บทที่ 2
การทบทวนเอกสาร

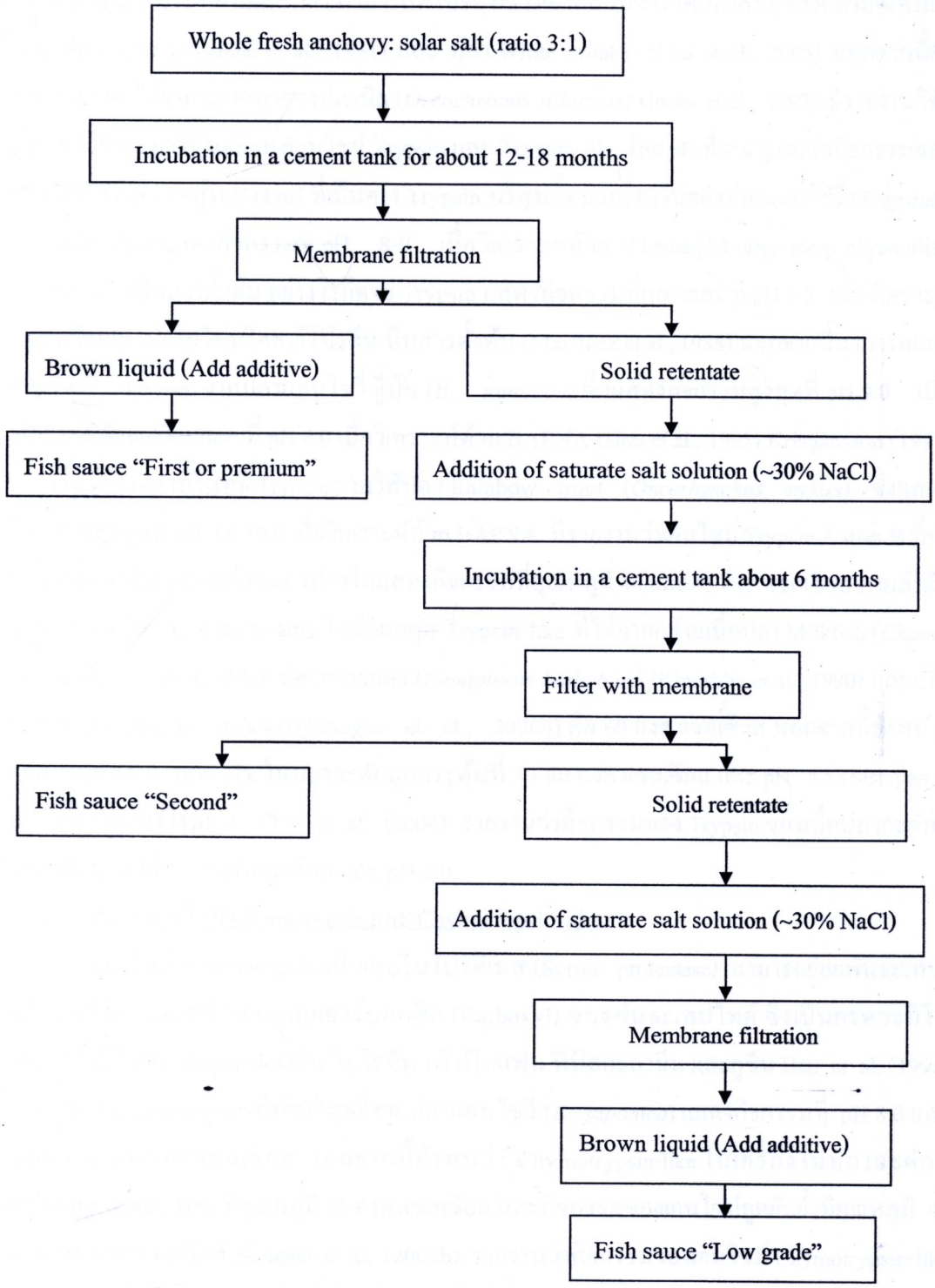
2.1 น้ำปลา

น้ำปลาเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมัก ซึ่งใช้เป็นเครื่องปรุงที่รู้จักกันมานานผลิตในแถบทวีปเอเชีย โดยมีชื่อที่แตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ เช่น ประเทศไทยและลาว เรียกว่า น้ำปลา ประเทศมาเลเซีย เรียกว่า บูดู (Budu) ประเทศอินโดนีเซีย เรียกว่า เคทจับอิคาน (Ketjab-ikan) ประเทศเวียดนาม เรียกว่า นอคนัม (Nouc-mam) ประเทศกัมพูชา เรียกว่า ตึกตรัย (Teuk trei) ประเทศญี่ปุ่น เรียกว่า อิชิรุ (Ishiru) ประเทศพม่า เรียกว่า งามยายี (Ngam-ya-ye) ประเทศฟิลิปปินส์ เรียกว่า พาทิส (Patis) เป็นต้น (Lopetcharat et al., 2001) น้ำปลาเป็นของเหลวใส สีน้ำตาล มีรสชาติเค็ม ปลาที่นิยมใช้ในการผลิต ได้แก่ ปลาไส้ตัน หรือ ปลากะตัก (*Stolephorus* spp.) โดยนำปลาผสมกับเกลือในอัตราส่วน 3:1 นำไปบรรจุในถังหมักและใช้เวลาหมักเป็นเวลา 12-18 เดือน ในสภาวะที่มีอากาศแบบจำกัด จากนั้นกรองเพื่อแยกส่วนตะกอนออกแล้วนำส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งไว้ให้ตกตะกอนเป็นระยะเวลา 2-12 สัปดาห์ ได้น้ำปลาเกรดเอ หรือเกรดที่ 1 ขั้นตอนการผลิตน้ำปลาแสดงในรูปที่ 2.1 ส่วนกากปลาที่เหลือจากการผลิตน้ำปลาเกรดที่ 1 จะนำมาใช้ผลิตน้ำปลาเกรดรองลงมาโดยการเติมน้ำเกลือ (Lopetcharat et al., 2001) น้ำปลามีลักษณะพิเศษเฉพาะตัว เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ทางเคมี และจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก เช่น กลิ่นของน้ำปลาเกิดจากการย่อยโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติเอสจากตัวปลา และจากแบคทีเรียทำให้ได้เพปไทด์ และอาจถูกย่อยต่อไปได้อีกเป็นเอมีน คีโต-เอซิด แอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนไขมันจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ทำให้เกิดกรดไขมันทั้งที่ระเหยได้และระเหยไม่ได้ รวมทั้งสารประกอบคีโตน และอัลดีไฮด์ (Raksakulthai and Haard, 1992; Beddows et al., 1979)

