log <sub>10</sub> arbitrary unit ±SD) |
| 1     | Butanoic acid                                             | 7.3 ± 0.8                                                   | Disulfide, dimethyl                                                                | 7.9 ± 0.0                                                  | Butanoic acid, ethyl ester                                                   | 7.6 ± 0.1                                                 |
| 2     | Butanoic acid, 3-methyl-                                  | 7.0 ± 0.5                                                   | Mercaptoacetone                                                                    | 7.8 ± 0.0                                                  | Butanoic acid                                                                | 7.6 ± 0.2                                                 |
| 3     | Disulfide, dimethyl                                       | 6.7 ± 0.2                                                   | Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester                                          | 7.7 ± 0.0                                                  | Ethanol                                                                      | 7.0 ± 0.3                                                 |
| 4     | Acetic acid                                               | 6.6 ± 0.6                                                   | Dimethyl trisulfide                                                                | 7.5 ± 0.0                                                  | 1-Butanol, 3-methyl                                                          | 6.5 ± 0.1                                                 |
| 5     | 1-Butanol, 3-methyl                                       | 6.5 ± 0.4                                                   | Methanethiol                                                                       | 7.3 ± 0.0                                                  | Styrene                                                                      | 6.5 ± 0.0                                                 |
| 6     | Dimethyl trisulfide                                       | 6.5 ± 0.6                                                   | Phenol                                                                             | 6.5 ± 0.0                                                  | Disulfide, dimethyl                                                          | 6.3 ± 0.5                                                 |
| 7     | Benzaldehyde                                              | 6.4 ± 0.7                                                   | Butanoic acid                                                                      | 6.4 ± 0.0                                                  | Phenylethyl Alcohol                                                          | 6.2 ± 0.2                                                 |
| 8     | Hexanal                                                   | 6.3 ± 0.6                                                   | Butanoic acid, ethyl ester                                                         | 6.3 ± 0.0                                                  | Dimethyl trisulfide                                                          | 6.2 ± 0.2                                                 |
| 9     | Butanoic acid, ethyl ester                                | 6.0 ± 0.4                                                   | Phenylethyl Alcohol                                                                | 6.3 ± 0.0                                                  | Ethyl Acetate                                                                | 6.2 ± 0.2                                                 |
| 10    | Indole                                                    | 5.7 ± 0.2                                                   | 1-Butanol, 3-methyl-                                                               | 6.2 ± 0.0                                                  | Acetic acid                                                                  | 6.2 ± 0.0                                                 |

หมายเหตุ \*Relative abundance คือค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละสารที่ได้จากการอินทิเกรตโครมาโตแกรม

**ตารางที่ ๓3** เปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ตรวจพบในปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) รวมมากที่สุด 10 อันดับแรกในตัวอย่างปลาร้าที่หมักแบบวิธีปกติ (traditional method) และหมักแบบวิธีเร่งโดยใช้หัวเชื้อชีวภาพ (starter cultures) ในเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด **สกลนคร** ด้วยเทคนิค Headspace SPME-GC/MS

| ลำดับ | ปลาร้าจากสกลนคร หมักแบบวิธีปกติ เก็บจากแหล่งผลิต (n=7) |                                                                | ปลาร้าจากสกลนคร หมักแบบวิธีปกติ ในห้องปฏิบัติการ (n=1) Control (ไม่ใส่กล้าเชื้อ) |                                                               | ปลาร้าจากสกลนคร หมักแบบวิธีเร่งโดยใช้หัวเชื้อชีวภาพ ในห้องปฏิบัติการ (n=3) |                                                              |
|-------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|       | สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย                             | Relative abundance*<br>(log <sub>10</sub> arbitrary unit ± SD) | สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย                                                       | Relative abundance<br>(log <sub>10</sub> arbitrary unit ± SD) | สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย                                                 | Relative abundance<br>(log <sub>10</sub> arbitrary unit ±SD) |
| 1     | Disulfide, dimethyl                                    | 6.9 ± 0.5                                                      | Disulfide, dimethyl                                                              | 8.3 ± 0.0                                                     | Disulfide, dimethyl                                                        | 8.2 ± 0.0                                                    |
| 2     | Butanoic acid                                          | 6.9 ± 0.5                                                      | Dimethyl trisulfide                                                              | 8.1 ± 0.0                                                     | Dimethyl trisulfide                                                        | 8.0 ± 0.1                                                    |
| 3     | Butanoic acid, ethyl ester                             | 6.9 ± 0.8                                                      | Indole                                                                           | 7.4 ± 0.0                                                     | Butanoic acid                                                              | 7.2 ± 0.2                                                    |
| 4     | Butanoic acid, 3-methyl-                               | 6.8 ± 0.9                                                      | Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester                                        | 7.0 ± 0.0                                                     | Indole                                                                     | 6.9 ± 1.2                                                    |
| 5     | Indole                                                 | 6.8 ± 1.1                                                      | Butanoic acid                                                                    | 7.0 ± 0.0                                                     | Isopropyl Alcohol                                                          | 6.8 ± 0.2                                                    |
| 6     | Ethanol                                                | 6.6 ± 0.3                                                      | Ethanol                                                                          | 7.0 ± 0.0                                                     | Ethanol                                                                    | 6.7 ± 0.2                                                    |
| 7     | Dimethyl trisulfide                                    | 6.4 ± 0.6                                                      | Disulfide, methyl (methylthio)methyl                                             | 6.9 ± 0.0                                                     | Butanoic acid, ethyl ester                                                 | 6.7 ± 0.5                                                    |
| 8     | Hexanal                                                | 6.3 ± 0.5                                                      | Isopropyl Alcohol                                                                | 6.8 ± 0.0                                                     | 1-Butanol                                                                  | 6.6 ± 0.4                                                    |
| 9     | Acetic acid                                            | 6.2 ± 0.6                                                      | 1-Butanol                                                                        | 6.8 ± 0.0                                                     | Acetic acid                                                                | 6.6 ± 0.2                                                    |
| 10    | Butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester                  | 6.1 ± 0.6                                                      | Butanoic acid, ethyl ester                                                       | 6.8 ± 0.0                                                     | 2-Butanone                                                                 | 6.4 ± 0.0                                                    |

