วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 28 (ฉบับที่ 2) พฤษภาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2566
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 28 (No.2) May – August 2023 บทความวิจัย

ผลของปริมาณเกลือในกระกวนการหมักต่อคุณภาพของปลาส้ม จากปลานวลจันทร์ทะเล (*Chanos Chanos*)

Effect of Salt Concentrations for Fermentation Process on the Quality of Pla-som from Milkfish (*Chanos Chanos*)

นันธิดา แดงขาว[1],ประพัฒน์ กอสวัสดิ์พัฒน์[2], ฉวีวรรณ สุขศรี[1] และ โสมรัศมิ์ กล่ำกล่อมจิตร์[1*]

Nantida Dangkhaw[1], Prapat Korsawaddipat[2], Chaweewan Suksri[1] and Sommarat Klumklomjit[1*]

[1]*สาขาวิชาการจัดการครัวและศิลปะการประกอบอาหาร คณะอุตสาหกรรมบริการ วิทยาลัยดุสิตธานี*

[2]*ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งเพชรบุรี*

[1]*Faculty of Culinary Arts and Kitchen Management, Hospitality Industry, Dusit Thani College*

[2]*Phetchaburi Coastal Fisheries Research and Development Center*

Received : 4 August 2022

Revised : 28 October 2022

Accepted : 1 November 2022

บทคัดย่อ

การหมักปลาส้มมีขั้นตอนการใช้เกลือใส่ปลาก่อนการหมัก เพื่อสนับสนุนให้แบคทีเรียแลคติกกลุ่มทนเกลือ (Halotolerant) และกลุ่มชอบเกลือ (Halophilic) สามารถเจริญได้ ทั้งช่วยรักษาเนื้อสัมผัส และเพิ่มรสเค็มให้แก่ผลิตภัณฑ์ วัตถุประสงค์ของวิจัยนี้คือศึกษาผลของปริมาณเกลือในกระบวนการหมักต่อคุณภาพของปลาส้มจากปลานวลจันทร์ทะเล โดยทำการเตรียมด้วยวิธีการทาเกลือและแช่น้ำเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 15 และ 18 หมักในถุงสุญญากาศที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) นาน 6 วัน พบว่าปลาส้มสูตรทาเกลือมีค่า pH 4.38-4.57 ปริมาณเกลือ (NaCl) 1.5-2.09 g/100g ต่ำกว่าปลาส้มสูตรแช่น้ำเกลือ ขณะที่ค่าวอเตอร์แอคทีวิตี้ (a_w) (0.98-0.99) สูงกว่าปลาส้มสูตรแช่น้ำเกลือ (0.94-0.96) และมีปริมาณฮิสตามีนน้อยมากโดยแปรผันอยู่ระหว่าง 8.46-30.99 mg/kg ขณะที่ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด 1.2-2.0 x10^8 cfu/g และปริมาณแบคทีเรียแลคติก 8.0 x107-1.7 x10^8 cfu/g มากกว่าปลาส้มสูตรแช่น้ำเกลือ เมื่อใช้เกลือมากขึ้น ค่า a_w ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และแบคทีเรียแลคติกมีแนวโน้มลดลง ผลทดสอบทางประสาทสัมผัสจากผู้ทดสอบจำนวน 30 คน ด้วยวิธี 9-Point Hedunic scale พบว่าปลาส้มทอดที่ผลิตด้วยสูตรทาเกลือร้อยละ 18 และสูตรแช่น้ำเกลือร้อยละ 10 ได้คะแนนความชอบโดยรวมไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยปลาส้มสูตรทาเกลือที่ร้อยละ 18 ได้คะแนนความชอบด้านสี กลิ่น-รส รสเปรี้ยว รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม เท่ากับ 6.4 6.6 6.8 7.3 6.3 และ 7.3 คะแนน ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าตัวอย่างทางการค้าทุกด้าน อีกทั้งมีค่าพีเอชต่ำกว่า 4.6 ทำให้มีความปลอดภัยต่อการบริโภค เนื่องจากสภาวะที่เป็นกรดสูงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคส่วนใหญ่ จึงแนะนำได้ว่าการหมักด้วยสูตรทาเกลือร้อยละ 18 เป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการผลิตปลาส้ม

คำสำคัญ : ปลาส้ม ; ปริมาณเกลือ ; ปลานวลจันทร์ทะเล ; ฮิสตามีน

Abstract

The fermentation of Pla-som using salt is a process for encouraging the growth of Halotolerant and Halophilic lactic acid bacteria and improvement of the texture and salty flavor of the product. The objective of this research was to study the effect of salt contents in the fermentation process on the quality of Pla-som from Milkfish. The experiment was performed using solid salt and brine at 10, 15, and 18%, respectively, then fermented in a vacuum bag at room temperature (30-35 °C) for 6 days. The results indicated that Pla-som prepared by using the solid salt formula showed the pH values of 4.38-4.57 and the salt contents of 1.5-2.09 g/100g, which were lower than that of Pla-som using the brine formula. However, their water activity contents (a_w) (0.98-0.99) were higher than that of Pla-som using the brine formula (0.94-0.96). Very low contents of histamine in products were 8.46-30.99 mg/kg, while total viable count (TVC) was 1.2-2.0 $x10^8$ cfu/g and lactic acid bacteria (LAB) was 8.0 $x10^7$-1.7 $x10^8$ cfu/g, which were more than that of Pla-som using the brine formula. When the adding of salts increased, the amount of water activity, TVC, and LAB tened to decreases. The sensory evaluation from 30 panelists using the 9-point hedonic scale showed that the fried Pla-som products using 18% solid salt formula and 10% brine formula was no significant difference in overall acceptability scores ($p>0.05$). Pla-som prepared using 18% solid salt formula obtained the color, flavor, sour, taste, texture, and overall acceptability scores of 6.4, 6.6, 6.8, 7.3, 6.3 and 7.3, respectively. which was higher than the commercial product in all attibutes. Moreover, the pH of the product showed lower than 4.6, which was safe for consumption because high acidic conditions inhibited the growth of the most pathogenic bacteria. This suggests that the fermentation using 18% solid salt formula was suitable method for Pla-som production.