2.2 เอนไซม์จากตัวปลา

เอนไซม์จากปลา (Endogenous proteinases) พบทั้งในเครื่องใน (Viscera) และในกล้ามเนื้อปลาชนิดต่างๆ (ตารางที่ 2.1) ซึ่งเครื่องในปลาเป็นแหล่งสำคัญของเอนไซม์ Endopeptidase และ Exopeptidase เช่น Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin, Aminopeptidases และ Carboxypeptidases (Haard, 1994) นอกจากนี้ยังพบโปรติเนสในส่วนของโปรตีนซาร์โคพลาสมิค (Sarcoplasmic protein) และมัยโอไฟบริลลาร์ (Myofibrillar protein) Shahidi and Kamil (2001) รายงานว่าเอนไซม์ในกล้ามเนื้อปลาที่พบได้แก่ Trypsin-like, Chymotrypsin-like, Cathepsin B และ L, Calpain, Alkaline proteinase, Aminopeptidase, Carboxypeptidase-like และ Myofibril-bound serine proteinase

(MBSP) อื่นๆ Ohkubo et al. (2004b) พบเอนไซม์ Serine proteinase ในกล้ามเนื้อปลาปากคม (Lizardfish, *Saurida micropectoralis*)



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการผลิตน้ำปลา

ที่มา : Lopetcharat et al. (2001)

2.2.1 เอนไซม์ Trypsin และ Trypsin-like

เอนไซม์ Trypsin เป็นเซอรีนโปรติเนส (Serine proteinase) ที่พบในระบบการย่อย ส่วน Trypsin-like พบในกล้ามเนื้อปลา สามารถทำบริสุทธิ์ได้จากส่วนซาร์โคพลาสมิคของกล้ามเนื้อปลา เช่น ปลา Hake (Martone et al., 1991) และ ปลา White croaker (Cao et al., 2005) นอกจากนี้ยังสามารถแยกได้จากพลาสมาของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (Inaba et al., 1997) มีรายงานวิจัยถึงคุณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์ Trypsin และ Trypsin-like โดย pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin อยู่ในช่วง pH ที่เป็นด่าง Trypsin บริสุทธิ์จากเครื่องในของปลาแอนโชวี่ (*Engraulis encrasicholus*) แสดงกิจกรรมที่ pH 8-9 เมื่อวิเคราะห์ด้วย N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) เป็นสารตั้งต้น อย่างไรก็ตาม Trypsin แสดงกิจกรรมที่เหมาะสมที่ pH 9.5 เมื่อวิเคราะห์โดยเคซีนและมัยโอไฟบริลลาร์โปรตีนเป็นสารตั้งต้น (Martinez et al., 1988) นอกจากนี้สามารถแยกเอนไซม์ Trypsin จากปลาแอนโชวี่ญี่ปุ่น (*E. japonica*) ซึ่งแสดงกิจกรรมสูงสุดที่ pH 9.0 เมื่อวิเคราะห์ด้วยเคซีน และ ที่ pH 8.0 เมื่อวิเคราะห์ด้วย BAPNA (Heu et al., 1995) Kristjansson (1991) รายงานว่าการทำบริสุทธิ์ Trypsin จากไส้ปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ซึ่งแสดงกิจกรรมสูงสุดที่ pH 9.0-10.0 เมื่อวิเคราะห์ด้วย BAPNA มีรายงานว่าเอนไซม์ Trypsin A และ B ที่ทำบริสุทธิ์จากตับและตับอ่อนของปลาไนแสดงกิจกรรมที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ในกลุ่ม Trypsin-like ที่ได้จากกล้ามเนื้อปลา Milkfish (*Chanos chanos*) (Jiang et al., 1990) ปลาทรายแดง (*Nemipterus bathybius*) (Kinoshita et al., 1990) และปลากะตัก (*Stolephorus indicus*) (Siringan et al., 2006b) คือ 60 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่ากิจกรรมของ Trypsin-like ในปลากะตักถูกกระตุ้นที่ 50-60 องศาเซลเซียส และ pH 8.5 (Siringan et al., 2007) อย่างไรก็ตาม Choi et al. (2004) รายงานว่ากิจกรรมของ Trypsin ของเนื้อปลากะตักมีกิจกรรมสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส และ pH 8.0

2.2.2 เอนไซม์ Chymotrypsin และ Chymotrypsin-like

เอนไซม์ Chymotrypsin เป็นเซอรีนโปรติเนส (Serine proteinase) สามารถย่อยพันธะเพปไทด์โดยที่กรดอะมิโนด้านกลุ่มคาร์บอกซิล (Carboxyl) ของพันธะเพปไทด์ ซึ่งเป็นกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) เช่น ไทโรซีน ทริฟโตแฟน ฟีนิลอะลานีน และลูซีน Heu et al. (1995) รายงานว่า Chymotrypsin ที่ทำบริสุทธิ์จากปลาแอนโชวี่ (*E. japonica*) แสดงกิจกรรมที่ pH 8.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่า Chymotrypsin-like ในเครื่องในปลากะตักมีเสถียรภาพลดลง 80% ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และกิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งที่อุณหภูมิ 45 และ 60 องศาเซลเซียส Siringan et al. (2006b) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Chymotrypsin-like ของปลากะตักมีความคงทนที่เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นสูงที่ 25-30%

