บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ผลการศึกษาการย่อยสลายตัวเองของปลากะตัก

4.1.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณโอลิโกเพปไทด์

รายงานวิจัยของ Siringan et al. (2006b) พบกิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin-like, Chymotrypsin-like และ Cathepsin L-like จากปลากะตัก ตลอดระยะเวลาการหมัก 1 ปี แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์สูง และตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ Leucine-aminopeptidase ได้ในเดือนที่ 1 อย่างไรก็ตาม สภาวะการหมักน้ำปลา (35-40 องศาเซลเซียส, pH 5.2–5.8 และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25-30%) นั้นไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว จึงอาจเป็นเหตุผลหนึ่งทำให้กระบวนการย่อยสลายโปรตีนปลาในระหว่างการหมักเกิดขึ้นต่ำ ดังนั้นแนวทางหนึ่งในการเร่งกระบวนหมักน้ำปลาคือเพิ่มการย่อยสลายตัวเองของปลากะตัก ซึ่งเป็นแนวทางที่ใช้ประโยชน์จากสิ่งที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติให้เต็มประสิทธิภาพ

ปริมาณโอลิโกเพปไทด์ในรูปของกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α-Amino group) ซึ่งแสดงถึงการย่อยสลายของโปรตีนมีค่าเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการบ่มในทุกตัวอย่าง ปริมาณโอลิโกเพปไทด์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.1a-c) การบ่มปลากะตักที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีเกลือมีผลให้ค่ากลุ่มแอลฟาอะมิโนสูงสุด (0.97 มิลลิโมล/กรัมตัวอย่าง, รูปที่ 4.1a, $p<0.05$) รองลงมาคือที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5, 10 และ 15% ซึ่งมีค่า 0.76, 0.64 และ 0.60 มิลลิโมล/กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ การเพิ่มความเข้มข้นของเกลือมีแนวโน้มลดการทำงานของเอนไซม์ในตัวปลา ส่งผลให้การย่อยสลายโปรตีนลดลง อย่างไรก็ตาม เมื่อบ่มในระยะเวลาที่นานขึ้นถึง 120 ชั่วโมง พบว่าตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% มีค่าการย่อยสลายสูงสุด (6.01 มิลลิโมล/กรัมตัวอย่าง) รองลงมาคือตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15% (3.27 มิลลิโมล/กรัมตัวอย่าง) ส่วนตัวอย่างที่ไม่มีและมีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% เกิดการเน่าเสีย เนื่องจากเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งตามปกติจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส โดยจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ มีจำนวนสูงเกิน 10^6 CFU/มิลลิลิตร เมื่อบ่มเกิน 4 ชั่วโมง

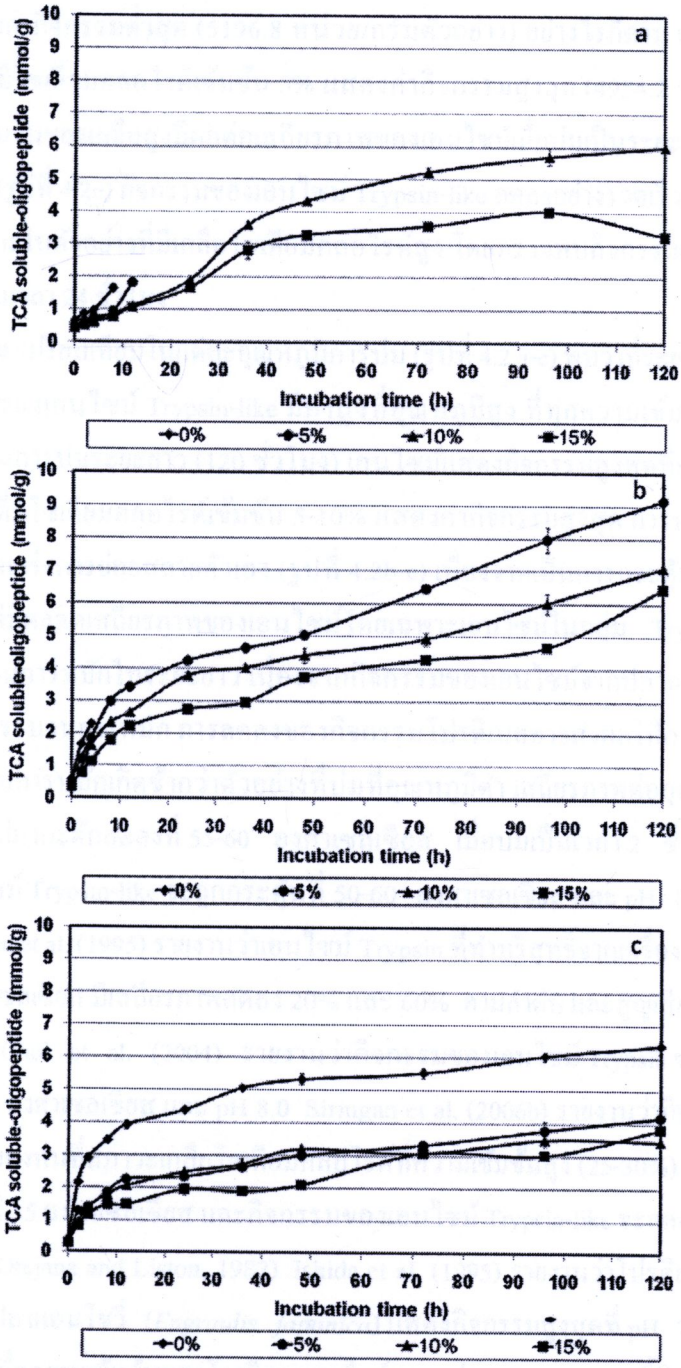
การบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ไม่มีเกลือมีค่าแอลฟาอะมิโนสูงสุด (2.28 มิลลิโมล/กรัมตัวอย่าง) รองลงมาคือตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5, 10 และ 15% ซึ่งมี 1.83, 1.62 และ 1.12 มิลลิโมล/กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ (รูปที่ 4.1 b, $p<0.05$) ซึ่งเป็นผลเช่นเดียวกับการบ่ม