Keywords : Pla-som ; salt contant ; Milkfish ; Chanos Chanos ; histamine

***Corresponding author. E-mail** : sommarut.kl@dtc.ac.th

บทนำ

ปลานวลจันทร์ทะเล (Milkfish) ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Chanos Chanos* ชื่อเรียกตามท้องถิ่น ได้แก่ ปลาดอกไม้ ปลาทูน้ำจืด และปลาชะลิน ปลานวลจันทร์ทะเลจัดว่าเป็นปลาประจำชาติของฟิลิปปินส์ และเป็นปลาเศรษฐกิจที่สำคัญของหลายประเทศ เช่น สาธารณรัฐประชาชนจีน เวียดนาม อินโดนีเซีย และไต้หวัน การเพาะเลี้ยงปลานวลจันทร์ทะเลในประเทศไทย เริ่มต้นเมื่อปี พ.ศ. 2508 จากที่พระบาทสมเด็จพระปรินทรมหาภูมิพลอดุลยเดช มหิตลาธิเบศรรามาธิบดี จักรีนฤบดินทร สยามินทราธิราช บรมนาถบพิตร (รัชกาลที่ 9) ทรงมีพระราชกระแสรับสั่งให้กรมประมงเพาะพันธุ์ เพื่อส่งเสริมให้เป็นปลาเศรษฐกิจ เนื่องจากเจริญเติบโตเร็ว ทนทานต่อโรค สามารถอาศัยอยู่ได้ในน้ำที่มีความเค็มต่ำจึงสามารถเลี้ยงง่าย ปลานวลจันทร์ทะเลกินอาหารได้ทั้งพืชและสัตว์ โดยกินสาหร่าย ตะไคร่น้ำ แพลงก์ตอน ไรน้ำ รำข้าว ขี้แดด ปลาอื่น ๆ ที่มีขนาดเล็กกว่า รวมถึงอาหารสำเร็จรูปได้ (Wongwiwat, 2010) จึงสนับสนุนให้เกษตรกรเพาะเลี้ยงปลาทะเลชนิดนี้เพื่อให้ชาวบ้านได้ใช้เป็นอาหารและเพิ่มรายได้ในการยังชีพ อย่างไรก็ตามปลานวลจันทร์ทะเลยังมีข้อจำกัดในการแปรรูปคือการมีก้างจำนวนมาก และมีปริมาณกรดอะมิโนฮิสติดีนสูง (Kongrat & Kongpun, 2015) จึงมีความเสี่ยงให้ปลาเกิดพิษในกลุ่มสคอมโบรท็อกซิน (Scombrotoxin) เช่น ฮีสตามีน (Histamine) สูง เมื่อเก็บรักษาในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม หรือเริ่มเน่าเสีย หรือมักพบในผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่ไม่ได้คุณภาพ ทั้งนี้การเจ็บป่วย จากสคอมโบรท็อกซินเรียกว่า Scombrotoxin Poisoning หรือ Histamine Poisoning จะมีอาการแพ้ เช่น มีผื่นคัน หน้าแดง แสบร้อนบริเวณปาก และปวดศีรษะ เป็นต้น (Yemmen & Gargouri, 2022) มักเกิดจากการได้รับฮิสตามีนกว่า 200 mg/kg ซึ่งมาตรฐานองค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติและองค์การอนามัยโลก กำหนดปริมาณฮีสตามีนในปลาระดับที่ปลอดภัยไว้ไม่เกิน 200 mg/kg (FAO/WHO, 2013)

อาหารทะเลที่เก็บรักษาในอุณหภูมิไม่เหมาะสม โดยไม่เก็บในที่เย็น (4 องศาเซลเซียส) ก่อนการปรุงสุก เช่น ปลาที่เริ่มเน่าเสียมักจะปนเปื้อนสารพิษฮิสตามีนกว่า 50 mg/kg (FDA, 2001) อันเกิดจากแบคทีเรียที่อยู่ในตัวปลาเองแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (Decarboxylase) ย่อยสลายฮีสติดีนเกิดเป็นสารพิษฮีสตามีน (Histamine Decarboxylation Bacteria) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์หมักดอง เช่น ปลาส้มซึ่งอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการผลิต หากมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ดังกล่าวได้ในจำนวนมาก ประกอบกับอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต จะยิ่งเพิ่มปริมาณสารพิษฮิสตามีนในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้สารพิษฮีสตามีนไม่สามารถถูกทำลายได้จากการแช่แข็ง การให้ความร้อน และการรมควัน ดังนั้นจึงควรควบคุมคุณภาพของปลา ควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ และหาทางลดปริมาณของฮีสตามีนให้อยู่ในเกณฑ์ที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดฮิสตามีนในปลาและผลิตภัณฑ์จากปลา ได้แก่ (1) ชนิดของปลา ปลาแต่ละชนิดมีปริมาณฮิสติดีนแตกต่างกัน เมื่อปลาเกิดการเน่าเสีย ปลาที่มีปริมาณฮิสติดีนสูงจะถูกเปลี่ยนเป็นฮิสตามีนในปริมาณที่สูงกว่าปลาที่มีปริมาณฮิสติดีนต่ำ (Dalgaard 2014, Dalgaard & Baillin 2008) พบว่าหลังจากเก็บปลาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนาน 48 ชั่วโมง เมื่อเกิดการเน่าเสีย ปริมาณฮิสตามีนที่เกิดขึ้นในปลาที่มีเนื้อสีคล้ำจะมีปริมาณสูงกว่าปลาเนื้อขาว (Pan & James, 1985) (2) แบคทีเรียที่ผลิตฮิสตามีน (Histamine forming bacteria) ซึ่งเป็นกลุ่มที่สร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (Decarboxylase) ได้ มีหลายชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ

โดยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (Mesophillic bacteria) ที่ 20 – 40 องศาเซลเซียส ชนิดของจุลินทรีย์ที่พบขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในแหล่งน้ำที่ปลาอาศัยอยู่ มีรายงานการศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตฮิสตามีนได้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในตระกูล *Enterobacteriaceae, Pseudomonaceae* และ *Bacillaceae* (Doyle *et al*., 1997) โดยเฉพาะแบคทีเรียในสกุล *Bacillus, Citrobacter, Clostridium, Enterococcus, Escherichia, Hafnia, Klebsiella, Lactobacillus, Moganella, Pediococcus, Photobacterium, Proteus, Pseudomonas, Raoultella, Salmonella, Shigella* และ *Staphylococcus* (European Food Safety Authority, 2011; ten Brink *et al*., 1990) (3) สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ หากมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสยิ่งส่งเสริมให้เชื้อเหล่านั้นสามารถผลิตฮิสตามีนได้ดียิ่งขึ้น ทั้งนี้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ผลิตฮิสตามีนค่อนข้างมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ แต่โดยทั่วไปสภาวะที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ (1) ชนิดและปริมาณของสารอาหาร (2) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) (3) ระยะเวลาในการเก็บรักษา (4) อุณหภูมิในการเก็บรักษา (5) ปริมาณออกซิเจน (6) ค่าวอเตอร์แอคทีวิตี้ (Water activity, a_w) และ (7) ปริมาณเกลือ (McSwane, 2003) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส จะยิ่งเป็นปัจจัยส่งเสริมให้เกิดพิษฮิสตามีน

การเติมเกลือลงในอาหาร ปริมาณเกลือ (NaCl) จะมีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (Decarboxylase) ที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus capitis*, *Enterobacter cloacae* และ *Pantoea agglomerans* ซึ่งช่วยลดการเกิดฮิสตามีน ในทางกลับกันการเติมเกลือจะปรับปรุงการทำงานของเอนไซม์ฮิสทีดีน ดีคาร์บอกซิเลส (Histidine Decarboxylase) ที่สร้างจากเชื้อ *Staphylococcus* spp. ทำให้เกิดฮิสตามีน ดังนั้นกล่าวได้ว่าเกลือจะส่งผลได้ทั้งการยับยั้งและการกระตุ้นการเอนไซม์ที่มีผลต่อการสร้างสารกลุ่มไบโอเจนิกเอมีน (Chanudom & Thongsom, 2014) มีรายงานการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฮิสตามีนของเชื้อ *Proteus* จำนวน 3 สายพันธุ์ โดยสภาวะที่ pH 5-7 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0-8 และที่อุณหภูมิ 4-35 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีที่ pH 5 เมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 4 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Ababouch *et al*., 1991) ในขณะที่ค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตฮิสตามีนของเชื้อ *Streptococcus cremoris* อยู่ที่ 5.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตของฮิสตามีอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส (Babu *et al.,* 1986) นอกจากนี้พบว่า เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ผลิตเอนไซม์ฮิสทีดีน ดีคาร์บอกซิเลสได้มากที่สุด ที่ pH 4.0 และเชื้อนี้จะผลิตเอนไซม์ลดลง ร้อยละ 70 ที่ pH 6.0 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสได้ดีเมื่อเจริญในสภาวะ pH ต่ำ (Dapkevicius *et al.,* 2000)