ตารางที่ 2.1 เอนไซม์โปรติเนสในกล้ามเนื้อปลาชนิดต่างๆ

Type group	Proteinase	Fish	Source	Reference
Cysteine proteinase	**Cathepsin L**	Red bulleye	**Muscle**	Hu et al. (2007)
		Walleye pollock	**Muscle**	Hu et al. (2008)
		Sea bass	**Muscle**	Che'ret et al. (2007)
		Anchovy	**Muscle**	Choi et al. (2004)
		Anchovy	**Whole fish**	Siringan et al. (2006b)
		Carp	**Hepatopancrease**	Aranishi et al. (1997)
		Arrowtooth	**Muscle**	Visessanguan et al. (2003)
	Cathepsin B	Silver carp	**Muscle**	Liu et al. (2008)
		Sea bass	**Muscle**	Che'ret et al. (2007)
Serine proteinase	**Trypsin and trypsin-like**	Monterey sardine	**Pyloric ceca**	Castillo-Yanez et al. (2005)
		Japanese sandfish	**Whole fish**	Klomklao et al. (2009)
		Anchovy	**Whole fish**	Siringan et al. (2006b)
		Anchovy	**Muscle**	Choi et al. (2004)
		Skipjack tuna	**Spleen**	Klomklao et al. (2006)
		True sardine	**Viscera**	Kishimura et al. (2006b)
	Alkaline proteinase	Nile tilapia	**Intestine**	Bezerra et al. (2005)
		Bigeye snapper	**Muscle**	Benjakul et al. (2003)
		Striped Seabream	**Viscera**	Ali et al. (2011)
		Sailfin catfish	**Viscera**	Villalba-Villalba et al. (2011)
	Chymotrypsin and	Anchovy	**Whole fish**	Siringan et al. (2006b)
	chymotrypsin - like	Sardine	**Muscle**	Lugo-Sanchez et al. (1997)
		Anchovy	**Muscle**	Choi et al. (2004)
	MBSP*	Carp	**Muscle**	Osatomi et al. (1997); Cao et al. (1999a, 1999b); Cao et al. (2006)
		Lizardfish	**Muscle**	Cao et al. (2000); Ohkubo et al. (2004a)
Aspartic proteinase	**Cathepsin D**	Alaska pollack	**Muscle**	Weng et al. (2007)
		Sea bass	**Muscle**	Che'ret et al. (2007)
		Herring	**Muscle**	Neilsen and Neilsen (2001)
	Pepsin	Sardine	**Viscera**	Castillo-Yanez et al. (2004)
Metallo proteinase	**Calpain**	Salmon	**Muscle**	Geesink et al. (2000)
		Sea bass	**Muscle**	Che'ret et al. (2007)
	Carboxypeptidase A, B	Sardine	**Muscle**	Lugo-Sanchez et al. (1997)
		Starfish	**Pyloric ceca**	Kishimura and Hayashi (2002)
	Cathepsin A	Milkfish	**Muscle**	Jiang et al. (1990)
	Leu-aminopeptidase	Anchovy	**Whole fish**	Siringan et al. (2006b)

* MBSP = Myofibril-bound serine proteinase

2.2.3 เอนไซม์ Cathepsin L และ B

เอนไซม์ Cathepsin L และ B เป็นซีสเตอีนโปรติเนส (Cysteine proteinases) พบในไลโซโซม (Lysosome) เอนไซม์นี้เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายกล้ามเนื้อของปลาชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เด่นในกล้ามเนื้อปลา Pacific whiting และเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายมัยโอซิน (Myosin) ในระหว่างกระบวนการให้ความร้อนของเนื้อปลาและซูริมิ (An et al.,1994) Aoki and Ueno (1997) รายงานว่า Cathepsin L ในปลา Mackerel สามารถย่อยมัยโอซิน โทรโปรนินที (Troponin T) โทรโปรนินไอ (Troponin I) และโทรโปมัยโอซิน (Tropomyosin) ส่วน Cathepsin B ไม่สามารถย่อย มัยโอไฟบริล-ลาร์โปรตีนของปลา Mackerel ได้

Cathepsin L จากกล้ามเนื้อปลา Pacific whiting มี 2 ไอโซฟอร์ม ซึ่งแสดงกิจกรรมที่ pH 5.5-6.0 และที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส (Seymour et al., 1994) Visessanguan et al. (2003) รายงานว่า Cathepsin L ที่ทำบริสุทธิ์จากกล้ามเนื้อปลา Arrowtooth flouder แสดงกิจกรรมได้สูงสุดที่ pH 5.5 และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นอกจากนี้มีรายงานว่า Cathepsin L ที่ทำบริสุทธิ์จากตับและตับอ่อนของปลาไนแสดงกิจกรรมสูงสุดที่ pH 5.5-6.0 และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส(Aranishi et al., 1997) Choi et al. (2004) พบว่ากิจกรรมของ Cathepsin L-like ของเครื่องในและเนื้อปลากะตักสูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส และ pH 6.0 เช่นเดียวกันกับ Heu et al. (1997) ที่รายงานว่า Cathepsin L-like บริสุทธิ์จากเนื้อปลาแอนโชวี่ (*E. japonica*) แสดงกิจกรรมที่ 50 องศาเซลเซียส

Cathepsin B ที่ทำบริสุทธิ์จากกล้ามเนื้อปลา Chum salmon และ กล้ามเนื้อขาวของปลา Mackerel (Yamashita and Konagaya 1990; Jiang et al., 1994) แสดงกิจกรรมที่ pH 6.5 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นอกจากนี้มีรายงานว่า Cathepsin B ที่ทำบริสุทธิ์จาก Pacific whiting แสดงกิจกรรมสูงสุดในช่วงอุณหภูมิ 20-37 องศาเซลเซียส (An et al., 1994)

2.2.4 โปรติเนสที่แสดงกิจกรรมในสภาวะกรด (Acid proteinases)

Pepsin เป็นแอสปาร์ติกโปรติเนส (Aspartic proteinase) ที่พบในกระเพาะอาหารของปลา เอนไซม์แสดงกิจกรรมที่ pH 2.0-4.0 สารยับยั้งเอนไซม์คือ Pepstatin, Diazoketones และ Phenylacryl bromides (Beynon and Bond, 2001) เอนไซม์ Pepsin ที่ทำบริสุทธิ์จากปลา Monterey sardine แสดงกิจกรรมที่ pH 2.5 และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Castillo-Yanez et al., 2004) Pepsin ที่ทำบริสุทธิ์จากเครื่องในปลานิล (*Tilapia nilotica*) มีเสถียรภาพ (Stability) ที่ pH 3-6 และไม่แสดงกิจกรรมที่ pH เป็นกลางและด่าง (El-Beltagy et al., 2004)