ที่ 35 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม เมื่อบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่าการย่อยสลายสูงสุด (9.18 มิลลิโมล/กรัมตัวอย่าง) รองลงมาคือตัวอย่างที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% (7.10 มิลลิโมล/กรัมตัวอย่าง) และ 15% (6.45 มิลลิโมล/กรัมตัวอย่าง) ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างที่ไม่มีเกลือเกิดการเน่าเสียหลังจากการบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ไม่มีเกลือเกิดการย่อยสลายสูงสุด รองลงมาคือที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5, 10 และ 15% ตามลำดับ (รูปที่ 4.1 c) ไม่พบตัวอย่างเน่าเสียที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ที่ทุกสภาวะเกลือและสภาวะที่ไม่มีการเติมเกลือ เนื่องจากเป็นช่วงที่อุณหภูมิสูงเกินกว่าที่เชื้อจะสามารถเจริญได้

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบในแต่ละอุณหภูมิการบ่มที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมงแรก พบว่าที่ 65 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีเกลือสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายสูงสุด ลำดับถัดมาคือ การบ่มที่ 50 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนที่ระยะเวลาบ่ม 120 ชั่วโมง พบว่าที่ 50 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายสูงสุด รองลงมาคือการบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีเกลือ และที่ 35 องศาเซลเซียส ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% (รูปที่ 4.1 a-c, $p<0.05$) Ishida et al. (1994) รายงานว่า Serine proteinase จากเนื้อปลากะตักดองเกลือมีกิจกรรมสูงสุดที่ 55 องศาเซลเซียส Siringan et al. (2006b) รายงานว่ากิจกรรมการย่อยสลายสูงสุดของปลากะตัก (*Stolephorus indicus*) คือที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าโปรติเนสที่พบในปลาทรายแดง (Kinoshita et al., 1990) ปลาแอนโชวี่ (*Engraulis. japonica*) (Heu et al., 1995) และ Atlantic menhaden (Boy and Lanier, 1988) มีกิจกรรมสูงที่อุณหภูมิประมาณ 45-65 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองนี้ บ่งชี้ว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายตัวเองสูงสุด เมื่อบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