การศึกษาครั้งนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการปรับปรุงกระบวนการผลิตปลาส้มจากปลานวลจันทร์ทะเล พร้อมทั้งควบคุมคุณภาพให้ได้คุณลักษณะปลาส้มที่ดี มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยเฉพาะความปลอดภัยจากพิษของฮิสตามีนที่อาจเกิดขึ้นจากผลิตภัณฑ์ไม่ได้คุณภาพ ซึ่งปลานวลจันทร์ทะเลเป็นอีกหนึ่งการสนับสนุนให้เกษตรกรขยายพันธุ์เพาะเลี้ยงของโครงการฟาร์มทะเลตัวอย่างตามพระราชดำริ ในสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถในรัชกาลที่ 9 จังหวัดเพชรบุรี มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของปริมาณเกลือที่ใช้กับปลาก่อนนำไปหมักด้วยส่วนผสมอื่น ระหว่างรูปแบบการใช้เกลือทาตัว

ปลาโดยตรงกับวิธีแช่ปลาในน้ำเกลือ ต่อคุณภาพของปลาส้มจากปลานวลจันทร์ทะเล ศึกษาผลของเกลือต่อการยอมรับคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ปลาส้มจากปลานวลจันทร์ทะเลที่พัฒนาได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ขั้นตอนเตรียมปลานวลจันทร์ทะเลไร้ก้าง

เริ่มจากขอดเกล็ดปลา แล้วล้างทำความสะอาด ผ่าหลังให้เหลือท้องติดกัน ควักไส้ แล่กระดูกแกนกลางชิ้นใหญ่ และตัดครีบปลา ซึ่งเรียกลักษณะการแล่รูปแบบผีเสื้อ (Butterfly fillet) จากนั้นล้างทำความสะอาดปลา ก่อนนำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 1 คืน เพื่อให้เนื้อปลาอ่อนตัวลง ก่อนเข้าสู่กระบวนการถอดก้างต้องกรีดเนื้อปลาตามแนวก้างเล็ก 4 แนว เพื่อถอดก้างออก จนได้ปลานวลจันทร์ทะเลไร้ก้าง จากนั้นจึงเก็บรักษาปลานวลจันทร์ทะเลไร้ก้างแบบแช่แข็ง (บรรจุในถุงเย็นชนิดหนาก่อนปิดผนึกแบบสุญญากาศ แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส)

2. กรรมวิธีการผลิตปลาส้ม

นำปลานวลจันทร์ทะเลไร้ก้างแช่แข็งมาละลายน้ำแข็งด้วยการนำมาแช่ในตู้เย็น (5 องศาเซลเซียส) 1 คืน ในกระบวนการหมักปลาส้มมีการเตรียมปลาด้วยการใช้เกลือ ก่อนนำไปหมักด้วยส่วนผสมอื่น ในการทดลองนี้แบ่งการศึกษาการใช้เกลือเป็น 2 รูปแบบ ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 10 15 และ 18 คือ 1) รูปแบบการใช้เกลือทาตัวปลาโดยตรง (% w/w) (ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ใช้เกลือ 100 กรัม ต่อปลา 1000 กรัม) เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง จึงนำมาล้างน้ำเพื่อเอาเกลือออก ผึ่งแดดให้สะเด็ดน้ำ แล้วหมักปลากับส่วนผสมทั้งหมด (กระเทียมบดหยาบ ข้าวสวย น้ำตาลทราย น้ำกระเทียมดอง และรสดีไก่) และ 2) รูปแบบการใช้ปลาแช่ในน้ำเกลือ โดยใช้เกลือละลายน้ำ (ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ใช้เกลือ 100 กรัม ต่อปริมาตรน้ำ 1000 มิลลิลิตร ต่อปลา 1000 กรัม) จากนั้นแช่ตัวปลานาน 15 นาที แล้วนำปลาผสมกับส่วนผสมทั้งหมด หมักในถุงสุญญากาศไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) 6 วัน (5 คืน) (ดังแสดงในภาพที่ 1)

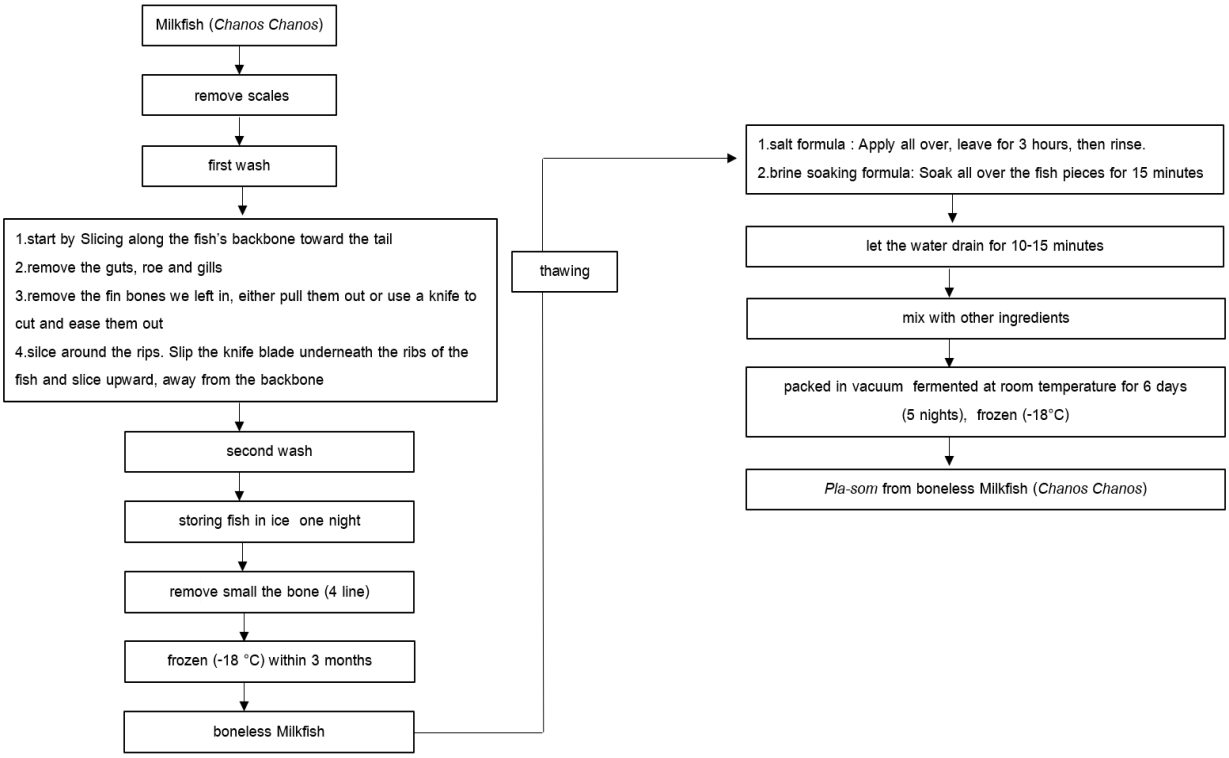

Figure 1 Process diagram of Pla-som from boneless Milkfish (*Chanos Chanos*)

3. วิธีการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี (Chemical) และจุลินทรีย์ (Microorganism) ในผลิตภัณฑ์ปลาส้ม

การทดสอบคุณภาพทางเคมี ของงานวิจัยนี้ทั้งหมดผ่านการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) โดยใช้หลักการอ้างอิงตามวิธีการของ AOAC (2019) ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณวอเตอร์แอคทีวิตี้ (Water Activity; a_w) ปริมาณเกลือ (NaCl) การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนฮิสทิดีน (Histidine) ในวัตถุดิบปลา-นวลจันทร์ทะเล ใช้หลักการอ้างอิงตามวิธีการของ Official Journal of the European Communities (1998)

การหาปริมารสารฮิสตามีน (Histamine) อ้างอิงพื้นฐานตามวิธีการของ AOAC (2019) โดยนำตัวอย่างเนื้อปลาบริเวณต่าง ๆ (ตัวอย่างถูกบดผสมรวมกันให้เป็นเนื้อเดียวก่อนชั่งตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์) 5 ± 0.02 กรัม ลงในหลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร เติมเมทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 75 จนได้ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่อง Ultrasonicate เป็นเวลา 5 นาที วางในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 60 ± 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตร ด้วยเมทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 75 จนได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ได้ ปริมาตร1 มิลลิลิตร ใส่ใน Anion exchange resin column แล้วเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ปล่อยให้สารละลายไหลจากคอลัม (Column) 3 มิลลิลิตรต่อนาที ลงในขวดวัดปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มี 1 N HCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นครั้งละปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในคอลัมตลอดระยะเวลา (ระวังอย่าให้เรซิ่นแห้ง) จากนั้นปิดคอลัม เมื่อได้สารละลายปริมาตรเกือบครบ 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 50 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการทำให้เกิดอนุพันธ์ฮิสตามีน เติม 1 N HCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดดูแรนขนาด 50 มิลลิลิตร (ถ้าเป็น Blank เติม 1 N HCl ปริมาตร 15 มิลลิลิตร) ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดดูแรนแล้วเขย่าให้สารละลายเข้ากัน เติม 1 N NaOH ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีทิ้งไว้ 5 นาที เติมร้อยละ 0.1 *O*-phthaldialdehyde (OPA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันวางไว้ในที่มืด เป็นเวลา 4 นาที เติมสารละลาย 3.57 N H_3PO_4 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (intensity) ด้วยเครื่อง Fluorometer ที่ Ex = 360 nm, em = 450 nm

ด้านการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ของงานวิจัยนี้ทั้งหมด ผ่านการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) โดยอ้างอิงวิธีการมาตรฐานของ BAM (2001) เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยใช้ปลาส้ม 50 กรัม เติม Butterfield's Phosphate-Buffered (pH 7.2) 450 มิลลิลิตร แล้วเจือจางเป็นลำดับให้อยู่ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยวิธี serail dilution จากนั้นจึงหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Viable Count; TVC) ด้วยการ Pour Plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) บ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส นาน 48±2 ชั่วโมง และหากลุ่มแบคทีเรียแลคติก (Lactic Acid Bacteria; LAB) ด้วยการ Pour Plate บน De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS Agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส นาน 72±3 ชั่วโมง จากนั้นนำจานเพราะเชื้อที่มีจำนวน 15-300 โคโลนี มาทดสอบการย้อมแกรม (Gram staining) และสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test) โดยกลุ่มแบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส

4. การทดสอบทางประสาทสัมผัสผลิตภัณฑ์ปลาส้มทอด

นำปลาส้มมาทำความสะอาด กำจัดเศษข้าวหรือเครื่องหมักออก คลุกด้วยแป้งสาลีเอนกประสงค์บาง ๆ แล้วทอดในน้ำมันพืช ด้วยไฟกลางค่อนไปทางอ่อนประมาน 10 นาที หรือจนกว่าจะสุกทั่วชิ้นเป็นสีเหลืองทอง จากนั้นหั่นเป็นชิ้นพอคำ เพื่อทดสอบทางประสาทสัมผัส ประกอบด้วยการพรรณาคุณลักษณะ และการให้คะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏโดยรวม สี กลิ่นปลาส้ม รสเปรี้ยว รสชาติโดยรวม เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม จากผู้ทดสอบชิมที่มีความรู้ด้านศาสตร์อาหาร และเคยรับประทานปลาส้มจากปลาทะเล ได้แก่ อาจารย์และนักศึกษาสาขาการจัดการครัวและศิลปะการประกอบอาหารในวิทยาลัยดุสิตธานี จำนวน 30 ท่าน โดยใช้แบบสอบถามเพื่อประเมินระดับความชอบด้วยฮีโดนิก 9 ระดับ (9 Points Hedonic test) โดยคะแนน 9 หมายถึง ชอบมากที่สุด 8 หมายถึง ชอบมาก 7 หมายถึง ชอบปานกลาง 6 หมายถึง ชอบเล็กน้อย 5 หมายถึง ไม่มีความแตกต่าง 4 หมายถึง ไม่ชอบเล็กน้อย 3 หมายถึง ไม่ชอบปานกลาง 2 หมายถึง ไม่ชอบมาก และ 1 หมายถึง ไม่ชอบที่สุด งานวิจัยนี้ได้รับการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ เลขที่ใบรับรอง DPE. No. RSUERB2022-026

การวิเคราะห์ค่าสถิติ

รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย (Mean) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test โดยกำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ผลการวิจัย

จากการทดลองเมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนฮิสติดีน (Histidine) ในเนื้อปลานวลจันทร์ทะเลสด ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสารฮิสตามีน พบว่าปลานวลจันทร์ทะเลมีปริมาณกรดอะมิโนฮิสติดีนสูงมาก อยู่ในช่วง 1658.48-1829.06 mg/100g การทดลองใช้ปริมาณเกลือ (NaCl) ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือร้อยละ 10 15 และ 18 พบว่าปลาส้มที่ผลิต 1) รูปแบบการใช้เกลือทาตัวปลาโดยตรง (สูตรทาเกลือ) เมื่อวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของผลิตภัณฑ์ปลาส้มมีความเป็นกรด-ด่าง หรือค่าพีเอช (pH) ค่อนข้างใกล้เคียงกัน ปลาส้มที่ผลิตด้วยความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 15 มี pH 4.38 ซึ่งเป็นกรดสูงที่สุด ค่าวอเตอร์แอคทีวิตี้ (a_w) ที่ใช้เกลือความเข้มข้นร้อยละ 10 ไม่ต่างจากปลาสดคือ 0.99 และที่ใช้เกลือความเข้มข้นร้อยละ 15 และ 18 มีค่า a_w เท่ากับ 0.98 ($P>0.5$) ปริมาณเกลือในผลิตภัณฑ์ปลาส้มเพิ่มขึ้น จาก 1.5 เป็น 1.82 และ 2.09 g/100g ตามลำดับ เมื่อเติมเกลือเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 10 ถึง 18 เมื่อวิเคราะห์คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ พบว่า ปลาส้มสูตรทาเกลือมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (TVC) อยู่ในช่วง 1.2-2 x 10^8 cfu/g และกลุ่มแบคทีเรียแลคติก (LAB) 8-17 x 10^7 cfu/g และปริมาณสารฮิสตามีน (Histamine) อยู่น้อยมาก 8.46-30.99 mg/kg สำหรับปลาส้มที่ผลิต 2) รูปแบบการใช้ปลาแช่ในน้ำเกลือ (สูตรแช่น้ำเกลือ) เมื่อใช้ปริมาณเกลือเพิ่มขึ้นร้อยละ 10 15 และ 18 ผลิตภัณฑ์ปลาส้มที่หมักมีค่า pH เพิ่มขึ้นจาก 5.02 5.33 และ 5.60 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และสอดคล้องกับปริมาณเกลือที่เพิ่มขึ้นจาก 3.32 เป็น 3.87 และ 4.88 g/100g ตามลำดับ ในขณะที่ a_w สูตรแช่น้ำเกลือร้อยละ 10 และ 15 คือ 0.96 และที่เกลือร้อยละ 18 ค่า a_w ลดลงอยู่ที่ 0.94 ซึ่งสัมพันธ์กับความเข้มข้นของเกลือที่ใช้ ขณะที่ปลาส้มสูตรแช่ในน้ำเกลือมีปริมาณสารฮิสตามีนแปรผันอยู่ระหว่าง 10.56-31.49 mg/kg