Cathepsin D เป็นไลโซโซมอลโปรติเนส (Lysosomal proteinase) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มโปรติเนสที่แสดงกิจกรรมในสภาวะกรด (Aspartic proteinase) พบในกล้ามเนื้อปลา โดยทำบริสุทธิ์จากกล้ามเนื้อปลา Herring และปลาไนมีมวลโมเลกุลประมาณ 36-39 กิโลดาลตัน (Nielsen and Nielsen, 2001; Goldman-Levkontz et al., 1995) อย่างไรก็ตาม Cathepsin D ทำบริสุทธิ์จากกล้ามเนื้อปลานิลมี

มวลโมเลกุลประมาณ 55 กิโลดาลตัน (Jiang et al., 1991) ซึ่งแสดงกิจกรรมที่ pH 2.5-3.7 และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Nielsen and Neilsen, 2001; Goldman-Levkontz et al., 1995; Jiang et al., 1991)

2.2.5 โปรติเนสที่จับยึดกับมัยโอไฟบริล (Myofibril-bound proteinase, MBSP)

MBSP จัดเป็นเซอรีนโปรติเนส (Serine proteinase) ที่จับยึดกับส่วนของโปรตีนมัยโอไฟบริลลาร์ โปรติเนสนี้สามารถแยกจากมัยโอไฟบริลลาร์ด้วยสารละลายกรดและเกลือ เอนไซม์ MBSP ทำบริสุทธิ์จากกล้ามเนื้อปลาไนโดยใช้สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) เข้มข้น 0.6 โมลาร์ pH 4.0 (Osatomi et al., 1997) นอกจากนี้ Osatomi et al. (1997) รายงานว่าเอนไซม์ MBSP ทำบริสุทธิ์จากกล้ามเนื้อปลาปากคม (Lizardfish) แสดงกิจกรรมสูงสุดที่ pH 8.0 และอุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส

2.2.6 โปรติเนสที่แสดงกิจกรรมในสภาวะด่าง (Alkaline proteinases)

Alkaline proteinases มีความสำคัญในการย่อยสลายกล้ามเนื้อของปลา Atlantic menhaden และ ปลา Atlantic salmon (Boye and Lanier, 1988; Choi et al., 1999) ซึ่งพบในซาร์โคพลาสมิค (Sarcoplasmic) ไมโครโซมอล (Microsomal) และส่วนที่ยึดติดอยู่กับมัยโอไฟบริล (Shahidi and Kamil, 2001) มวลโมเลกุลของ Alkaline proteinases ที่ทำบริสุทธิ์จากกล้ามเนื้อปลา Atlantic menhaden มีค่าประมาณ 707 และ 450 กิโลดาลตัน (Choi et al., 1999) เอนไซม์นี้แสดงกิจกรรมที่ pH 7.5-8.0 และที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส (Boye and Lanier, 1988; Choi et al., 1999)

2.2.7 โปรติเนสอื่นๆ

Aminopeptidase และ Carboxypeptidase เป็นเมทาโลเอกโซโปรติเนส (Metallo exoproteinases) เอนไซม์กลุ่มนี้จำเป็นต้องมีอิออนโลหะที่ตำแหน่งกระตุ้น (Active sites) Carboxypeptidase A และ B ในซาร์โคพลาสมิคของปลา Monterey sardine จะถูกกระตุ้นด้วย Cu^{2+} และถูกยับยั้งด้วย Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (Lugo-Sanchez et al., 1997) นอกจากนี้มีรายงานว่า Carboxypeptidase B ที่ทำบริสุทธิ์จากปลาดาว (Starfish) แสดงกิจกรรมที่ pH 7.5 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (Kishimura et al., 2006a) Leucine-aminopeptidase (LAP) ที่พบในปลา Monterey sardine และปลาแอนโชวี่ไม่ถูกยับยั้งด้วย EDTA (Martinez and Serra, 1989) Liu et al. (2008) รายงานว่า Leucine aminopeptidase จากเนื้อปลาไน (*Cyprinus carpio*) แสดงกิจกรรมสูงสุดที่ 35 องศาเซลเซียส และ pH 7.0 Siringan et al. (2006b) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Leucine-aminopeptidase ลดลงที่เกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูง 25-30% Cathepsin A-like (หรือ Carboxypeptidase A) ทำบริสุทธิ์จากกล้ามเนื้อปลา Milkfish สามารถย่อยสารตั้งต้น Z-Gly-Phe สูงสุดที่ pH 7.0 และที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส และไม่แสดงกิจกรรมที่อุณหภูมิสูงและถูกยับยั้งด้วย Pepstatin A และ Hg^{2+} (Jiang et al., 1990)

Calpains หรือโปรติเนสที่ถูกกระตุ้นด้วยอิออน Ca^{2+} (Ca^{2+}-activated proteinases) จัดเป็นโปรติเนสที่แสดงกิจกรรมที่ pH เป็นกลาง (Neutral proteinases) พบในกล้ามเนื้อปลา Calpain ที่พบในส่วนของซาร์โคพลาสมิคจะถูกปล่อยออกจากเส้นใยกล้ามเนื้อ (Myofilament) โดยการย่อยส่วน Z-disk Ladrat et al. (2000) รายงานว่า Calpain เร่งการย่อยโปรตีนกล้ามเนื้อหลังภาวะการตาย นอกจากนี้มีรายงานว่าการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ 2 ชนิด จากกล้ามเนื้อปลาแอนโชวี่ (*E.japonica*) ดองเกลือซึ่งมีบทบาทในการย่อยกล้ามเนื้อระหว่างการบ่ม โดยเอนไซม์ชนิดแรกมีมวลโมเลกุล 25 กิโลดาลตัน และแสดงกิจกรรมสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส และ pH 6.8 ในขณะที่เอนไซม์อีกชนิดหนึ่งมีมวลโมเลกุล 37 กิโลดาลตัน และแสดงกิจกรรมสูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส และ pH 7.0-7.5 (Ishida et al., 1994; Ishida et al., 1995)