หมายเหตุ \*Relative abundance คือค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละสารที่ได้จากการอินทิเกรตโครมาโตแกรม

**ตารางที่ ๓4** เปรียบเทียบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ตรวจพบในปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) รวมมากที่สุด 10 อันดับแรกในตัวอย่างปลาร้าที่หมักแบบวิธีปกติ (traditional method) และหมักแบบวิธีเร่งโดยใช้หัวเชื้อชีวภาพ (starter cultures) ในเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด **นครราชสีมา** ด้วยเทคนิค Headspace SPME-GC/MS

| ลำดับ | ปลาร้าจากนครราชสีมา หมักแบบวิธีปกติ เก็บจากแหล่งผลิต (n=11) |                                                             | ปลาร้าจากนครราชสีมา หมักแบบวิธีปกติ ในห้องปฏิบัติการ (n=1) Control (ไม่ใส่กล้ำเชื้อ) |                                                            | ปลาร้าจากนครราชสีมา หมักแบบวิธีเร่งโดยใช้หัวเชื้อชีวภาพ ในห้องปฏิบัติการ (n=4) |                                                           |
|-------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
|       | สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย                                  | Relative abundance* (log <sub>10</sub> arbitrary unit ± SD) | สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย                                                           | Relative abundance (log <sub>10</sub> arbitrary unit ± SD) | สารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย                                                     | Relative abundance (log <sub>10</sub> arbitrary unit ±SD) |
| 1     | Butanoic acid                                               | 7.6 ± 0.6                                                   | Butanoic acid                                                                        | 8.1 ± 0.0                                                  | Butanoic acid                                                                  | 8.1 ± 0.0                                                 |
| 2     | Butanoic acid, ethyl ester                                  | 7.5 ± 0.6                                                   | Butanoic acid, ethyl ester                                                           | 8.1 ± 0.0                                                  | Butanoic acid, ethyl ester                                                     | 8.1 ± 0.0                                                 |
| 3     | Butanoic acid, butyl ester                                  | 7.2 ± 0.6                                                   | Butanoic acid, 1-methylethyl ester                                                   | 7.4 ± 0.0                                                  | Butanoic acid, 1-methylethyl ester                                             | 7.3 ± 0.0                                                 |
| 4     | Butanoic acid, 3-methyl-                                    | 6.9 ± 0.4                                                   | Ethanol                                                                              | 7.1 ± 0.0                                                  | Ethanol                                                                        | 7.1 ± 0.0                                                 |
| 5     | Disulfide, dimethyl                                         | 6.9 ± 0.6                                                   | Acetic acid                                                                          | 7.1 ± 0.0                                                  | Acetic acid                                                                    | 7.0 ± 0.1                                                 |
| 6     | Phenol                                                      | 6.9 ± 0.8                                                   | Butanoic acid, propyl ester                                                          | 7.0 ± 0.0                                                  | Butanoic acid, propyl ester                                                    | 7.0 ± 0.0                                                 |
| 7     | Indole                                                      | 6.7 ± 0.7                                                   | Phenol                                                                               | 6.9 ± 0.0                                                  | Phenol                                                                         | 7.0 ± 0.1                                                 |
| 8     | Acetic acid                                                 | 6.6 ± 0.5                                                   | Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester                                            | 6.9 ± 0.0                                                  | Isopropyl Alcohol                                                              | 6.8 ± 0.0                                                 |
| 9     | Pentanoic acid, 4-methyl-                                   | 6.5 ± 0.6                                                   | Isopropyl Alcohol                                                                    | 6.8 ± 0.0                                                  | Butanoic acid, butyl ester                                                     | 6.8 ± 0.0                                                 |
| 10    | Pentanoic acid, 4-methyl-, ethyl ester                      | 6.4 ± 0.6                                                   | Butanoic acid, butyl ester                                                           | 6.8 ± 0.0                                                  | Indole                                                                         | 6.7 ± 0.1                                                 |