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีการผลิตสูตรทาเกลือและสูตรแช่น้ำเกลือ พบว่าปลาส้มสูตรแช่น้ำเกลือ มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลินทรีย์มากกว่าสูตรทาเกลือ โดยมีการเปลี่ยนแปลงตามระดับความเข้มข้นของเกลืออย่างเห็นได้ชัด คือ เมื่อระดับความเข้มข้นของเกลือมากขึ้น ค่า a_w จะลดลง และปริมาณเกลือในผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะเพิ่มขึ้น สัมพันธ์กับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (TVC) และกลุ่มแบคทีเรียแลคติก (LAB) ที่ลดลง ตามระดับความเข้มข้นของเกลือที่มากขึ้น ส่งผลให้ค่า pH เพิ่มขึ้น ที่สำคัญคือทั้งสองกรรมวิธีการผลิตเมื่อควบคุมกระบวนการผลิตได้ดี เก็บรักษาปลาสดที่อุณหภูมิแช่เย็น (5°C) ตลอดเวลา จะส่งผลให้ปริมาณสารฮิสตามีนในผลิตภัณฑ์นั้นมีปริมาณน้อยมาก ดังแสดงในตารางที่ 1

ด้านคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ปลาส้ม (ภาพที่ 2 และ 3) ได้ปลาส้มที่มีคุณลักษณะปรากฏพึงประสงค์ที่ดี เมื่อทดสอบทางประสาทสัมผัสผลิตภัณฑ์ปลาส้มโดยผู้ทดสอบ 30 คน (ตารางที่ 3) พบว่าปลาส้มสูตรทาเกลือที่ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 10 15 18 และปลาส้มสูตรแช่น้ำเกลือที่ความเข้มข้น ร้อยละ 10 ได้คะแนนความชอบด้าน สี กลิ่น-รส รสเปรี้ยว รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมมากกว่าตัวอย่างทางการค้า (ปลาส้มจากปลานวลจันทร์ทางการค้าซื้อจาก จ. ชัยภูมิ) ขณะที่ปลาส้มที่ผลิตด้วยสูตรแช่น้ำเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 และ 18 มีรสชาติที่เค็มเกินไป ความเปรี้ยวน้อยมาก ทำให้คะแนนความชอบอยู่ในช่วง 4-5 คะแนน ซึ่งจัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผู้ทดสอบชิมให้คะแนนอยู่ในระดับไม่ชอบเล็กน้อย-เฉยๆ

Table 1 Chemical and Microbial Quality of Pla-som from Milkfish at different formular and varity salt concentration

Treat-ment	salt concent	pH	a_w	NaCl g/100g	TVC cfu/g	LAB cfu/g	Histamine mg/kg
Boneless fish		5.82±0.01^{F}	0.99±0.00^{d}	0.15±0.01^{a}	4.2±0.00x10^{4a}	<10^{a}	3.41±0.02^{a}
	10%	4.54±0.01^{b}	0.99±0.00^{d}	1.5±0.01^{b}	1.2±0.32x10^{8e}	1.4±0.06x10^{8c}	30.99±1.00^{f}
salt	15%	4.38±0.01^{a}	0.98±0.00^{c}	1.82±0.09^{c}	1.2±0.08x10^{8e}	8.0±0.05x10^{7bc}	8.46±0.89^{b}
formular	18%	4.57±0.01^{b}	0.98±0.01^{c}	2.09±0.08^{d}	2.0±0.35x10^{8f}	1.7±0.03x10^{8c}	22.13±0.11^{d}
brine	10%	5.02±0.01^{c}	0.96±0.01^{b}	3.32±0.05^{e}	1.0±0.32x10^{8d}	1.1±0.05x10^{8bc}	31.49±0.10^{f}
soaking	15%	5.33±0.01^{d}	0.96±0.01^{b}	3.87±0.02^{f}	5.4±0.47x10^{7c}	1.4±0.00x10^{7b}	10.56±0.10^{c}
formula	18%	5.60±0.10^{e}	0.94±0.01^{a}	4.88±0.07^{g}	2.1±0.04x10^{7b}	6.2±0.00x10^{5b}	24.81±0.12^{e}

values within a column followed by the same lowercase letter are significantly different at $p < 0.05$

เมื่อพิจารณาจากคะแนนความชอบโดยรวมพบว่า ปลาส้มสูตรทาเกลือ ร้อยละ 18 และสูตรแช่น้ำเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แม้ว่าผู้ทดสอบชิมส่วนใหญ่ให้คะแนนความชอบลักษณะแต่ละด้านสูตรแช่น้ำเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 มากกว่า แต่เมื่อพิจารณาคุณภาพทางเคมีและจุลินทรีย์ของปลาส้ม (ตารางที่ 1) สูตรทาเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 18 มีค่า pH ต่ำกว่า 4.6 แนะนำได้ว่า ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยต่อการบริโภค เนื่องจากสภาวะที่เป็นกรดสูงสามารถยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์ *Clostridium botulinum* ซึ่งผลิตสารพิษที่เป็นอันตรายรุนแรงต่อมนุษย์ จึงเห็นสมควรว่า ควรเลือกใช้สูตรทาเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 18 ในการผลิตจะดีที่สุด โดยปลาส้มที่ผลิตด้วยสูตรทาเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 18 ได้คะแนนด้านสี 7.3 กลิ่น-รส 7.1 รสเปรี้ยว 6.04 รสชาติ 7.2 เนื้อสัมผัส 7.2 และความชอบโดยรวม 7.3 คะแนน (ตารางที่ 2) ซึ่งเป็นความชอบโดยรวมระดับชอบปานกลาง