2.3 จุลินทรีย์ในกระบวนการหมักน้ำปลา

Thongthai and Suntinanalert (1991) ได้แยกจุลินทรีย์ *Halobacterium* จากน้ำปลา และพบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถสร้างโปรติเนสได้สูง นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *Bacillus* และ *Coryneform* ในน้ำปลาซึ่งสามารถสร้างโปรติเนสได้สูงเช่นกัน ต่อมา Thongthai et al. (1992) ได้รายงานการแยก *Halobacterium salinarium* จากน้ำปลา ซึ่งเชื้อดังกล่าวสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเนสที่ยังคงแสดงกิจกรรม (Activity) ที่ความเข้มข้นของเกลือ 4 โมลาร์ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานว่าโปรติเนสดังกล่าวเป็นประเภทใดและเชื้อดังกล่าวเกิดขึ้นช่วงใดของการหมักน้ำปลา Chaiyanan et al. (1999) แยกแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ *Halobacillus thailandensis* sp. nov. จากน้ำปลา เชื้อดังกล่าวสามารถสร้างโปรติเนสกลุ่ม Serine proteinase และ Metalloproteinase ซึ่งคาดว่าเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายโปรตีนในน้ำปลา Porntaveewat et al. (2002) ได้ศึกษาโปรติเนสจาก *Halobacterium* ที่แยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา และพบว่าเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Serine proteinase โดยเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์สามารถแสดงกิจกรรมได้สูงสุดที่ pH 6.0, 55 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของเกลือ 25% วิไลลักษณ์ (2538) พบว่าการใช้เชื้อ *H. salinarium* ร่วมกับ *S. saprophyticus* และ *B. pantothenticus* ในการหมักน้ำปลา ทำให้ได้ค่าการละลายของโปรตีนสูง จากงานวิจัยดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่สร้างโปรติเนสนั้นมีหลากหลายสายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม ไม่มีข้อมูลที่ระบุชัดเจนว่าจุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์เหล่านั้นเจริญในช่วงระยะเวลาใดบ้างของการหมัก ซึ่งกระบวนการหมักน้ำปลาที่อาศัยจุลินทรีย์จากธรรมชาติเกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์หลายชนิดที่อาจเจริญร่วมกันหรือต่อเนื่องกัน

Sinsuwan et al. (2010) ได้ศึกษาโปรติเนสจาก *Virgibacillus* sp. SK33 ที่แยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลาในเดือนที่ 2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Serine proteinase โดยเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์สามารถแสดงกิจกรรมได้สูงสุดที่ pH 7.5 และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส Phrommao et al.

(2011) พบกิจกรรมของเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 ที่แยกได้จากน้ำปลา ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Subtilisin-like proteinases แสดงกิจกรรมสูงสุดที่ pH 8.0 อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25-30% และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 70-100 มิลลิโมล/ลิตร เอนไซม์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ต่างๆข้างต้น เป็น Endoproteinase แต่เอนไซม์ในกลุ่ม Exoproteinase มีความสำคัญต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสของน้ำปลาเช่นกัน เนื่องจากเอนไซม์ในกลุ่มนี้ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนอิสระซึ่งมีผลโดยตรงต่อรสชาติ Vo-Van et al. (1984) พบกิจกรรมของ Aminopeptidase ที่ค่อนข้างสูงในระยะ 2 เดือนแรกของการหมักน้ำปลาจากปลาซาร์ดีน (Sardine) เอนไซม์ดังกล่าวมีมวลโมเลกุล 370 กิโลดาลตัน เมื่อวิเคราะห์โดย Gel filtration และมีค่า pI เท่ากับ 4.1 เอนไซม์ยังคงกิจกรรมได้สูงที่ความเข้มข้นเกลือ 15% ซึ่งแตกต่างจาก Aminopeptidase จากลำไส้ปลาซาร์ดีนซึ่งสูญเสียกิจกรรมอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้นของการหมัก แต่คณะผู้วิจัยไม่ได้ระบุแน่ชัดว่า Aminopetidase ในน้ำปลานั้นมาจากจุลินทรีย์หรือไม่

นอกจาก *Halobacterium* แล้ว Tanasupawat and Komagata (1995) ได้พบ *Tetragenococcus halophilus* ในน้ำปลา ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Saisithi (1994) ซึ่งสรุปว่าพบ *T. halophilius* มีจำนวนมากในวันที่ 13 ของการหมักจนกระทั่งเดือนที่ 3 Satomi et al. (1997) พบ *T. muriaticus* sp. nov. จากเครื่องในปลาหมึกหมักซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูง ต่อมา Kimura et al. (2001) ได้รายงานว่า แบคทีเรียดังกล่าวสามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงถึง 1,153.4 ppm ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด นอกจากนี้ Thongsanit (1999) พบ *T. halophilius* และ *T. muriaticus* ในน้ำปลาไทย ซึ่งบางสายพันธุ์สามารถสร้างฮีสตามีนในช่วง 0.36-522.9 ppm อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานว่าเชื้อดังกล่าวสร้างไบโอจีนิกเอมีนหรือไม่ และเชื้อดังกล่าวมีบทบาทสำคัญต่อคุณลักษณะของน้ำปลาหรือไม่อย่างไร นอกจากปัจจัยในการสร้างโปรตีเนสแล้ว จุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการพัฒนาเป็นกล้าเชื้อจะต้องไม่ผลิตฮีสตามีนและไบโอจีนิกเอมีนอื่นๆ หรือผลิตในปริมาณที่น้อยมากอย่างไม่มีนัยสำคัญ

2.4 แบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียกรดแล็กติกมีความสามารถทนกรดที่ผลิตขึ้นมาเอง ปกติแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิค่อนข้างกว้างคือตั้งแต่ 5-45 องศาเซลเซียส แบคทีเรียกรดแล็กติกอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก มีทั้งที่เซลล์มีรูปร่างกลมและเป็นท่อน บางชนิดที่มีเซลล์มีรูปร่างกลมมีการเรียงตัวกันสี่เซลล์ ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส (Catalase) ต้องการอากาศน้อย (Microaerophile) หรือ Facultative anaerobe ต้องการอาหารในการเจริญอย่างซับซ้อน ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน มีความสามารถในการทนกรด อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส pH 5.5-6.2 นิยมใช้ในกระบวนการผลิตอาหารและผลิตกรดแล็กติก