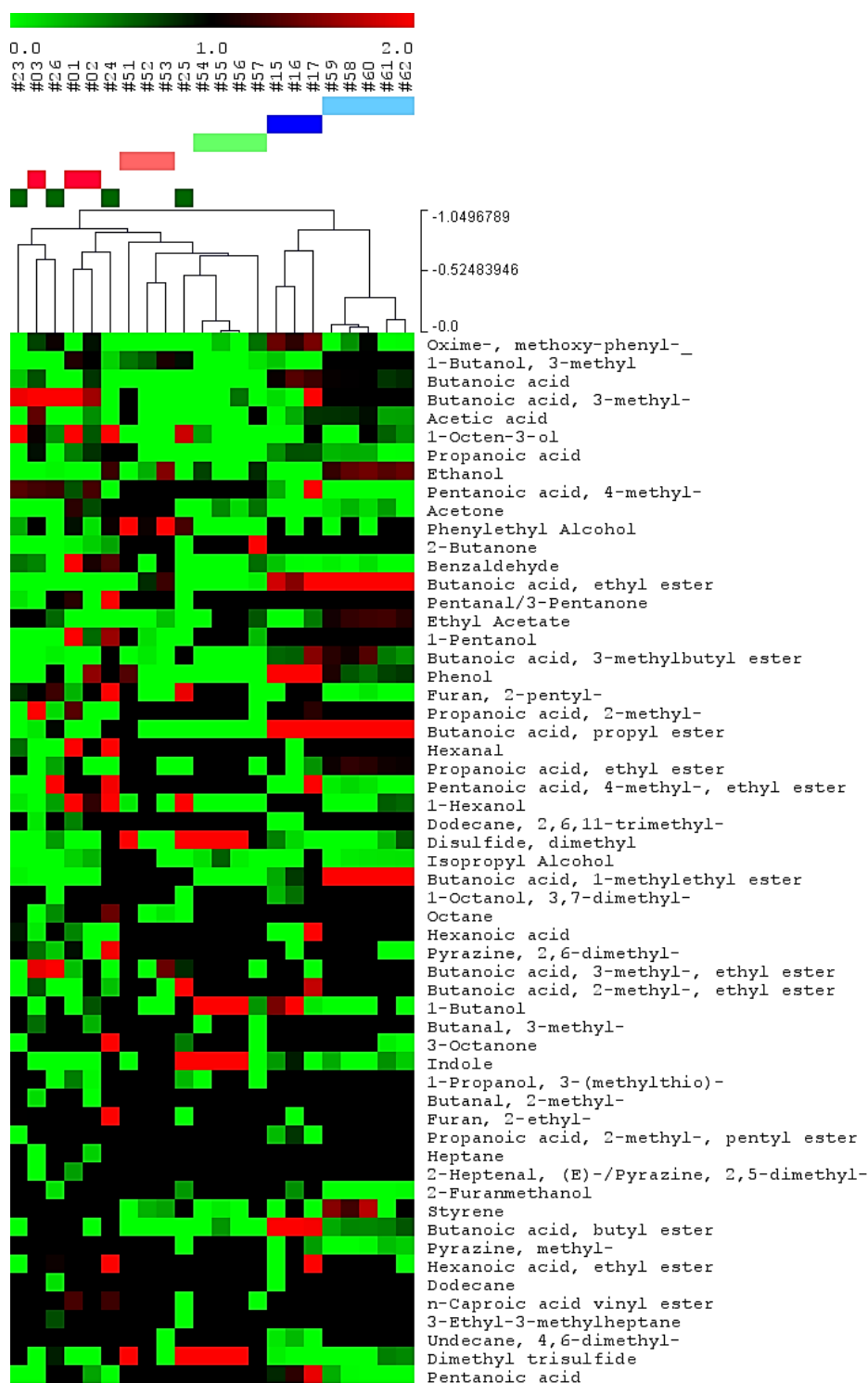
หมายเหตุ \*Relative abundance คือค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละสารที่ได้จากการอินทิเกรตโครมาโตแกรม