Figure 2 Fried Pla-som for sensory test

Figure 3 Pla-som Products

Table 2 The liking scores of fried Pla-Som at different formular and varity salt concentration

sample	salt concent	colour	flavour	sour	taste	texture	overall
commercial product	-	6.6±1.84^{ab}	5.3±1.49^{a}	4.9±2.05^{a}	5.4±1.63^{ab}	6.8±1.42^{c}	5.7±1.54^{ab}
salt formular	10%	6.4±1.18^{ab}	6.9±1.43^{c}	6.7±1.08^{bc}	6.3±1.71^{bc}	5.1±1.57^{a}	6.1±1.90^{b}
	15%	6.1±1.22^{a}	6.6±1.63^{bc}	7.0±1.95^{c}	6.3±1.79^{bc}	6.6±1.05^{c}	6.5±1.76^{b}
	18%	6.4±1.54^{ab}	6.6±1.68^{abc}	6.8±1.35^{c}	7.3±1.27^{c}	6.3±1.75^{bc}	7.3±1.17^{c}
brine soaking formula	10%	7.3±1.23^{b}	7.1±1.64^{c}	6.04±1.66^{c}	7.2±1.01^{c}	7.2±0.77^{c}	7.3±1.04^{c}
	15%	6.9±1.53^{ab}	5.5 ±1.76^{ab}	4.2±1.38^{a}	4.8±1.35^{a}	5.4±1.17^{ab}	4.8±1.42^{a}
	18%	6.9±1.03^{ab}	6.1±1.55^{abc}	4.3±1.48^{ab}	5.5±1.12^{ab}	6.2±1.12^{bc}	5.6±1.59^{ab}

mean (n=30) ± standard deviation, values within a column followed by the same lowercase letter are significantly different at $p < 0.05$

Table 3 Descriptive data on Pla-Som at different formular and varity salt concentration

sample	salt concent	Characteristics
commercial product	-	Raw; Good appearance, colour is pink, fermented ordor, firm Fried pla-som; fermented ordor, taste is sour and salty, flavour is slightly sour, firm
salt formular	10%	Raw; Good appearance, pinkish gray, fermented ordor, firm Fried pla-som; fermented ordor and taste of product stronger than the commercial product and other sample, flavour is sour, firm
	15%	Raw; Good appearance, pinkish gray, fermented ordor, firm Fried pla-som; fermented ordor and taste of product stronger than the commercial product, flavour is sour, firm
	18%	Raw; Good appearance, pinkish gray, fermented ordor, firm Fried pla-som; fermented ordor and taste of product stronger product, flavour is not much sour taste, sweet, salty, mellow taste, firm
brine soaking formula	10%	Raw; Good appearance, pinkish gray, fermented ordor, firm Fried pla-som; fermented ordor and taste of product stronger product, flavour is sour and salty, sweet and mellow taste not too sour, firm
	15%	Raw; Good appearance, pinkish gray, fermented ordor, firm Fried pla-som; fermented ordor and taste of product stronger product, flavour is sour and salty flavors drown out the sweet taste, firm
	18%	Raw; Good appearance, pinkish gray, fermented ordor, firm Fried pla-som; fermented ordor and taste of product stronger product, flavour is the taste is a little salty, not sweet, firm

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการทดลองการผลิตปลาส้มด้วยวิธีทาเกลือ (สูตรทาเกลือ) และวิธีแช่น้ำเกลือ (สูตรแช่น้ำเกลือ) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่ร้อยละ 10 15 และ 18 มีผลต่อคุณภาพทางเคมี จุลินทรีย์ และคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ปลาส้มที่ได้ พบว่าการผลิตปลาส้มสูตรทาเกลือมีปริมาณเกลือในระบบน้อยกว่าสูตรแช่น้ำเกลือ ส่งผลให้แบคทีเรียแลคติก (LAB) เจริญได้ดีกว่าสูตรแช่น้ำเกลือ เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกเจริญได้ในปริมาณเกลือความเข้มข้นที่ร้อยละ 0-15 แต่เจริญได้ดีในช่วงร้อยละ 2.5-5.0 ซึ่งแบคทีเรียแลคติกชนิดที่ทนเกลือ (Halotolerance) เป็นพวกสามารถเจริญได้ทั้งสภาพมีเกลือและไม่มีเกลือ โดยทั่วไปแบคทีเรียพวกนี้สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือร้อยละ 5 หรือมากกว่า (Chaikulsareewath *et al*., 2015; Namwong, 2010) ดังนั้นเมื่อ LAB เจริญเติบโตจะผลิตกรดแลคติก ทำให้ค่า pH ของผลิตภัณฑ์ปลาส้มลดลง ในขณะที่สูตรแช่น้ำเกลือจะมีปริมาณเกลือ (NaCl) ในระบบสูง ทำให้ aw ต่ำ จึงไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ LAB ส่งผลให้ pH ของผลิตภัณฑ์ปลาส้มลดลงเพียงเล็กน้อย กล่าวคือเกิดการออสโมซิส (Osmosis) ของเกลือ เนื่องจากความเข้มข้นที่แตกต่างกันระหว่างเกลือในสารละลายที่ใช้หมัก และภายในปลาที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ทำให้น้ำในปลาเคลื่อนออกมาภายนอก ในขณะที่เกลือแพร่เข้าไปในเนื้อปลา มีผลทำให้มีค่า a_w ของตัวอย่างลดลง นอกจากนี้เกลือ (NaCl) มีส่วนสำคัญที่ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุการเสื่อมเสียของอาหาร (Microbial spoilage) และจุลินทรีย์ก่อโรค (Pathogen) รวมทั้งพยาธิ (Parasite) ซึ่งเป็นอันตรายในอาหาร ทำให้อาหารมีความปลอดภัยต่อการบริโภค ซึ่งการใช้เกลือในรูปสารละลายที่ความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 4 จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (Microbial spoilage) ได้เกือบทุกชนิด ยกเว้นแบคทีเรียที่ชอบเกลือ (Halophilic bacteria) บางชนิด ทั้งนี้การใช้เกลือเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ทุกชนิดอย่างสมบูรณ์ ต้องการความเข้มข้นไม่ต่ำกว่าร้อยละ 17 แต่อาจทำให้อาหารมีรสเค็มจัดเกินไป

แม้ว่าปลานวลจันทร์ทะเลสดโดยธรรมชาติมีปริมาณกรดอะมิโนฮิสติดีน (Histidine) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสารฮิสตามีนโดย Kongrat & Kongpun (2015) รายงานปริมาณกรดอะมิโนฮิสติดีนในปลานวลจันทร์ทะเลเท่ากับ 344.09 mg/100g การศึกษานี้พบว่าปลานวลจันทร์ทะเลที่เลี้ยงในบ่อดินมีปริมาณกรดอะมิโนฮิสติดีนสูงมาก อยู่ในช่วง 1658.48-1829.06 mg/100g ดังนั้นจากปัจจัยด้านชนิดของปลาซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดฮิสตามีน หากระหว่างกระบวนการผลิตมีปัจจัยด้านชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตฮิสตามีนได้อยู่มาก ประกอบกับอยู่สภาวะในการเก็บรักษาสภาวะการหมักที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการมีอยู่และศักยภาพในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่สร้างฮิสติดีนดีคาร์บอกซิเลส (Histidine decarboxylase) อันเกิดจากการย่อยสลายกรดอะมิโนฮิสติดีนที่มีอยู่มากในปลาให้เปลี่ยนเป็นฮิสตามีน ซึ่งเป็นหนึ่งในสารพิษกลุ่มไบโอจินิกเอมีน (Biogenic amines) จะส่งเสริมให้ปริมาณฮิสติดีนจำนวนมากในปลานวลจันทร์ทะเลสดเป็นสารตั้งต้นในการเปลี่ยนเป็นสารพิษได้มากขึ้น แต่ปลาส้มจากทั้งสองกรรมวิธีการผลิตมีปริมาณสารฮิสตามีนในผลิตภัณฑ์น้อยมาก (สูงสุดที่ 31.49 mg/kg) อยู่ในระดับที่ปลอดภัยคือไม่เกิน 200 mg/kg (FAO/WHO, 2013) เป็นคุณลักษณะพึงประสงค์ในผลิตภัณฑ์ปลาส้ม โดย Chanudom & Thongsom (2014) รายงานการตรวจหาสารอิสตามีนในตัวอย่างอาหารทะเลหมักของจังหวัดนครศรีธรรมราช สูงสุดอยู่ที่ 75-100 mg/kg การทดลองครั้งนี้เมื่อผลิตด้วยวิธีทาเกลือจะเกิดกระบวนการหมักอย่างรวดเร็วกว่า จึงควรช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างเอนไซม์ฮิสตามีน

