บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาการทำวิจัย

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกน้ำปลาเป็นอันดับ 1 ของโลก มีกำลังการผลิตเพื่อบริโภคภายในประเทศ 95% คิดเป็นมูลค่า 7,000-8,000 ล้านบาท/ปี และผลิตเพื่อการส่งออกอีก 5% คิดเป็นมูลค่ากว่า 1,000 ล้านบาทต่อปี (http://www.manager.co.th) ด้วยกระแสความนิยมบริโภคอาหารไทยในต่างประเทศ ปริมาณการส่งออกน้ำปลาจึงขยายตัวอย่างต่อเนื่องซึ่งในปี พ.ศ. 2551 มูลค่าการส่งออกน้ำปลา 1,019.99 ล้านบาท เพิ่มขึ้นจากปีที่ผ่านมา 18.31% ปัจจุบันน้ำปลาในตลาดโลกมีการแข่งขันมากขึ้นโดยคู่แข่งสำคัญ คือ เวียดนาม และฟิลิปปินส์ ซึ่งมีข้อได้เปรียบในด้านแรงงานและวัตถุดิบ (http://fic.nfi.or.th) การผลิตน้ำปลาในประเทศไทยยังคงอาศัยกระบวนการผลิตแบบดั้งเดิม โดยคลุกเคล้าปลากะตัก (*Stolephorus* spp.) ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักกับเกลือในอัตราส่วนโดยประมาณ 3 ต่อ 1 และหมักในบ่อซีเมนต์ที่ฝังอยู่ในพื้นดินใช้ระยะเวลาการหมัก 12-18 เดือน กระบวนการย่อยสลายโปรตีนปลาเกิดขึ้นโดยธรรมชาติ โดยเอนไซม์จากตัวปลา (Endogenous proteinases) และ/หรือโปรติเนสจากจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากแบคทีเรีย (Bacterial proteinases) ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในระหว่างกระบวนการหมัก จากลักษณะการผลิตที่พึ่งพาธรรมชาติ ทำให้เกิดปัญหาในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ ปัญหาในด้านต้นทุนการผลิตเนื่องจากต้องใช้พื้นที่จำนวนมากและใช้เวลานาน และปัญหาในการจัดการกระบวนการผลิตให้ถูกสุขลักษณะ ปัญหาเหล่านี้เป็นข้อจำกัดต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมน้ำปลา และยังเป็นอุปสรรคในการส่งออกน้ำปลาและเพื่อแข่งขันในตลาดโลก

การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำปลาให้ใช้เวลาในการหมักสั้นลง และสามารถควบคุมปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ได้นั้น เป็นยุทธศาสตร์สำคัญต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมน้ำปลาของประเทศ ได้มีการศึกษาการลดระยะเวลาการหมักน้ำปลาทั้งจากนักวิจัยไทยและต่างประเทศมากมาย ซึ่งสามารถสรุปวิธีการเร่งกระบวนการหมักได้ 3 แนวทางคือ (1) การใช้กรด (2) การใช้เอนไซม์โปรติเนสทางการค้าหรือการเร่งโปรติเนสในตัวปลา และ (3) การใช้จุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการนำแนวทางเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้กรดแต่เพียงอย่างเดียวทำให้คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ที่ได้เปลี่ยนไป Gildberg et al. (1984) พบว่าการใช้กรดอะซิติกและไฮโดรคลอริก ที่ pH 4 สามารถลดระยะเวลาในการผลิตน้ำปลาลงเหลือ 2 เดือน อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่มีกลิ่นรสของน้ำปลา แต่มีปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้ (Soluble nitrogen) สูง ในปัจจุบันมี