3. การวิเคราะห์เปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างปลาร้าที่หมักแบบวิธีปกติและหมักแบบวิธีเร่งโดยใช้หัวเชื้อชีวภาพ ตามความเหมือน (overall similarity basis) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่าย (volatile metabolite profile) ด้วยเทคนิค heat-map visualization และ hierarchical cluster analysis (HCA) ด้วย Spearman rank correlation

การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในตัวอย่างปลาร้าที่หมักแบบวิธีปกติ (traditional method) และหมักแบบวิธีเร่งโดยใช้หัวเชื้อชีวภาพ (starter cultures) โดยนำข้อมูลปริมาณสัมพันธ์ (relative abundance) ของสารเมตาโบไลต์ทั้ง 57 สาร (ดังอภิปรายในหัวข้อ 2.1.4.1-3) มาคำนวณเปรียบเทียบและจัดกลุ่มตัวอย่างโดยใช้ค่า Spearman rank correlation

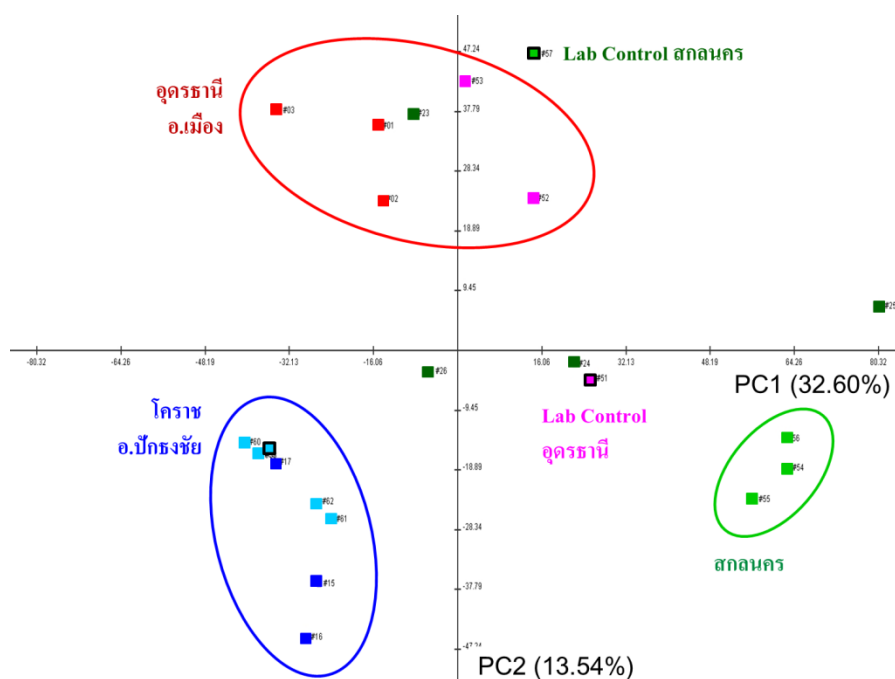
ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างปลาร้าจากจังหวัดนครราชสีมา มีความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายจากตัวอย่างปลาร้าที่ผลิตในจังหวัดอุดรธานีและสกลนครอย่างชัดเจน อีกทั้งยังสามารถแยกความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายจากตัวอย่างปลาร้าจากทุกจังหวัดที่หมักแบบวิธีปกติ (สีเข้ม) และหมักแบบวิธีเร่งโดยใช้หัวเชื้อชีวภาพ (สีอ่อน) ออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยตัวอย่าง control (ไม่ใส่กล้าเชื้อ) จะมีความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายจากตัวอย่างปลาร้าอื่น ซึ่งสังเกตได้จากแขนง dendrogram ที่แยกออกมาอย่างชัดเจน (ตัวอย่างที่ 51, 57 และ 59) ดังแสดงในภาพที่ 18 เชื้อ ผลการวิเคราะห์ที่ได้จาก HCA สัมพันธ์กับข้อมูลการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลาร้าในหัวข้อที่ 2.4



ภาพที่ 18 การจัดกลุ่มตัวอย่างปลาร้าตามความเหมือนของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในปลาร้าที่หมักแบบวิธีปกติ (traditional method; สีเข้ม) และหมักแบบวิธีเร่งโดยใช้หัวเชื้อชีวภาพ (starter cultures; สีอ่อน) จากเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด **อุดรธานี นครราชสีมา** และ **สกลนคร** แสดงค่าปริมาณสัมพัทธ์ (relative abundance) ของสารเมตาบอไลต์ชนิดเดียวกันจากต่ำไปสูงตามลำดับ

4. การวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาร้าที่หมักแบบวิธีปกติและหมักแบบวิธีเร่งโดยใช้หัวเชื้อชีวภาพ ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis: PCA)

ผลการวิเคราะห์ด้วย PCA สามารถแสดงให้เห็นรูปแบบ (pattern) ของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายที่ชัดเจนกว่าผลที่ได้จากการจัดกลุ่มด้วย HCA ในข้อ 3. โดยผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างปลาร้าจากจังหวัดอุดรธานีและนครราชสีมาที่หมักแบบวิธีเร่งโดยใช้หัวเชื้อชีวภาพ (สีอ่อน) มีข้อมูลรูปแบบสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายใกล้เคียงกับตัวอย่างปลาร้าในเขตพื้นที่การผลิตเดียวกันที่หมักโดยวิธีปกติ (สีเข้ม) ดังแสดงในภาพที่ 19 และตัวอย่าง control (ไม่ใช่กลั้วเชื้อ) จะมีความแตกต่างของข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายจากตัวอย่างปลาร้าอื่นๆ จากเขตพื้นที่การผลิตเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย HCA ในข้อ 3. ยกเว้นตัวอย่าง control ปลาร้าจากจังหวัดนครราชสีมาซึ่งมีรูปแบบข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายไม่แตกต่างจากตัวอย่างอื่นๆ จากเขตพื้นที่การผลิตเดียวกัน โดยน่าจะมีสาเหตุมาจากปลาร้าในกลุ่มนี้มีกระบวนการหมักแบบเติมน้ำ (SMF) ซึ่งมีระยะเวลาค่อนข้างสั้นเพียง 2-6 เดือน จึงยังไม่เกิดข้อแตกต่างด้านกลิ่นรสที่ชัดเจนโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์กลั้วเชื้อ ผลการวิเคราะห์ที่ได้จากPCA สัมพันธ์กับข้อมูลการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลาร้าในหัวข้อที่ 2.4



ภาพที่ 19 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างปลาร้าด้วย PCA จากข้อมูลสารเมตาบอไลต์ชนิดระเหยง่ายในปลาร้าที่หมักแบบวิธีปกติ (traditional method; สีเข้ม) และหมักแบบวิธีเร่งโดยใช้หัวเชื้อชีวภาพ (starter cultures; สีอ่อน) และตัวอย่าง control (□) จากเขตพื้นที่การผลิตจังหวัด อุดรธานี นครราชสีมา และ สกลนคร

**ภาคผนวก ผ**  
**มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช. ๑๓๔/๒๕๔๖)**  
**ปลาร้าผง**

**๑. ขอบข่าย**

- ๑.๑ มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้ครอบคลุมเฉพาะปลาร้าแปรรูปที่พร้อมบริโภคและพร้อมปรุงที่ทำจากปลาร้าที่หมักจนได้ที่แล้ว ทำให้อยู่ในลักษณะเป็นผง
- ๑.๒ ปลาร้าที่นำมาใช้ต้องไม่ใช่โซเดียมไนเตรตหรือโพแทสเซียมไนเตรต โซเดียมไนไตรต์หรือโพแทสเซียมไนไตรต์ในการทำ

**๒. บทนิยาม**

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้มีดังต่อไปนี้

- ๒.๑ ปลาร้าผง หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำปลาร้าที่หมักได้ที่แล้วไปผ่านการให้ความร้อน เช่น เคี้ยวหรืออบจนแห้ง แล้วทำให้เป็นผง อาจปรุงรสหรือไม่ก็ได้