3.1.2 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของโปรติเนส

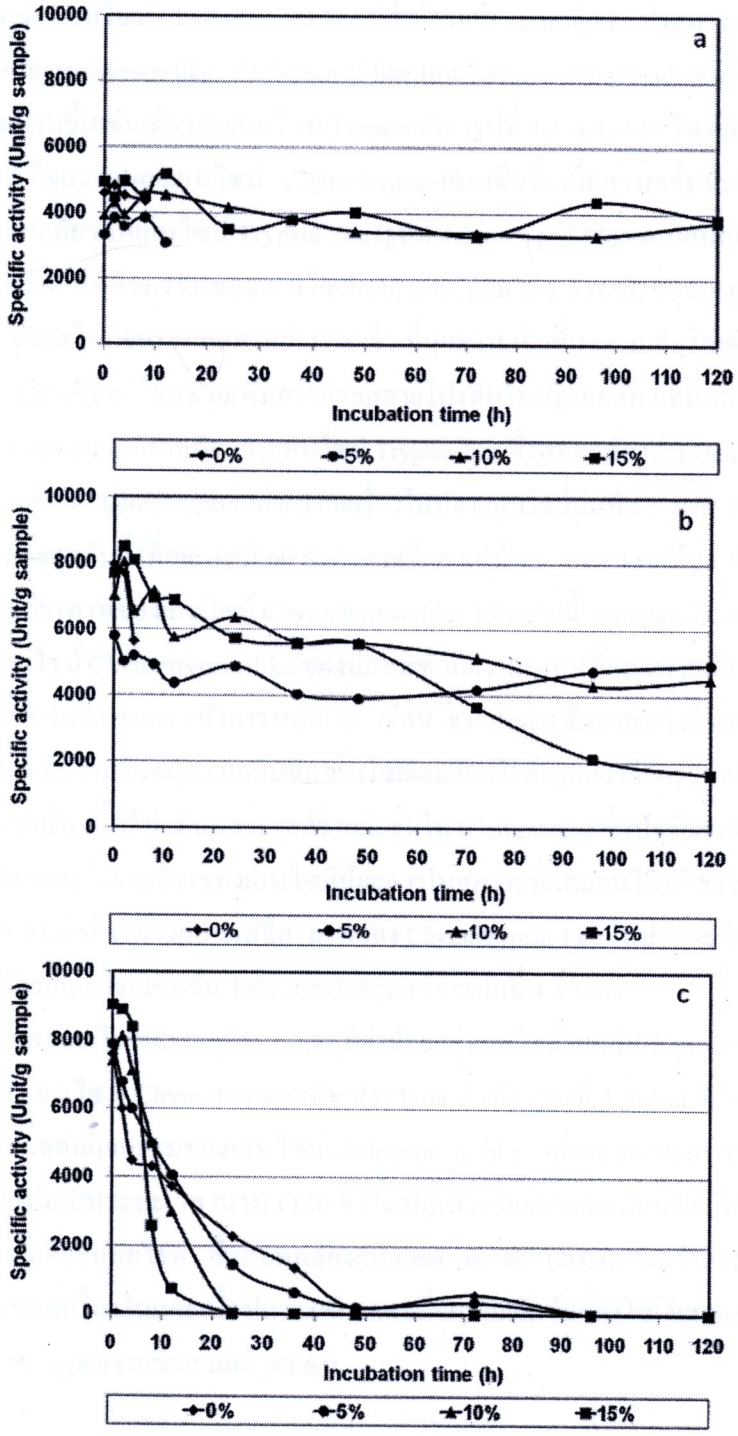
เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin-like ซึ่งเป็นโปรติเนสเด่นที่พบภายในปลากะตัก พบว่าเมื่อบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (รูปที่ 4.2 a) ตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15% แสดงค่ากิจกรรมสูงสุด (4967.5 หน่วย/กรัมตัวอย่าง) และตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 % แสดงกิจกรรมต่ำสุด (3590.5 หน่วย/กรัมตัวอย่าง) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาเสถียรภาพของเอนไซม์ในระยะยาว พบว่าตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15% มีเสถียรภาพสูงสุด (3815.0 หน่วย/กรัมตัวอย่าง) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่มีและมีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% เกิดการเน่าเสีย เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (รูปที่ 4.2b) กิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin-like ในตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15 % แสดงค่ากิจกรรมสูงสุด (7097.9 หน่วย/กรัมตัวอย่าง) ส่วนตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์



รูปที่ 4.1 ปริมาณโอลิโกเพปไทด์ในรูปของปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α-Amino group) ในตัวอย่างปลากะตักที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 (a), 50 (b) และ 65 องศาเซลเซียส (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ

เข้มข้น 5 % แสดงค่ากิจกรรมต่ำสุด (5196.8 หน่วย/กรัมตัวอย่าง) อย่างไรก็ตาม เมื่อบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% แสดงค่ากิจกรรมสูงสุด (4954.2 หน่วย/กรัมตัวอย่าง) แสดงว่าที่ความเข้มข้นของเกลือสูงมีผลต่อเสถียรภาพของเอนไซม์เมื่อบ่มเป็นระยะเวลานาน ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.2c) กิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin-like ลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะในตัวอย่างที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูง โดยตรวจพบกิจกรรมเพียงเล็กน้อยที่เกลือ 10-15% เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