ดีคาร์บอกซีเลส (Histamine Decarboxylase bacteria) ได้ดีกว่าวิธีแช่น้ำเกลือ อย่างไรก็ตามผลการทดลองไม่พบความสัมพันธ์ของ Histamine และ LAB ซึ่งอ้างถึง Chanudom & Thongsom (2014) ได้ระบุว่าปริมาณเกลือ (NaCl) ที่เติมลงไปในอาหารจะสามารถมีผลต่อการทำงานของ Amino decarboxylase และการยับยั้งเอนไซม์ Decarboxylase จากแบคทีเรียบางกลุ่ม ได้แก่ *Staphylococcus capitis*, *Enterobacter cloacae* และ *Pantoea agglomerans* ในทางกลับกันการเติมเกลือจะปรับปรุงการทำงานของเอนไซม์ Histidine decarboxylase ที่สร้างจากเชื้อ *Staphylococcus* spp. ดังนั้น กล่าวได้ว่าเกลือจะส่งผลได้ทั้งการยับยั้งและการกระตุ้นการสร้างสารกลุ่มไบโอเจนิกเอมีนต้องอาศัยหลากหลายปัจจัย โดย Chanudom & Thongsom (2014) ได้ทำการศึกษาและมีรายงานผลการทดลองต่อว่าปริมาณเกลือไม่มีผลยับยั้งการเกิดฮิสตามีน โดยรายงานการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างฮิสตามีนมา 3 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถสร้างฮิสตามีนสูงที่สุด อยู่ที่ 41.26 - 41.29 mg/kg และเมื่อนำเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มาศึกษาผลของปริมาณเกลือต่อการสร้างฮิสตามีนของเชื้อ พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในทุกระดับความเข้มข้นของเกลือ ทั้งนี้ปริมาณเกลือตั้งแต่ร้อยละ 5-20 ไม่มีผลต่อการยับยั้งการสร้างฮิสตามีน โดยสายพันธุ์ที่สร้างฮิสตามินได้สูงสุดมีค่าอยู่ที่ 411.27 mg/kg ในขณะที่ Besas & Dizon (2012) พบว่าปริมาณเกลือมีผลยับยั้งการเกิดฮิสตามีน รายงานว่าปริมาณฮิสตามีนที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักไตปลาทูน่า (Dayok) ที่อุณหภูมิห้อง เวลานาน 7 วัน ที่ความเข้มข้นเกลือร้อยละ 10 17.5 และ 25 มีความแตกต่างกัน โดยส่งผลต่อคุณภาพทางเคมี และจุลินทรีย์ ของไตปลาหมัก พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณกรดแลกติค (Lactic acid) อะมิโน ไนโตรเจน (Amino Nitrogen) และปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total volatile base nitrogen; TVB-N) เพิ่มขึ้นตลอดเวลาการหมัก พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (Total plate count; TVC) และแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria) ลดลง เมื่อความเข้มข้นของเกลือมากขึ้น ขณะที่ปริมาณฮิสตามีนลดลงเรื่อย ๆ ตลอดระยะเวลาในการหมัก โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของเกลือสูง ทำให้ผลลัพท์สุดท้ายไตปลาหมักมีค่าฮิสตามีนอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของ FDA (200 mg/kg) ยกเว้นที่ใช้ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 10 แสดงว่าการใช้เกลือที่ความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 17 สามารถลดการเกิดฮิสตามีนในผลิตภัณฑ์ได้ จากรายงานที่กล่าวมาดังนั้นจึงพอสรุปได้ว่าการเกิดฮิสตามีนในผลิตภัณฑ์อาหารหมักมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย ไม่ใช่เพียงความเข้มข้นของเกลือ

ด้านคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ปลาส้มจากการทดลองได้ปลาส้มที่มีคุณลักษณะปรากฏพึงประสงค์ที่ดี เมื่อทดสอบทางประสาทสัมผัสผลิตภัณฑ์ปลาส้มที่ได้โดยผู้ทดสอบ 30 คน พบว่าปลาส้มสูตรที่พัฒนาขึ้น ได้คะแนนความชอบทั้งสี กลิ่น-รส รสเปรี้ยว รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมมากกว่าตัวอย่างทางการค้า จากการทดลองเมื่อปริมาณเกลือที่ใช้มากขึ้นจะส่งผลโดยตรงต่อรสเค็มของผลิตภัณฑ์ปลาส้ม โดยปลาส้มสูตรทาเกลือจะมีรสชาติเค็มน้อยกว่าสูตรแช่น้ำเกลือสอดคล้องกับปริมาณเกลือที่วิเคราะห์ได้ในผลิตภัณฑ์ปลาส้ม และปลาส้มที่ผลิตด้วยสูตรแช่น้ำเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ส่วนใหญ่ได้คะแนนความชอบสูงสุด คือ สี 7.3 คะแนน กลิ่น-รส 7.1 คะแนน เนื้อสัมผัส 7.2 คะแนน คะแนนความชอบด้านรสเปรี้ยว รสชาติ และความชอบโดยรวมได้คะแนนแตกต่าง โดยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับปลาส้มที่ผลิตด้วยสูตรทาเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 18 คือ 6.8 7.3 และ 7.3 คะแนน ตามลำดับ อย่างไรก็ตามปลาส้มที่ผลิตด้วยสูตรแช่น้ำเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 และ 18 มีรสชาติที่เค็มเกินไป ความเปรี้ยวน้อยมากจนได้คะแนนความชอบอยู่ในช่วง 4-5 คะแนน ซึ่งจัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผู้ทดสอบชิมซึ่งเป็นการจำลองกลุ่มผู้บริโภคให้คะแนนระดับไม่ชอบเล็ก-น้อยถึงเฉยๆ จะเห็น