**๓. คุณลักษณะที่ต้องการ**

- ๓.๑ ลักษณะทั่วไป  
ต้องเป็นผง แห้ง เป็นเนื้อเดียวกัน และไม่จับตัวเป็นก้อน
- ๓.๒ สี  
ต้องมีสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลแก่ ไม่มีสีน้ำตาลดำคล้ำ
- ๓.๓ กลิ่น  
ต้องมีกลิ่นหอมของปลาร้า ไม่มีกลิ่นคาว กลิ่นไหม้กลิ่นหืนหรือกลิ่นอับ
- ๓.๔ รส  
ต้องมีรสเค็มกลมกล่อมเป็นไปตามธรรมชาติของปลาร้า
- เมื่อตรวจสอบโดยวิธีให้คะแนนตามข้อ ๘.๑ แล้ว ต้องได้คะแนนเฉลี่ยของแต่ละลักษณะจากผู้ตรวจสอบทุกคน ไม่น้อยกว่า ๓ คะแนน และไม่มีลักษณะใดได้ ๑ คะแนน จากผู้ตรวจสอบคนใดคนหนึ่ง
- ๓.๕ สิ่งแปลกปลอม  
ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้เช่น เส้นผม ขนสัตว์ดิน ทราวย กรวด ชิ้นส่วนหรือสิ่งปฏิกูลจากสัตว์เช่น แมลง หนูนก
- ๓.๖ วัตถุเจือปนอาหาร
- ๓.๖.๑ ห้ามใช้สีทุกชนิด
- ๓.๖.๒ ห้ามใช้โซเดียมไนเตรตหรือโพแทสเซียมไนเตรต โซเดียมไนไตรต์หรือโพแทสเซียมไนไตรต์
- ๓.๖.๓ หากมีการใช้วัตถุเจือปนอาหารให้ใช้ได้ ปริมาณที่กำหนด

๓.๖.๓.๑ กรดเบนโซอิกหรือเกลือของกรดเบนโซอิก (คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก) ต้องไม่เกิน ๑,๐๐๐ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

๓.๖.๓.๒ กรดซอร์บิกหรือเกลือของกรดซอร์บิก (คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก) ต้องไม่เกิน ๑,๐๐๐ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

กรณีที่ใช้วัตถุเจือปนอาหารในข้อ ๓.๖.๓.๑ และข้อ ๓.๖.๓.๒ รวมกัน ต้องไม่เกิน ๑,๐๐๐ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

๓.๗ เกลือ

ต้องอยู่ระหว่างร้อยละ ๑๐ โดยน้ำหนัก ถึงร้อยละ ๒๕ โดยน้ำหนัก

๓.๘ โปรตีน

ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ ๒๕ โดยน้ำหนัก

๓.๙ ความชื้น

ต้องไม่เกินร้อยละ ๘ โดยน้ำหนัก

๓.๑๐ วอเตอร์แอกทิวิตี

ต้องไม่เกิน ๐.๕

หมายเหตุ วอเตอร์แอกทิวิตี เป็นปัจจัยสำคัญในการคาดคะเนอายุการเก็บอาหาร และเป็นตัวบ่งชี้ถึงความปลอดภัยของอาหาร โดยทำหน้าที่ควบคุมการอยู่รอด การเจริญ และการสร้างสารพิษของจุลินทรีย์

๓.๑๑ จุลินทรีย์

๓.๑๑.๑ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ต้องไม่เกิน  $1 \times 10^6$  โคโลนีต่อตัวอย่าง ๑ กรัม

๓.๑๑.๒ รา ต้องไม่เกิน ๒๐๐ โคโลนีต่อตัวอย่าง ๑ กรัม

#### ๔. สุนัขลักษณะ

๔.๑ สุนัขลักษณะในการทำปลาร้าผงให้เป็นไปตามคำแนะนำตามภาคผนวก ก.

#### ๕. การบรรจุ

๕.๑ ให้บรรจุปลาร้าผงในภาชนะบรรจุที่สะอาด แห้ง ผนึกได้เรียบร้อย และสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งสกปรกภายนอกได้

๕.๒ น้ำหนักสุทธิของปลาร้าผงในแต่ละภาชนะบรรจุ ต้องไม่น้อยกว่าที่ระบุไว้ที่ฉลาก

#### ๖. เครื่องหมายและฉลาก

๖.๑ ที่ภาชนะบรรจุปลาร้าผงทุกหน่วย อย่างน้อยต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมายแจ้งรายละเอียดต่อไปนี้ให้เห็นได้ง่าย ชัดเจน

(๑) ชื่อเรียกผลิตภัณฑ์ เช่น ปลาร้าผง ปลาร้าผงปรุงรส

(๒) น้ำหนักสุทธิ

- (๓) วัน เดือน ปีที่ทำ และวัน เดือน ปีที่หมดอายุ หรือข้อความว่า “ควรบริโภคก่อน (วัน เดือน ปี)”
  - (๔) ชื่อแนะนำในการเก็บรักษาและบริโภค
  - (๕) ชื่อผู้ทำ หรือสถานที่ทำ พร้อมสถานที่ตั้ง หรือเครื่องหมายการค้าที่จดทะเบียน
- ในกรณีที่ช้ภาษาต่างประเทศ ต้องมีความหมายตรงกับภาษาไทยที่กำหนดไว้ข้างต้น