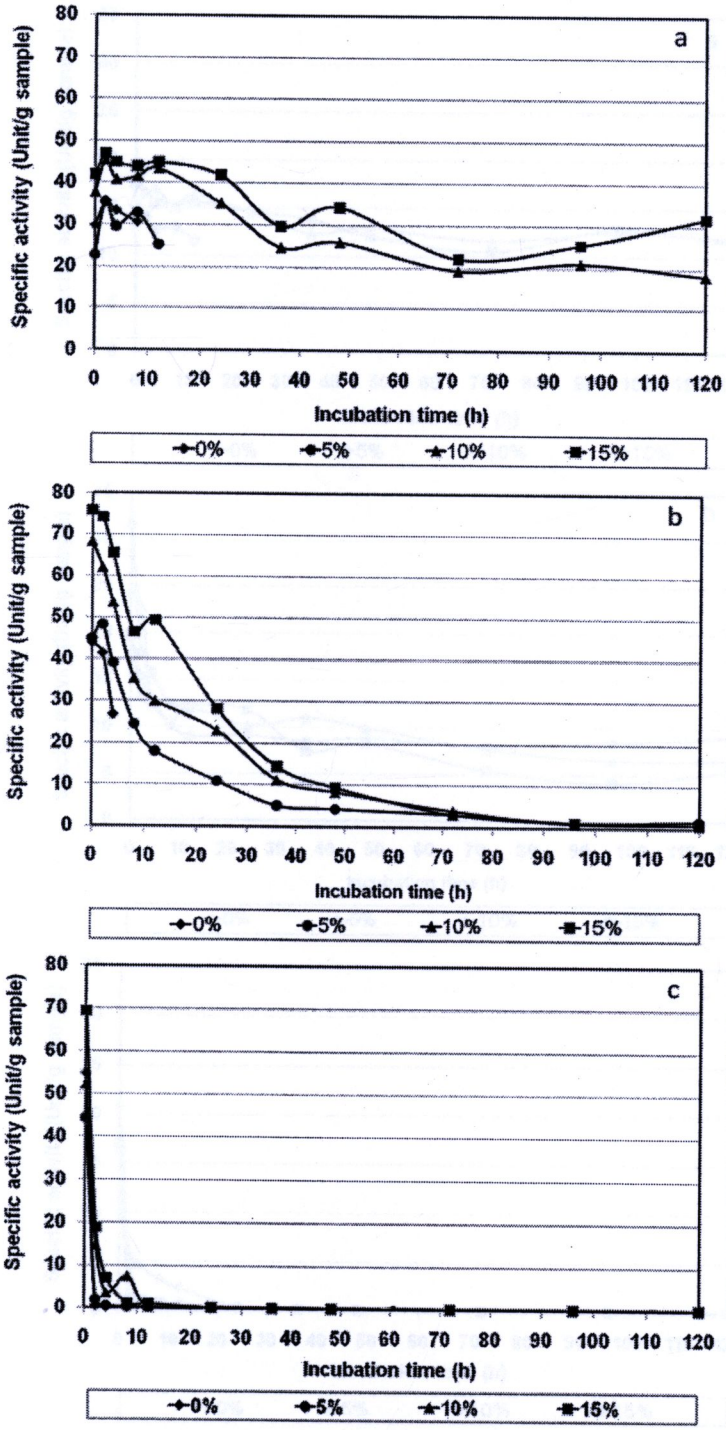
เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบในแต่ละอุณหภูมิการบ่ม (รูปที่ 4.2 a-c) พบว่าที่ระยะเวลาการบ่มสั้น (4 ชั่วโมง) กิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin-like มีค่าสูงที่อุณหภูมิสูง ที่ทุกความเข้มข้นของเกลือแสดงกิจกรรมต่ำสุด ส่วนการบ่มระยะยาว (120 ชั่วโมง) เอนไซม์แสดงกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5-10% แสดงค่ากิจกรรมสูงสุด การบ่มที่อุณหภูมิสูง (65 องศาเซลเซียส) มีผลเร่งการย่อยสลายตัวเอง (รูปที่ 4.2b-c) เนื่องจากเป็นการกระตุ้นกิจกรรมของโปรติเนสในตัวปลา แต่มีผลลดเสถียรภาพของเอนไซม์โดยเฉพาะเอนไซม์ในกลุ่ม Trypsin-like ซึ่งอาจไม่เป็นผลดีในกระบวนการหมักในระยะยาว เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์จากปลากะตักก็อาจมีบทบาทสำคัญในระหว่างกระบวนการหมัก การลดลงของกิจกรรมโปรติเนสอาจส่งผลให้การย่อยสลายโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักเกิดช้ากว่าตัวอย่างที่บ่มที่อุณหภูมิต่ำ เสถียรภาพต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ Trypsin-like ของปลากะตักลดลงที่ 55-60 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม กิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin-like จะถูกกระตุ้นที่ 50-60 องศาเซลเซียส และ pH 8.5 (Siringan et al., 2007) ในขณะที่ Heu et al. (1995) รายงานว่าเอนไซม์ Trypsin ที่ทำบริสุทธิ์จากเครื่องในปลาแอนโชวี่บ่มที่ 45 และ 55 องศาเซลเซียส มีเสถียรภาพลดลง 20% และ 60% ตามลำดับ และสูญเสียกิจกรรมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส Choi et al. (2004) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin ของเนื้อปลากะตักมีกิจกรรมสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส และ pH 8.0 Siringan et al. (2006b) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin-like มีความคงทนที่สภาวะเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูง (25-30%) จนกระทั่งการหมัก 12 เดือน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และกิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin-like จะลดลงในเดือนแรกของกระบวนการหมัก (Orejana and Liston, 1982) Ishida et al. (1995) รายงานว่าโปรติเนสในกลุ่ม Neutral serine ที่พบในเนื้อปลาแอนโชวี่ (*Engraulis japonica*) แสดงกิจกรรมสูงสุดที่ pH 7.5 ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์นี้จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์มากกว่า 10% นอกจากนี้กิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin ที่ทำบริสุทธิ์จากเนื้อปลากะตักจะมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (Choi et al., 2004) ผลการวิจัยนี้บ่งชี้ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ Trypsin-like ในปลากะตักบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15% และระยะเวลาการบ่มที่ 4 ชั่วโมง