รายงานว่าการใช้กรดไฮโดรคลอริกเพื่อเร่งการย่อยสลายโปรตีนจากถั่วเหลืองภายใต้อุณหภูมิและความดันสูงในการผลิตซอสปรุงรส ส่งผลให้เกิดสาร 3-Monochloro propane-1,2-diol (3-MCPD) ซึ่งมีหลักฐานบ่งชี้ว่าเป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง ดังนั้นแนวทางในการใช้กรดในกระบวนการผลิตน้ำปลาจึงอาจไม่เหมาะสม ส่วนการเติมเอนไซม์เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเร่งกระบวนการผลิตน้ำปลา Beddows and Ardeshir (1979) พบว่าการใช้โบรมิเลนสามารถลดระยะเวลาในการผลิตน้ำปลาลงเหลือ 18-21 วัน อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์โปรติเนสทางการค้าแต่เพียงอย่างเดียว ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างไปจากน้ำปลาที่หมักแบบธรรมชาติและยังเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิต ส่วนการใช้จุลินทรีย์นั้นยังไม่มีการคัดเลือกสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งที่แน่นอนและยังไม่มีการวิจัยในลักษณะของกล้าเชื้อ (Starter culture) เพื่อให้สามารถนำไปใช้ได้จริงในระดับอุตสาหกรรม

เพื่อให้การย่อยสลายโปรตีนเกิดเร็วขึ้น จำเป็นต้องเพิ่มโปรติเนสในระหว่างกระบวนการหมัก โดยชนิดและปริมาณที่เพิ่มนั้นจะต้องเหมาะสม การเพิ่มกิจกรรมของโปรติเนสควรใช้แนวทางการผสมผสานระหว่างโปรติเนสจากตัวปลา และ/หรือโปรติเนสทางการค้า ร่วมกับโปรติเนสจากจุลินทรีย์ในลักษณะกล้าเชื้อ ซึ่งเอนไซม์จากปลากะตักมีบทบาทสำคัญต่อการย่อยโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา โดยพบว่าเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายทริปซิน (Trypsin-like proteinase) แสดงกิจกรรมสูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส และpH 8.5 (Siringan et al., 2006b) แสดงกิจกรรมตลอดระยะเวลาหมัก 12 เดือน แสดงว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีเสถียรภาพสูงแม้ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% นอกจากนี้เอนไซม์ในกลุ่มทริปซิน ยังเป็นเอนไซม์ที่อาจมีบทบาทต่อการย่อยสลายโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักอีกด้วย จะเห็นได้ว่าแนวทางหนึ่งในการเร่งกระบวนการหมักน้ำปลาคือการเร่งกิจกรรมของ Trypsin-like proteinase ให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนตลอดระยะเวลาการหมัก อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยใดที่ศึกษาบทบาทของโปรติเนสในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาอย่างเป็นระบบ ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นพื้นฐานสำคัญต่อการพัฒนากระบวนการผลิตน้ำปลาในอนาคต

แบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria) เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักน้ำปลา ซึ่งช่วยทำให้เกิดสี กลิ่นรส และรสชาติที่ดีในผลิตภัณฑ์น้ำปลา (Saisithi, 1994) อย่างไรก็ตามการศึกษากระบวนการเกิดกลิ่นรสและสารระเหยที่เกิดจากแบคทีเรียกรดแล็กติกในกระบวนการหมักน้ำปลายังไม่ทราบแน่ชัด มีรายงานว่า เอนไซม์ Aminopeptidases ในแบคทีเรียกรดแล็กติกมีผลเพิ่มกรดอะมิโนในผลิตภัณฑ์ (Christensen et al., 1999) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ทำให้เกิดกลิ่นรสในกระบวนการหมัก (Peralta et al., 1996; Smit et al., 2005) Intracellular aminopeptidases เป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่ทำให้เกิดกลิ่นรสจากกระบวนการหมักที่ใช้แบคทีเรียกรดแล็กติก เช่น *Lactobacillus sake*, *Lb. plantarum* และ *Lb. curvatus* ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นรสในกระบวนการหมักไส้กรอก และเนยแข็ง Leucyl aminopeptidase จาก

Lb. curvatus มีกิจกรรมสูงทำให้ได้กรดอะมิโนลูซีน (Leucine) (Magboul and McSweeney, 1999) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายของลูซีนคือ 2-Methylbutanal, 3-Methylbutanal และ 3-Methylbutanol ซึ่งเป็นสารระเหยที่ช่วยทำให้เกิดกลิ่นเนยแข็ง (Cheesy) และ กลิ่นเนื้อ (Meaty) (Masson et al., 1999) ดังนั้นแบคทีเรียกรดแล็กติกจึงมีบทบาทต่อการเกิดกลิ่นรสของน้ำปลา