### ๗. การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

- ๗.๑ รุ่น ในที่นี้ หมายถึง ปลาร้าผงที่มีส่วนประกอบเดียวกัน ที่ทำในระยะเวลาเดียวกัน
- ๗.๒ การชักตัวอย่างและการยอมรับ ให้เป็นไปตามแผนการชักตัวอย่างที่กำหนดต่อไปนี้
  - ๗.๒.๑ การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบสิ่งแปลกปลอม การบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน ๓ หน่วยภาชนะบรรจุ เมื่อตรวจสอบแล้วทุกตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ ๓.๕ ข้อ ๕ และข้อ ๖ จึงจะถือว่าปลาร้าผงรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด
  - ๗.๒.๒ การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับทดสอบลักษณะทั่วไป สี กลิ่น และรส ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันจำนวน ๓ หน่วยภาชนะบรรจุ เมื่อตรวจสอบแล้วตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ ๓.๑ ถึงข้อ ๓.๔ จึงจะถือว่าปลาร้าผงรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด
  - ๗.๒.๓ การชักตัวอย่างการยอมรับ สำหรับการทดสอบวัตถุเจือปนอาหาร เกลือ โปรตีนี ความชื้น วอเตอร์แอคทีวิตี และจุลินทรีย์ ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มตัวอย่างจากรุ่นเดียวกัน จำนวน ๕ หน่วยภาชนะบรรจุ นำมาทำเป็นตัวอย่างรวม โดยมีน้ำหนักรวมกันไม่น้อยกว่า ๕๐๐ กรัม เมื่อตรวจสอบแล้วตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ ๓.๖ ถึงข้อ ๓.๑๑ จึงจะถือว่าปลาร้าผงรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด
- ๗.๓ เกณฑ์ตัดสิน
 

ตัวอย่างปลาร้าผงต้องเป็นไปตามข้อ ๗.๒.๑ ข้อ ๗.๒.๒ และข้อ ๗.๒.๓ ทุกข้อ จึงจะถือว่าปลาร้าผงรุ่นนั้นเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้

### ๘. การทดสอบ

- ๘.๑ การทดสอบลักษณะทั่วไป สี กลิ่น และรส
  - ๘.๑.๑ ให้แต่งตั้งคณะผู้ตรวจสอบ ประกอบด้วยผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจสอบปลาร้าผงอย่างน้อย ๕ คน แต่ละคนจะแยกกันตรวจและให้คะแนนโดยอิสระ
  - ๘.๑.๒ วางตัวอย่างปลาร้าผงในจานกระเบื้องสีขาว ตรวจสอบโดยการตรวจพินิจและชิม
  - ๘.๑.๓ หลักเกณฑ์การให้คะแนน ให้เป็นไปตามตารางที่ ๑

ตารางที่ ๑ หลักเกณฑ์การให้คะแนน  
(ข้อ ๘.๑.๓)

| ลักษณะที่ตรวจสอบ | เกณฑ์ที่กำหนด                                                        | ระดับการตัดสิน (คะแนน) |    |       |              |
|------------------|----------------------------------------------------------------------|------------------------|----|-------|--------------|
|                  |                                                                      | ดีมาก                  | ดี | พอใช้ | ต้องปรับปรุง |
| ลักษณะทั่วไป     | ต้องเป็นผงแห้ง เป็นเนื้อเดียวกัน และไม่จับตัวเป็นก้อน                | ๔                      | ๓  | ๒     | ๑            |
| สี               | ต้องมีสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลแก่ ไม่มีสีน้ำตาลดำคล้ำ                 | ๔                      | ๓  | ๒     | ๑            |
| กลิ่น            | ต้องมีกลิ่นหอมของปลาร้า ไม่มีกลิ่นคาว กลิ่นไหม้ กลิ่นหืนหรือกลิ่นอับ | ๔                      | ๓  | ๒     | ๑            |
| รส               | ต้องมีรสเค็มกลมกล่อมเป็นไปตามธรรมชาติของปลาร้า                       | ๔                      | ๓  | ๒     | ๑            |

- ๘.๒ การทดสอบสิ่งแปลกปลอม ภาชนะบรรจุ และเครื่องหมายและฉลากให้ตรวจพินิจ
- ๘.๓ การทดสอบวัตถุเจือปนอาหาร เกลือ โปรตีน ความชื้น และวอเตอร์แอกทีวิตีให้ใช้วิธีทดสอบตาม AOAC หรือวิธีทดสอบอื่นที่เป็นที่ยอมรับ
- ๘.๔ การทดสอบจุลินทรีย์ให้ใช้วิธีทดสอบตาม AOAC หรือ BAM หรือวิธีทดสอบอื่นที่เป็นที่ยอมรับ
- ๘.๕ การทดสอบน้ำหนักสุทธิให้ใช้เครื่องชั่งที่เหมาะสม