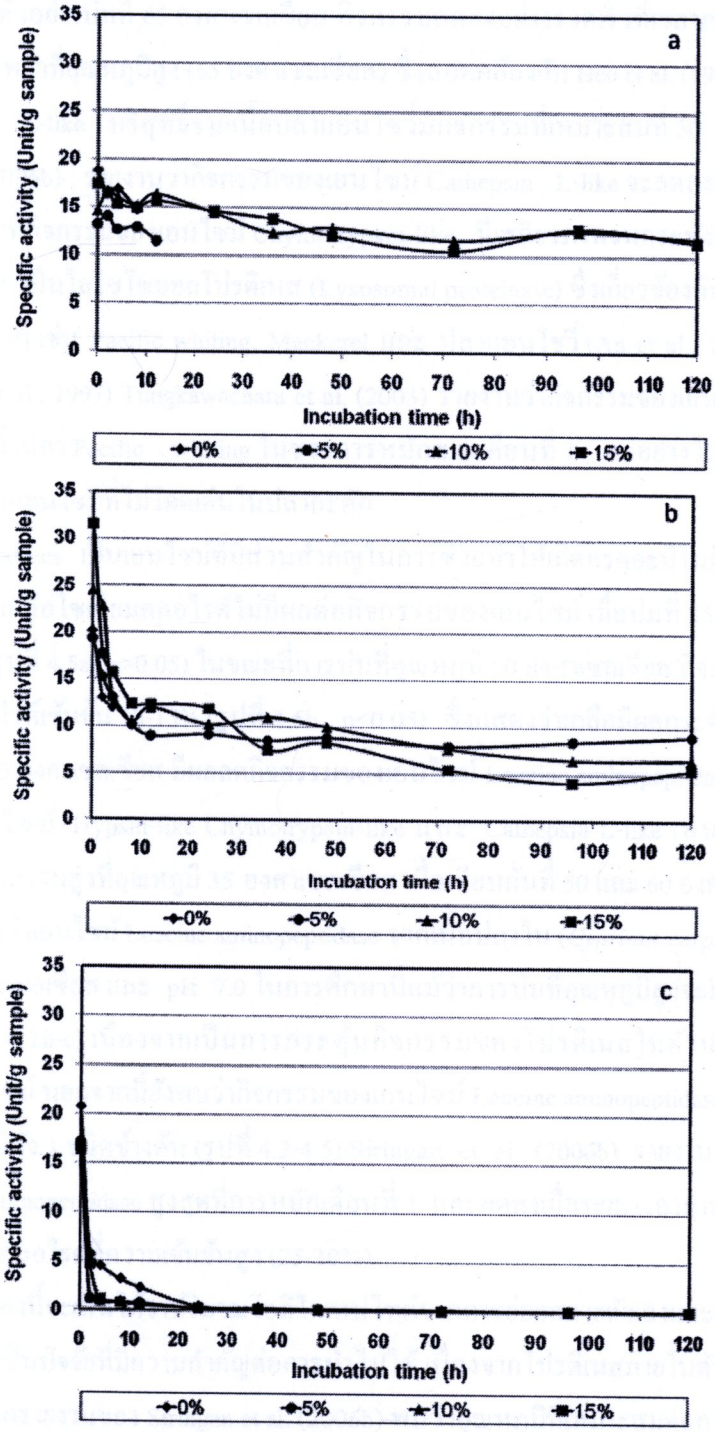
รูปที่ 4.2 กิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่ม Trypsin-like ในตัวอย่างปลากะตักที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 (a), 50 (b) และ 65 องศาเซลเซียส (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ

กิจกรรมของเอนไซม์ Chymotrypsin-like มีค่าน้อยกว่า Trypsin-like ประมาณ 100 เท่า (รูปที่ 4.3 a-c) ทั้งเอนไซม์ Chymotrypsin-like, Cathepsin L-like และ Leucine aminopeptidase มีค่ากิจกรรมลดลงเมื่อระยะเวลาบ่มนานขึ้นเช่นเดียวกับเอนไซม์ Trypsin-like (รูปที่ 4.3, 4.4, 4.5) ในระยะต้นของการบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ Chymotrypsin-like เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับเอนไซม์ Trypsin-like (รูปที่ 4.3 a-c, $p<0.05$) แต่เมื่อบ่มเป็นเวลานาน (120 ชั่วโมง) เกลือไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ Chymotrypsin-like การบ่มที่อุณหภูมิสูง (50 และ 65 องศาเซลเซียส) ส่งผลให้กิจกรรมลดลงอย่างรวดเร็ว ที่ทุกความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ถึงแม้อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส มีผลช่วยเพิ่มการย่อยสลายโปรตีนในปลากะตัก แต่มีผลลดเสถียรภาพของเอนไซม์ Chymotrypsin-like เช่นเดียวกับเอนไซม์ Trypsin-like ซึ่งสอดคล้องกับ Heu et al. (1995) ซึ่งรายงานว่ากิจกรรมของ Chymotrypsin-like จากเครื่องในปลาแอนโชวี่บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส มีเสถียรภาพลดลง 80% และถูกยับยั้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แต่ที่ 45 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 นาที ไม่มีผลต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ Chymotrypsin-like นอกจากนี้ Siringan et al. (2006b) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Chymotrypsin-like ของปลากะตักมีความคงทนที่สภาวะเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูง (25-30%) จนกระทั่งการหมัก 12 เดือน จากผลการศึกษาพบว่ากิจกรรมของโปรติเนสจาก Crude extract มีความไวต่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์มากกว่ากิจกรรมการย่อยสลายตัวเองเอนไซม์ย่อยสลายกล้ามเนื้อโปรตีนและเซลล์จากผิวชั้นใน (Cell matrix) ซึ่งปัจจัยแวดล้อมภายนอกมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของเอนไซม์น้อยกว่าในสภาวะที่เป็นเอนไซม์อิสระ ผลการวิจัยนี้บ่งชี้ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของ Chymotrypsin-like ในปลากะตักบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15% และระยะเวลาการบ่มที่ 4 ชั่วโมง