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในกระบวนการหมัก (du Toit et al., 1998) เป็นแบคทีเรียชนิดแรกที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตภัณฑ์นมหมัก ผักดอง และเนื้อหมัก (Konings, 2002)

แบคทีเรียกรดแล็กติกประกอบด้วยแบคทีเรียสกุลต่างๆ คือ *Lactobacillus, Lactococcus, Enterococcus, Camobacterium, Leuconostic, Oenococcus, Pediococcus, Tetragenococus, Vagococcus* และ *Weissela* โดยสามารถแบ่งตามการใช้น้ำตาลได้ 2 กลุ่ม ดังนี้ (Axelsson, 1993; Kandler and Weiss, 1989)

(1) โฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (Homofermentative) เป็นแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลกลูโคสผ่าน Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMP) ได้กรดแล็กติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก 85% หรือมากกว่าจากการหมักคาร์โบไฮเดรต เจริญที่อุณหภูมิ 15-45 องศาเซลเซียส ได้แก่ *L. sake, L. acidilactici, L. casei* เป็นต้น

(2) เฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ (Heterofementative) เป็นแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านวิถี Phosphogluconate pathway หรือ Phosphoketolase pathway ได้ผลิตภัณฑ์กรดแล็กติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก เอทธานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ จากการหมักคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ *L. plantarum, L. fermentum, L. brevis* เป็นต้น

Tetragenococcus เป็นแบคทีเรียที่ต้องการเกลือโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญ มีความสามารถทนเกลือในระดับสูง (>18%) (Collins et al., 1990; Holt et al., 1994; Hozapfel et al., 2006) ความแตกต่างระหว่าง Pediococci และ Tetragenococci แสดงดังตารางที่ 2.2 *Tetragenococcus* มีรูปร่างเซลล์กลม (0.5-1.0 ไมครอน) ติดสีแกรมบวก มีการจัดเรียงเซลล์ทั้งเป็นคู่ (Pairs) และแบบสี่เซลล์ (Tetrads) โคโลนีเป็นทรงกลม ขาว ความนูนต่ำ เรียบ และไม่มีเม็ดสี ผลการทดสอบเอนไซม์คะตาเลส (Catalase) เป็นลบ โดยทั่วไป *Tetragenococcus* พบในผลิตภัณฑ์อาหารหมักหลากหลายชนิด เช่น น้ำปลา (Thongsanit et al., 2002) ถั่วเหลืองหมักของอินโดนีเซีย (Roling and Verseveld, 1996) ซอสถั่วเหลืองของญี่ปุ่น (Nakagawa and Kitahara, 1959) ปลากะตักดองเกลือ (Villar et al., 1985) กะปิ (Terasi) ของอินโดนีเซีย (Kobayashi et al., 2003) กิมจิและแฮม (Lee et al., 2005)

แบคทีเรีย *Tetragenococcus* ที่สำคัญได้แก่

(1) *Tetragenococcus halophilus* ซึ่งพบในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เช่น น้ำปลาและซอสถั่วเหลือง มีรูปร่างทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมครอน เซลล์ไม่มีการเคลื่อนที่ โคโลนีเจริญบนอาหาร MRS agar มีลักษณะเป็นทรงกลม ความนูนต่ำ และไม่มีเม็ดสี (Thongsanit et al., 2002) เป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกประเภทโฮโมเฟอรเมนเททีฟ (Homofermentative) ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเพื่อการเจริญเติบโต (Microaerophile) *T. halophilus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการเจริญคือ 5-10% และ pH 5.0-9.0 *T. halophilus* ไม่สามารถเปลี่ยนรูปของไนเตรทได้ บางชนิดสามารถย่อยอาร์จินีนได้ (Lee

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 31 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 250333

et al, 2005; Thongsanit et al., 2002) โดยส่วนใหญ่สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 2.3 Kobayashi et al. (2000) คัดแยก *T. halophilus* จากกะปี (Terasi) ของอินโดนีเซีย ซึ่งสามารถใช้ L-Arabinose, D-Mannitol, Maltose, D-Melizitose, Maltotriose, Glycerol และ Sucrose เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดได้ *T. halophilus* มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์ที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ โดยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการเจริญคือ 3-7%, pH 7.5 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นอกจากผลิตภัณฑ์กะปีของอินโดนีเซียแล้ว *T. halophilus* ยังคัดแยกได้จากกระบวนการหมักซอสถั่วเหลือง (Soy mash) (Roling and Verseveld, 1996)

ตารางที่ 2.2 ความแตกต่างทางสรีรวิทยาระหว่างสกุล *Tetragenococcus* และ *Pediococcus*

Characteristics	*Pediococcus*	*Tetragenococcus*
Growth tolerance to 18% NaCl	-	+
Growth at pH 5.0	+	-
pH 9.0	-	+
Facultative anaerobes	+	+
Gas from glucose fermentation	-	-
Configulation of lactic acid from glucose	DL/L(+)	L(+)
Starch fermentation	-	-
Peptidoglycan type	Lys-D-Asp	Lys-D-Asp

Source: Holzapel et al. (2006)

(2) *Tetragenococcus muriaticus* เป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกที่แยกจากน้ำปลาที่หมักจากเครื่องในปลาหมึก (Satomi et al., 1997) เซลล์มีรูปร่างกลม (0.5-0.8 ไมครอน) และไม่เคลื่อนที่ โคโลนีเป็นสีขาว มีความนูน เรียบ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 1.5 มิลลิเมตร สามารถเจริญได้ที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1-25% โดยค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 7-10% ไม่พบการเจริญในสภาวะที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25-30 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 15-40 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมคือ 7.5-8.0 และสามารถเจริญได้ที่ pH ในช่วง 5.0-9.6 *T. muriaticus* สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (Facultatively anaerobic) และไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ แต่ผลิตฮีสตามีนได้ 44 มิลลิกรัม/100 กรัม (Thongsanit et al., 2002) ซึ่งแบคทีเรียกรดแล็กติกชนิดนี้สามารถใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 2.3 ผนังเซลล์ของเพปไทด์ประกอบด้วย Lys-D-Asp ส่วน DNA มีปริมาณ G+C เท่ากับ 36.5 mol%