## ภาคผนวก ก.

## สัญลักษณ์

(ข้อ ๔.๑)

## ก.๑ สถานที่ตั้งและอาคารที่ทำ

ก.๑.๑ สถานที่ตั้งตัวอาคารและที่ใกล้เคียง อยู่ในที่ที่จะไม่ทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ง่าย โดย

ก.๑.๑.๑ สถานที่ตั้งตัวอาคารและบริเวณโดยรอบ สะอาด ไม่มีน้ำขังแฉะและสกปรก

ก.๑.๑.๒ อยู่ห่างจากบริเวณหรือสถานที่ที่มีฝุ่น เขม่า คว้น มากผิดปกติ

ก.๑.๑.๓ ไม่อยู่ใกล้เคียงกับสถานที่น่ารังเกียจ เช่น บริเวณเพาะเลี้ยงสัตว์ แหล่งเก็บหรือกำจัดขยะ

ก.๑.๒ อาคารที่ทำมีขนาดเหมาะสม มีการออกแบบและก่อสร้างในลักษณะที่ง่ายแก่การบำรุงรักษา การทำความสะอาด และสะดวกในการปฏิบัติงาน โดย

ก.๑.๒.๑ พื้น ฝาผนัง และเพดานของอาคารที่ทำ ก่อสร้างด้วยวัสดุที่คงทน เรียบ ทำความสะอาด และซ่อมแซมให้อยู่ในสภาพที่ดีตลอดเวลา

ก.๑.๒.๒ แยกบริเวณที่ทำออกเป็นสัดส่วน ไม่อยู่ใกล้ห้องสุขา ไม่มีสิ่งของที่ไม่ง่ายหรือไม่เกี่ยวข้องกับการทำอยู่ในบริเวณที่ทำ

ก.๑.๒.๓ พื้นที่ใช้ปฏิบัติงานไม่แออัด มีแสงสว่างเพียงพอ และมีการระบายอากาศที่เหมาะสม

## ก.๒ เครื่องมือ เครื่องจักร และอุปกรณ์ในการทำ

ก.๒.๑ ภาชนะหรืออุปกรณ์ในการทำที่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์ ทำจากวัสดุที่มีผิวเรียบ ไม่เป็นสนิม ล้างทำความสะอาดได้ง่าย

ก.๒.๒ เครื่องมือ เครื่องจักร และอุปกรณ์ที่ใช้ สะอาด เหมาะสมกับการใช้งาน ไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อน ติดตั้งได้ง่าย มีปริมาณเพียงพอ รวมทั้งสามารถทำความสะอาดได้ง่ายและทั่วถึง

## ก.๓ การควบคุมกระบวนการทำ

ก.๓.๑ วัตถุดิบและส่วนผสมในการทำ สะอาด มีคุณภาพดี มีการล้างหรือทำความสะอาดก่อนนำไปใช้

ก.๓.๒ การทำ การเก็บรักษา การขนย้าย และการขนส่ง ให้มีการป้องกันการปนเปื้อนและการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์

## ก.๔ การสุขาภิบาล การบำรุงรักษา และการทำความสะอาด

ก.๔.๑ น้ำที่ใช้ล้างทำความสะอาดเครื่องมือ เครื่องจักร อุปกรณ์ และมือของผู้ทำ เป็นน้ำสะอาดและมีปริมาณเพียงพอ

ก.๔.๒ มีวิธีการป้องกันและกำจัดสัตว์นำเชื้อ แมลงและฝุ่นผง ไม่ให้เข้าไปในบริเวณที่ทำตามความเหมาะสม

ก.๔.๓ มีการกำจัดขยะ สิ่งสกปรก และน้ำทิ้ง อย่างเหมาะสม เพื่อไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนกลับลงสู่ผลิตภัณฑ์

ก.๔.๔ สารเคมีที่ใช้ล้างทำความสะอาด และใช้กำจัดสัตว์นำเชื้อและแมลง ใช้ในปริมาณที่เหมาะสม และเก็บแยกจากบริเวณที่ทำ เพื่อไม่ให้ปนเปื้อนลงสู่ผลิตภัณฑ์ได้

## ก.๕ บุคลากรและสัญลักษณ์ของผู้นำ

ผู้ทำทุกคน ต้องรักษาความสะอาดส่วนบุคคลให้ดี เช่น สวมเสื้อผ้าที่สะอาด มีผ้าคลุมผมเพื่อป้องกันไม่ให้เส้นผมหล่นลงในผลิตภัณฑ์ ไม่ไว้เล็บยาว ล้างมือให้สะอาดทุกครั้งก่อนปฏิบัติการ หลังการใช้ห้องสุขา และเมื่อสกปรก