กิจกรรมของเอนไซม์ Cathepsin L-like มีค่าน้อยกว่าเอนไซม์ในกลุ่ม Trypsin-like ประมาณ 200 เท่า และน้อยกว่าเอนไซม์ Chymotrypsin-like ประมาณ 2 เท่า (รูปที่ 4.4 a-c) ที่ 35 และ 50 องศาเซลเซียส เกลือไม่ผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ Cathepsin L-like เมื่อระยะเวลาการบ่มสั้น (4 ชั่วโมง) อย่างไรก็ตาม เมื่อบ่มเป็นระยะเวลานาน (120 ชั่วโมง) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งสอดคล้องกับ Choi et al. (2004) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Cathepsin L-like ของเครื่องในและเนื้อปลากะตักลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น ซึ่งมีกิจกรรมสูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส และ pH 6.0



รูปที่ 4.3 กิจกรรมของเอนไซม์ Chymotrypsin-like ในตัวอย่างปลากะตักที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 (a), 50 (b) และ 65 องศาเซลเซียส (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ



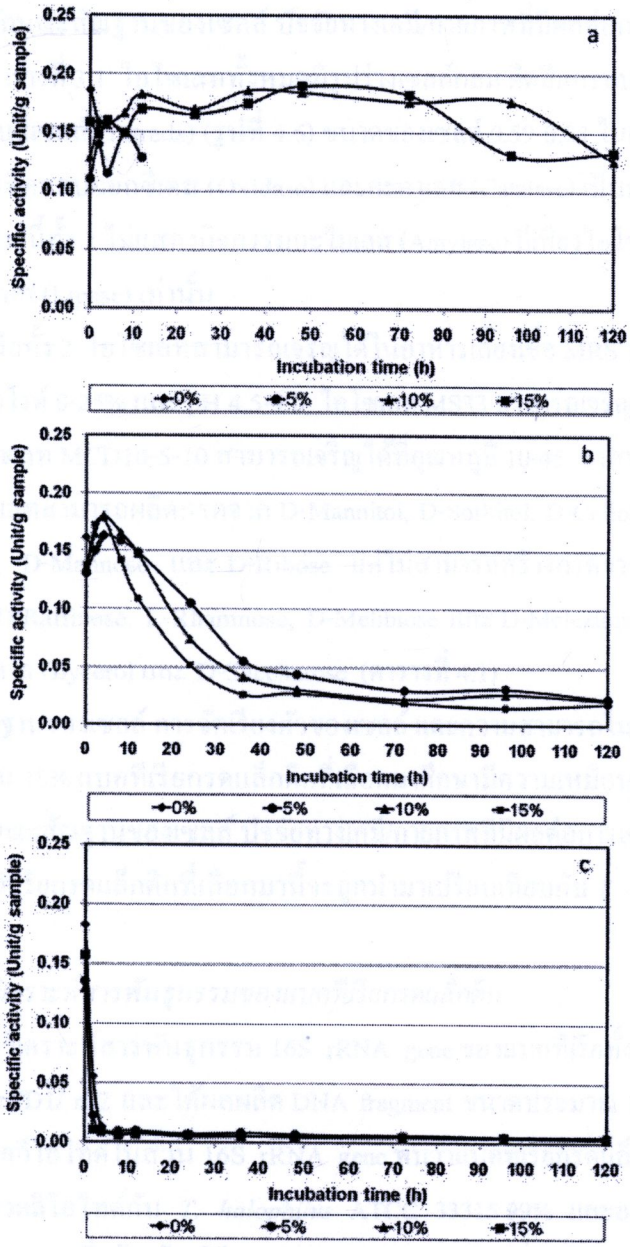
รูปที่ 4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ Cathepsin L-like ในตัวอย่างปลากะตักที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 (a), 50 (b) และ 65 องศาเซลเซียส (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ

นอกจากนี้ตัวอย่างบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส กิจกรรมลดลงอย่างรวดเร็วที่เวลาการบ่ม 2 ชั่วโมงแรก และมีเสถียรภาพต่ำที่อุณหภูมิสูง (65 องศาเซลเซียส) ซึ่งสอดคล้องกับ Heu et al. (1997) ที่รายงานว่าเอนไซม์ Cathepsin L-like บริสุทธิ์จากเนื้อปลาแอนโชวี่มีกิจกรรมที่เหมาะสมที่ 50 องศาเซลเซียส Siringan et al. (2006b) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Cathepsin L-like จะลดลงเมื่อเวลาการบ่มยาวนานขึ้น ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ Chymotrypsin-like มีเสถียรภาพจนกระทั่งเดือนที่ 12 ซึ่งเอนไซม์ Cathepsin L เป็นไลโซโซมอลโปรติเนส (Lysosomal proteinase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยกล้ามเนื้อของปลาชนิดต่างๆ เช่น Pacific whiting, Mackerel และ ปลาแอนโชวี่ (An et al., 1994; Aoki and Ueno, 1997; Heu et al., 1997) Tungkawachara et al. (2003) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Cathepsin L-like จะสูงสุดในน้ำปลา Pacific whiting ในช่วงการหมักของเดือนที่ 1 แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ Cathepsin L-like เป็นเอนไซม์ที่ไม่โดดเด่นในปลากะตัก