(Satomi et al., 1997) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้แยกความแตกต่างระหว่าง *T. muriaticus* และ *T. halophilus* คือการเจริญที่อุณหภูมิที่ต่างกัน โดย *T. muriaticus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่ *T. halophilus* ไม่เจริญ นอกจากนี้ยังพบว่า *T. halophilus* เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ แต่ *T. muriaticus* ต้องมีเกลืออย่างน้อย 1% จึงสามารถเจริญได้ (ตารางที่ 2.3) ในกระบวนการหมัก *T. muriaticus* ย่อย L-Arabinose, Sucrose และ Lactose ได้น้อยกว่า *T. halophilus* และสามารถผลิตฮีสตามีนได้ (Satomi et al., 1997) อย่างไรก็ตาม ความต่างของลักษณะทางสัณฐานและการใช้น้ำตาลระหว่างเชื้อทั้งสองชนิดไม่สามารถใช้ในการจำแนกเชื้อทั้งสองได้ (Abe and Uchida, 1989; Roling and Verseveld, 1996) วิธีที่มีความน่าเชื่อถือในการจำแนกสายพันธุ์คือการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของ 16S rRNA gene (Satomi et al., 1997)

(3) *Tetragenococcus koreensis* เป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกอีกหนึ่งชนิดที่แยกได้จากกิมจิ (Lee et al., 2005) มีความคล้ายคลึงของ 16S rRNA gene เมื่อเทียบกับ *T. muriaticus* และ *T. halophilus* เท่ากับ 97.8% และ 95.9% ตามลำดับ แต่ DNA-DNA hybridization ของ *T. koreensis* มีความคล้ายคลึงเพียง 9.7% เมื่อเทียบกับ *T. halophilus* และ 39.0% เมื่อเทียบกับ *T. muriaticus* โดย *T. koreensis* สามารถผลิตกรดได้ดังตารางที่ 2.3 *T. koreensis* มีรูปร่างเซลล์กลม (1 ไมครอน) ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีสปอร์ ผลทดสอบเอนไซม์คะตาเลส และออกซิเดสเป็นลบ *T. koreensis* เจริญได้ที่อุณหภูมิ 15-30 องศาเซลเซียส ไม่เจริญที่ 4 องศาเซลเซียส หรือมากกว่า 37 องศาเซลเซียส โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญคือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ pH 9.0 พบการเจริญที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-8% โดยความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสม คือ 2-5% *T. koreensis* เป็นแบคทีเรียประเภทโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (Homofermentative) ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์และไนโตรเจน นอกจากนี้ยังพบว่า *T. koreensis* สามารถผลิต Rhamnolipid biosurfactant ได้

(4) *Enterococcus solitaries* เปลี่ยนชื่อสกุล (Genus) เป็น *Tetragenococcus* โดย Ke et al. (1999) *T. solitarius* แยกได้จากขี้หูมนุษย์ (Colline et al., 1990) ลำดับความคล้ายคลึงของ 16S rRNA gene คือ 93.8% และ 93.7% เมื่อเทียบกับ *T. halophilus* และ *T. muriaticus* ตามลำดับ (Ennahar and Cai, 2005) แต่ค่า DNA-DNA hybridization ของ *T. solitarius* มีความคล้ายคลึงเพียง 25.7- 28.6% เมื่อเทียบกับ *T. halophilus* และ 25.4 - 27.2% เมื่อเทียบกับ *T. muriaticus* (Ennahar and Cai, 2005) ความสามารถในการย่อยน้ำตาลแสดงดังในตารางที่ 2.3 *T. solitarius* ไม่สามารถย่อย Lactose ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันกับ *Tetragenococcus* ชนิดอื่นๆ ในขณะที่ *Enterococcus* สามารถผลิตกรดจาก Lactose ได้ (Ennahar and Cai, 2005) *T. solitarius* แสดงความสามารถในการหมักน้ำตาลเหมือนกับ *T. halophilus* ซึ่งทั้งสองชนิดนี้สามารถผลิตกรดได้จากน้ำตาลหลากหลายชนิด เช่น Galactose, Cellobiose, Sucrose และ Maltose (ตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3 สมบัติทางสรีรวิทยาและการใช้น้ำตาลของแบคทีเรียกรดแล็กติกในสกุล *Tetragenococcus* ชนิด

Characteristics	*T. halophilus*[a] ATCC 33315	*T. muriaticus*[b] JCM 10006	*T. koreensis*[c] DSM 16501	*T. solitarius*[d] JCM 8736
Optimum temperature (°C)	30	25-30	15-30	NA
Growth at 40 °C	-	+	-	+
45 °C	-	-	-	+
Growth range of pH	5.0-9.0	5.0-9.6	NA	NA
Optimum pH	NA	7.5-8.0	9.0	6.5
Range of NaCl (%)	0-25	1-25	0-8	NA
Optimum NaCl (%)	5-10	7-10	2-5	NA
Gas from D-glucose	-	-	-	NA
Amygdalin	+	-	+	+
L-Arabinose	-	-	-	+
D-Cellobiose	+	-	-	+
D-Galactose	+	-	-	+
Glucose	+	+	+	NA
Glycerol	+	-	NA	-
D-Lactose	-	-	-	-
D-Maltose	+	-	+	+
D-Raffinose	-	-	NA	-
L-Rhamnose	-	-	NA	-
D-Mannitol	-	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+
D-Melibiose	-	-	NA	-
Sucrose	+	-	+	+
D-Melezitose	+	-	+	+
α-Methyl-D-glucoside	+	-	-	+
D-Ribose	+	+	+	-
D-Sorbitol	-	-	NA	-
Sorbose	+	-	-	-
D-Trehalose	+	-	+	+
D-Xylose	+	-	-	-
Xylitol	NA	-	+	-
Turanose	NA	-	+	+
D-Tagatose	NA	-	-	+
D-Arabitol	NA	-	+	+
Gluconate	NA	-	+	+

NA = Not available. [a]Thongsanit et al. (2002), [b]Satomi et al. (1997), [c]Lee et al. (2005), [d]Ennahar and Cai (2005).