ในการเร่งกระบวนการหมักอาจสามารถทำได้โดยการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ในตัวปลาร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ทำให้เกิดกลิ่นรส ปลากะตักเป็นปลาที่มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเนสอยู่สูงตามธรรมชาติ แต่กระบวนการหมักที่ความเข้มข้นของเกลือที่สูงมีผลจำกัดกิจกรรมของโปรติเนส ดังนั้นการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งกิจกรรมของเอนไซม์จากตัวปลาในระหว่างกระบวนการหมัก จะทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ได้สูงสุด ซึ่งอาจทำให้สามารถลดระยะเวลาการย่อยสลายโปรตีนได้ จากนั้นจึงเติมกล้าเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียกรดแล็กติกเพื่อเพิ่มกลิ่นรส นอกจากนี้การผสมผสานเทคโนโลยีทางด้านเอนไซม์และกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกใน กระบวนการผลิตน้ำปลา จะทำให้เกิดการปฏิวัติอุตสาหกรรมน้ำปลาดังเช่นในอุตสาหกรรมซีอิ๊วญี่ปุ่น ในระยะยาวต้นทุนการผลิตจะลดลงเนื่องจากสามารถใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบได้อย่างคุ้มค่า คือเกิดการย่อยสลายได้สูงสุดจากเอนไซม์และจากกล้าเชื้อ นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมและปรับปรุงกระบวนการผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายตัวเอง (Autolysis) ของปลากะตัก และกลุ่มของโปรติเนสที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายตัวเอง
2. คัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแล็กติกที่สร้างโปรติเนสได้สูง และสร้างสารระเหยที่ให้กลิ่นรสที่ดีในน้ำปลา
3. ศึกษาการใช้เอนไซม์ทางการค้า และแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกได้ในการผลิตน้ำปลาในระดับห้องปฏิบัติการ
4. ศึกษาการใช้กล้าเชื้อจากแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกได้จากน้ำปลาร่วมกับการใช้เอนไซม์จากปลากะตักในกระบวนการหมักน้ำปลาในระดับห้องปฏิบัติการ

ขอบเขตงานวิจัย

1. ตัวอย่างที่ศึกษาคือปลากะตัก (*Stolephorus* spp.) โดยศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 15 % และอุณหภูมิ 35, 50 และ 65 องศาเซลเซียส ต่อการย่อยสลายตัว

เองของปลากะตัก (Autolysis) สุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ที่ 0, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

2. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ สมบัติทางชีวเคมีและการสร้างแก๊สจากการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแล็กติก วิเคราะห์สารพันธุกรรมของแบคทีเรียในส่วนของ 16S rRNA gene พร้อมทั้งวิเคราะห์องค์ประกอบของสารระเหยด้วยวิธี Purge and trap ควบคู่กับการแยกสารและระบุชนิดของสารด้วยเทคนิค Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS)
3. ศึกษาการใช้ประโยชน์จากกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกคือ *T. halophilus* MCD 10-5-10 และ *T. halophilus* MS33 ร่วมกับการใช้เอนไซม์ทางการค้า คือ อัลคาเลส (Alcalase 2.4L) และเฟโวไซม์ (Flavouzyme 500L) โดยศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์และเคมีของการหมักน้ำปลาเป็นระยะเวลา 6 เดือน
4. ศึกษาการใช้ประโยชน์จากกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกในการหมักน้ำปลาคือ *T. halophilus* MCD 10-5-10 และ *T. halophilus* MS33 วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมักคือ ปลากะตักสดและปลากะตักที่ผ่านการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์และเคมีของการหมักน้ำปลาเป็นระยะเวลา 7 เดือน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ทราบปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายตัวเอง (Autolysis) ของปลากะตัก และกลุ่มของโปรตีเนสที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายตัวเอง ได้สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแล็กติกที่สร้างโปรตีเนสได้สูง และสร้างสารระเหยที่ให้กลิ่นรสที่ดีในน้ำปลา พร้อมทั้งได้ทราบกระบวนการเร่งการผลิตน้ำปลาที่สามารถประหยัดต้นทุน พลังงาน และเวลา ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ คือ ผู้ประกอบการน้ำปลา กรมประมง สถาบันวิจัย และสถานศึกษาที่ค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับน้ำปลา