Aminopeptidases เป็นเอนไซม์ที่มีส่วนสำคัญในการช่วยทำให้เกิดกรดอะมิโนอิสระในน้ำปลา ผลการศึกษาพบว่า เกลือโซเดียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาสั้น (รูปที่ 4.5a, $p>0.05$) ในขณะที่การบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส กิจกรรมมีค่าสูงสุดที่เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10-15% (รูปที่ 4.5b, $p<0.05$) ซึ่งแสดงว่าเกลือมีผลกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ การบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส มีผลลดกิจกรรมของเอนไซม์ Leucine aminopeptidase อย่างรวดเร็ว เช่นเดียวกับเอนไซม์ Trypsin-like Chymotrypsin-like และ Cathepsin L-like เอนไซม์ Leucine aminopeptidase มีกิจกรรมสูงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เมื่อเทียบกับที่ 50 และ 60 องศาเซลเซียส Liu et al. (2008) รายงานว่าเอนไซม์ Leucine aminopeptidase จากเนื้อปลาไน (*Cyprinus carpio*) มีกิจกรรมที่เหมาะสมที่ 35 องศาเซลเซียส และ pH 7.0 ในการศึกษานี้แม้ว่าการบ่มที่อุณหภูมิสูงจะมีผลเร่งการย่อยสลายตัวเอง (รูปที่ 4.1b-c) เนื่องจากเป็นการกระตุ้นกิจกรรมของโปรติเนสในตัวปลา แต่มีผลลดเสถียรภาพของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Leucine aminopeptidase มีค่าน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดข้างต้น (รูปที่ 4.2-4.5) Siringan et al. (2006b) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Leucine aminopeptidase สูงสุดที่การหมักเดือนที่ 1 และลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นที่สภาวะเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูง (25-30%)

จากผลทดลองนี้จะเห็นได้ว่าปริมาณโอลิโกเพปไทด์จากการย่อยสลายตัวเองและเสถียรภาพของโปรติเนสในตัวปลาเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการนำไปใช้ เนื่องจากโปรติเนสภายในตัวปลาทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง ซึ่งจากรายงานของ Siringan et al. (2006b) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 60 องศาเซลเซียส แต่การเพิ่มอุณหภูมิการบ่มเพื่อเร่งกิจกรรมของเอนไซม์กลับมีผลลดเสถียรภาพภาพเอนไซม์ลง ในขณะเดียวกันการบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิต่ำ (35 องศาเซลเซียส) มีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการเน่า

ซึ่งการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียได้ ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนของปลากะตัก คือการบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง



รูปที่ 4.5 กิจกรรมของเอนไซม์ Luecine aminopeptidase ในตัวอย่างปลากะตักที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 (a), 50 (b) และ 65 องศาเซลเซียส (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ

4.2 ผลการศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติก

4.2.1 การระบุชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือก

ก.ลักษณะทางสัณฐานและสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติก

แบคทีเรียกรดแล็กติกที่แยกและคัดเลือกจากตัวอย่างจากบ่อหมักน้ำปลาเดือนที่ 1 และ 5 จำนวน 2 ไอโซเลท มีลักษณะสัณฐานของเซลล์ ปัจจัยทางเคมี/กายภาพที่มีผลต่อการเจริญ และสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น ดังตารางที่ 3.1 ไอโซเลททั้งหมดมีรูปร่างเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก มีการจัดเรียงตัวทั้งเป็นคู่ (Pairs) และแบบสี่เซลล์ (Tetrads) (รูปที่ 4.6) ขนาดของเซลล์ 0.59-0.88 ไมครอน (ตารางที่ 3.1) ทั้ง 2 ไอโซเลทให้ผลการทดสอบออกซิเดส (Oxidase) และคะตาเลส (Catalase) เป็นลบ ไอโซเลท MS33 สามารถย่อยเคซีน นอกจากนี้ทั้ง 2 ไม่แสดงกิจกรรมอะไมเลส (Amylase) มีเพียงไอโซเลท MS33 ที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Lipase) เท่านั้น