2.5 องค์ประกอบของสารระเหยในน้ำปลา

กลิ่นรสเป็นปัจจัยคุณภาพที่สำคัญของน้ำปลา (Sanceda et al., 2001) กลิ่นในน้ำปลาสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มหลัก คือ กลิ่นแอมโมเนีย (Ammoniacal) กลิ่นเนยแข็ง (Cheesy) และกลิ่นเนื้อ (Meaty) (Dougan and Howard, 1975) ซึ่งเกิดจากกระบวนการย่อยสลายโปรตีน ออกซิเดชั่นของไขมัน และกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ (Beddows et al., 1980) Saisithi et al. (1966) รายงานว่ากิจกรรมของจุลินทรีย์ซึ่งแยกได้จากน้ำปลาที่หมักเป็นเวลา 9 เดือน สามารถผลิตสารระเหยชนิดกรดและสารประกอบอื่นๆ เช่น คีโตน (Ketone) และอัลดีไฮด์ (Aldehy) ซึ่งมีส่วนทำให้ได้กลิ่นรส และกลิ่นหอมของน้ำปลา โดยสารประกอบแอมโมเนีย (Ammonia) เอมีน (Amines) และสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ จะให้กลิ่นแอมโมเนีย (Ammoniacal) ส่วนสารประกอบ Volatile fatty acids จะให้กลิ่นเนยแข็ง (Cheesy) และสารประกอบอัลดีไฮด์จะให้กลิ่นเนื้อ (Meaty) ในน้ำปลา (Dougan and Howard, 1975; Fukami et al., 2002; Sanceda et al., 1992) Peralta et al. (1996) จำแนกสารระเหยในน้ำปลาได้ 124-155 ชนิด โดยแบ่งเป็นกรด สารประกอบไนโตรเจน (Nitrogen-containing compounds) สารประกอบซัลเฟอร์(Sulfur-containing compounds) อัลดีไฮด์ (Aldehydes) คีโตน (Ketones) และสารประกอบอะโรมาติก (Aomatic hydrocarbons) Fukami et al. (2004) รายงานว่า 2-Methylpropanal, 2-Methylbutanal, 2-Pentanone, 2-Ethylpyridine, Dimethyl trisulfide, 3-(Methylthio) propanal และ 3-Methylbutanoic acid จะให้กลิ่นคาวปลา (Fishy) สารประกอบที่ให้กลิ่นอับเหงื่อ (Sweaty) ได้แก่ 2-Methylpropanal, 2-Methylbutanal, 2-Ethylpyridine และ Dimethyl trisulfide สารประกอบที่ให้กลิ่นเนื้อ (Meaty) ได้แก่ 2-Ethylpyridine, 2-Methylpropanal และ 2-Methylbutanal นอกจากนี้ Shimoda et at. (1996) รายงานว่า Dimethyl sulfide, Dimethyl disulfide และ Dimethyl trisulfide เป็นสารระเหยที่ให้กลิ่นอุจจาระ (Fecal) ซึ่งเป็นกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในน้ำปลา

สารประกอบ Volatile fatty acids เกิดจากกระบวนออกซิเดชั่นของกรดไขมันไม่อิ่มตัว และกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ (Dougan and Harward, 1975) Butanoic acid, 3-Methylbutanoic acid, Pentanoic acid และ 4-Methylpentanoic acid ให้กลิ่นเนยแข็ง (Cheesy) ในน้ำปลา (Devos et al., 1995; Peralta et al., 1996; Shimoda et al., 1996) กลิ่นเนื้อ (Meaty) เกิดจากกระบวนการออกซิเดชั่นของไขมัน Glutamic acid ให้รสเนื้อ (Meaty) ในน้ำปลา (Devos et al., 1995) Michihata et al. (2002) รายงานว่าสารระเหยหลักในน้ำปลาญี่ปุ่น (Ishiru) คือ อัลดีไฮด์ สารประกอบไนโตรเจนสารประกอบซัลเฟอร์ และคีโตน โดยสารประกอบอัลดีไฮด์เกิดจากกระบวนการออกซิเดชั่นไขมันในระหว่างกระบวนการหมัก และสารประกอบอัลดีไฮด์ (Aldehyde) ที่มีโครงสร้างแบบกิ่งก้าน อะโรมาติก และอัลดีไฮด์สายสั้น เกิดจากปฏิกิริยา Deamination ของกรดอะมิโน Cha and Cadwallader (1998) รายงานว่าสารประกอบอัลดีไฮด์ที่ให้กลิ่นรสที่ดีในน้ำปลาที่ผลิตจากปลาทูน่า เกิดจากปฏิกิริยาเคมี และกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ที่ย่อยกรดอะมิโน

กรดอะมิโน และเพปไทด์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักมีผลต่อกลิ่นรสในน้ำปลา (Peralta et al., 1996) โปรติเนสจากจุลินทรีย์ (Microbial proteinases) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Intracellular aminopeptidases เป็นเอนไซม์ที่สำคัญของกระบวนการเกิดกลิ่นรส เนื่องจาก Intracellular aminopeptidases สามารถย่อยเพปไทด์ และ/หรือ โอลิโกเพปไทด์ให้เป็นกรดอะมิโน (Smit et al., 2005) กรดอะมิโนจะถูกเปลี่ยนให้เป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสโดยแบคทีเรียกรดแล็กติก สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ (1) กรดอะมิโนในกลุ่มอะโรมาติก เช่น ไทโรซีน (Tyrosine) ทริปโตแฟน (Tryptophan) และฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) (2) กรดอะมิโนที่มีกิ่งก้าน เช่น ลูซีน (Leucine) ไอโซลูซีน (Isoleucine) และวาลีน (Valine) และ(3) กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ เช่น เมไธโอนีน (Methionine) (Marilley and Casey, 2004) Smit et al. (2005) รายงานว่าลูซีนถูกเปลี่ยนให้เป็น 2-Methylpropanoic acid และ Methionine ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับกลิ่นเนยแข็ง (Cheesy) และ ถูกเปลี่ยนให้เป็น Methional ให้กลิ่นคล้ายมันฝรั่งต้ม Marilley and Casey (2004) รายงานว่าวาลีน และเมไธโอนีนถูกเปลี่ยนให้เป็น 3-Metylbutanol และ Dimethyl disulfide ตามลำดับ ดังนั้นกรดอะมิโนจึงเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในกระบวนการเกิดสารระเหยที่ให้กลิ่นรส