ได้ว่าปริมาณความเข้มข้นของเกลือที่ต่างกันรวมทั้งกรรมวิธีการผลิตที่ใช้เกลือกับแช่ในน้ำเกลือก็ให้คุณลักษณะที่แตกต่างกัน ทั้งส่งผลต่อความชอบของผู้บริโภค และความปลอดภัยในผลิตภัณฑ์เช่นกัน โดยมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนสำหรับปลาส้ม (มผช. 26/2557) ระบุว่าปลาส้มที่ขายต้องมีค่า pH ต่ำกว่า 4.6 สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Rattanasena & Chaikham (2018) ที่สรุปไว้ว่าวัตถุดิบ สูตร และขั้นตอนการผลิตมีผลต่อคุณภาพ และลักษณะที่แตกต่างกันของผลิตภัณฑ์ปลาส้ม ทั้งนี้เนื่องจากคะแนนความชอบโดยรวมของปลาส้มสูตรแช่น้ำเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 และปลาส้มสูตรทาเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 18 ไม่แตกต่างกัน แม้ว่าผู้ทดสอบชิมส่วนใหญ่ได้คะแนนความชอบลักษณะแต่ละด้านสูตรแช่น้ำเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 มากกว่า แต่เมื่อพิจารณาคุณภาพทางเคมีและจุลินทรีย์ของปลาส้ม (ตารางที่ 1) สูตรทาเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 18 มีค่า pH ต่ำกว่า 4.6 จะทำให้มีความปลอดภัยต่อการบริโภค เนื่องจากสภาวะที่เป็นกรดสูงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคส่วนใหญ่ได้ จึงควรเลือกใช้สูตรทาเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 18 ในการผลิตจะดีที่สุด

สรุปผลการวิจัย

ปริมาณเกลือที่ใช้ในกระบวนการหมักส่งผลต่อคุณภาพของปลาส้มจากปลานวลจันทร์ทะเล โดยหลังจากหมักในถุงสุญญากาศที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) นาน 6 วัน ปลาส้มที่ผลิตสูตรทาเกลือจะมีปริมาณเกลือในระบบน้อยกว่าสูตรแช่น้ำเกลือ (NaCl) ทำให้ LAB เจริญได้ดีกว่า ดังนั้นเมื่อ LAB เจริญเติบโตจะผลิตกรดแลคติก ทำให้ค่า pH ของผลิตภัณฑ์ปลาส้มลดลง ในขณะที่สูตรแช่น้ำเกลือจะมีปริมาณเกลือในระบบสูง ทำให้ a_w ต่ำ ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ LAB ส่งผลให้ pH ของผลิตภัณฑ์ปลาส้มลดลงเพียงเล็กน้อย แม้ว่าปลานวลจันทร์ทะเลจะมีปริมาณฮิสทิดีนสูงและมีศักยภาพในการเกิดสารพิษฮิสตามีนได้ดี แต่เมื่อควบคุมการผลิตด้านความสดของปลาด้วยอุณหภูมิแช่เย็น ความสะอาด และสภาวะการหมักที่ดี จะได้ผลิตภัณฑ์ปลาส้มที่มีฮิสตามีนปริมาณน้อยมาก และจากการทดลองนี้ควรใช้การผลิตปลาส้มด้วยวิธีทาเกลือร้อยละ 18 ก่อนนำไปหมักกับส่วนผสมอื่นจะได้ปลาส้มคุณภาพดีที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากวิทยาลัยดุสิตธานี และเอื้อเฟื้อวัตถุดิบจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งเพชรบุรี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

Ababouch, L., Afilal, M.E., Rhafiri, S. & Busta, F.F. (1991). Identification of histamine-producing bacteria isolated from sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature (25°C). *Food Microbiol*, *8*, 127-136.

AOAC. (2019). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis of AOAC International. In W. Horwitz (Ed.), Method 937.09 - 981.12 (21st Edition). Washington DC, USA: Official Method of Analysis Chemists.

BAM. (2001). Bacteriological Analytical Manual Online Edition 2001(US-FDA), Total Plate Count or Aerobic Chapter 3

Babu, S., Chander, H., Batish, V.K. & Bhatia, K.L. (1986). Factors affecting amine production in *Streptococcus cremoris*. *Food Microbiol*, *3*, 359-362.

Besas, J.R. & Dizon, E.I. (2012). Influence of Salt Concentration on Histamine Formation in Fermented Tuna Viscera (Dayok). *Food and Nutrition Sciences*, *3*, 201-206.

Chaikulsareewath, A. (2014). Histamine Reduction in Fish and Fishery Products by Microorganisms. *Journal of Food Technology Siam University*, *9*(1), 1-8.

Chaikulsareewath, A., C. Chooprom & A. Mana. (2015). Screening of protease producing halophilic bacteria from fermented fish (*pla-ra*). *Journal of Food Science and Technology of Silpakorn University*, *10*(1), 1-8. (in Thai)

Chanudom L. & Thongsom, M. (2014). Halotolerant histamine-forming bacteria and biogenic amine contents of fermented seafood products in Nakhon si Thammarat province, Thailand. Nakhon Si Thammarat Rajabhat University. (in Thai)

Dalgaard, P. & Baillin. N. Z. (2008). Histamine and biogenic amines: formation and importance in seafood. In T. Børresen (editors), *Improving seafood products for the consumer*. (pp.292-324) 1 Edition, Woodhead Publishing Limited: Cambridge.

Dalgaard, P. (2014). Safety and Health Effects of Aquatic Food Histamine and biogenic amines – formation and importance in marine fish products.

Dapkevicius, M.L.N.E., Nout, M.J.R., Rombouts, F.M., Houben, J.H. & Wymenga, W. (2000). Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *Int J Food Microbiol*. *57*, 107-114.

Doyle, M.P., Beuchat, L.R. & Montville, T.J. (1997). Food Microbiology: *Fundamentals and Frontiers* (872 p.). ASM Press, Washington, DC.

European Food Safety Authority. (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. Panel on biological hazards. *Eur. Food Safety Authority J*, *9*(10), 2393-2487.

FDA. (2001). Scombrotoxin (histamine) formation. Ch. 7. In Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. 3rd ed., p. 83-102. *Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood*, Washington, DC.

FAO/WHO. (2013). Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. Meeting report.

Kongrat W. & Kongpun O. (2015). Product Development from Milkfish (Chanos chanos, Forskal). (8/2015). *Fishery Technological Development Division, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives*. (in Thai)

McSwane D., Rue R. N., Linton R. and Williams G. F., (2003). *Essentials of Food Safety and Sanitation: Food Safety Fundamentals*, New Jersey: Pearson Education.

Namwong, S. (2010). Halophilic bacteria potential for development of Thai fish sauce industry. *J. Sci. Technol. MSU*, *29*(4), 470-477. (in Thai)

Official Journal of the European Communities, L 257, (1998), p. 0014-0028

Pan, B.S. & James, D. (1985). Effects of freezing and subsequent thaw abuse. In B. S. Pan and D. James (editors), *Histamine in marine products: Production by bacteria, measurement and prediction of formation*, (p. 36). FAO Fish. Tech. Pap. 252.

Rattanasena, P., & Charkha, P. (2018). Physical, Chemical and Microbiological Qualities of Plaa-Som as Commercialized in Phranakhon Si Ayutthaya Province on Consumer Acceptance. *Burapha Science Journal*, *23*(2), 753-766. (in Thai)

Ten Brink, B., Damink, C., Joodten, H.M.L.J. & Huis in't Veld, J.H.J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int J Food Microbiol*, *11*, 73-84.

Wongwiwat N. (2010). The Study on Growth Rate of MilkFish (*Chanos chanos* Forskal, 1775) with Pellet Feed in the Earthen Pond. M.S. *Thesis Maejo University*. (in Thai)

Yemmen, C. & Gargouri, M. (2022). Potential hazards associated with the consumption of Scombridae fish: Infection and toxicity from raw material and processing. *Journal of Applied Microbiology*, *132,* 4077–4096.