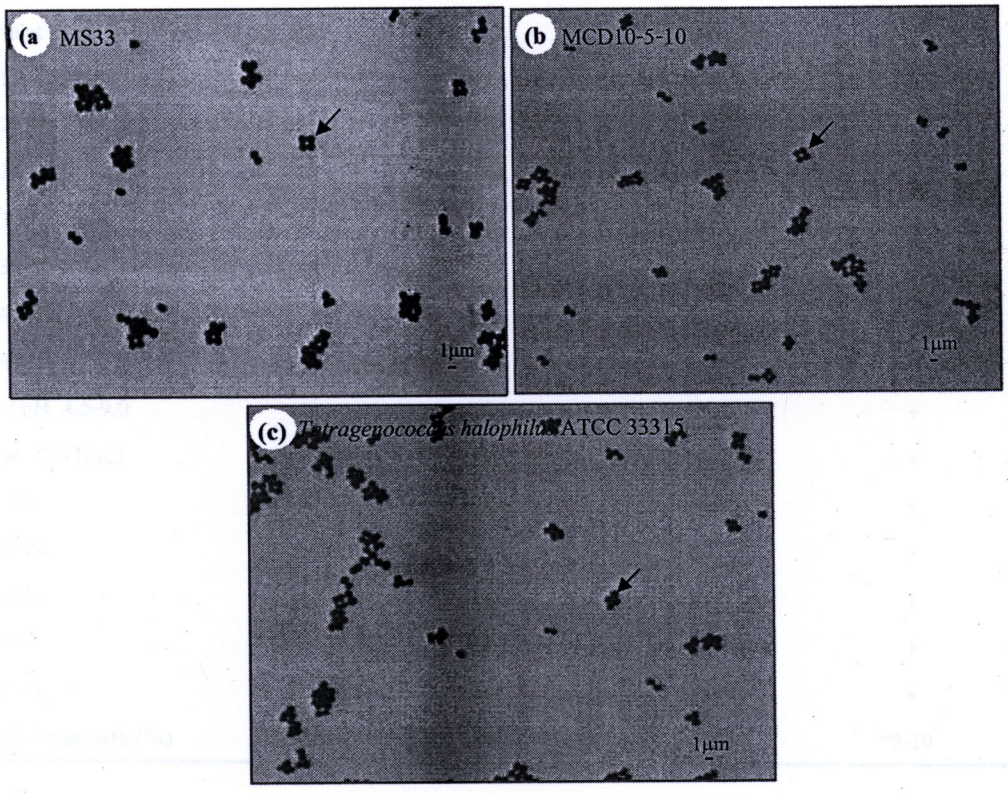
แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0-25% และ pH 4.5-9.0 ไอโซเลท MS33 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส ส่วนไอโซเลท MCD10-5-10 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-45 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.1) สำหรับทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถผลิตกรดจาก D-Mannitol, D-Sorbitol, D-Cellobiose, D-Galactose, D-Glucose, D-Maltose, D-Mannose และ D-Ribose แต่ไม่สามารถสร้างกรดจาก L-Arabinose, D-Arabinose, D-Lactose, D-Raffinose, L-Rhamnose, D-Melibiose และ D-Melezitose ได้ และยังมีความหลากหลายในการใช้น้ำตาล Glycerol และ D-Saccharose (ตารางที่ 4.1)

จากสัณฐานของเซลล์ การจัดเรียงตัวของเซลล์ และความสามารถในการเจริญที่อาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 18% แบคทีเรียกรดแล็กติกที่เลือกมาศึกษามีความเหมือนกับ *T. halophilus* (ตารางที่ 4.1) ดังนั้นลักษณะสัณฐานของเซลล์ ปัจจัยทางเคมี/กายภาพที่มีผลต่อการเจริญ และสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เลือกมานี้จะถูกนำมาเปรียบเทียบกับ *T. halophilus* ATCC 33315

ข. การวิเคราะห์สารพันธุกรรมของแบคทีเรียกรดแล็กติก

จากการวิเคราะห์สารพันธุกรรม 16S rRNA gene ของแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท ที่เพิ่มจำนวน gene ด้วย Primer fD1/ rP2 และได้ผลผลิต DNA fragment ขนาดประมาณ 1,500 bp (รูปที่ 4.7) เมื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน 16S rRNA gene พบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติก 2 ไอโซเลท มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *T. halophilus* ATCC 33315 99% และอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *T. halophilus* ตาม Phylogenic tree ที่สร้างด้วยวิธี Maximum Parsimony (รูปที่ 4.8)

T. halophilus สามารถพบได้ในกระบวนการหมักน้ำปลา (Thongsanit et al., 2002) ผลการวิจัยนี้จะพบ *T. halophilus* ตลอดช่วงการหมักตั้งแต่เดือนที่ 1-7 ซึ่งแบคทีเรียนี้จะพบได้บ่อยครั้งในกระบวนการหมักน้ำปลา Satomi et al. (1997) รายงานว่า *T. halophilus* ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ แต่ *T. muriaticus* เจริญได้ที่อาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นอย่างน้อย 0.5% ในผลวิจัยนี้แบคทีเรียกรดแล็กติก 2 ไอโซเลท ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งมีลักษณะที่แสดงออกคล้ายคลึงกับ *T. halophilus* ในขณะที่ *T. koreensis* เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกิมจิ ซึ่งสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-8% และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมคือ 2-5% (Lee et al., 2005) ดังนั้น *T. koreensis* จึงไม่พบในกระบวนการหมักน้ำปลาที่ความเข้มข้นของเกลือสูง ถึงแม้ว่า 16S rRNA gene ของ 2 ไอโซเลท มีความเหมือนกับ *T. halophilus* แต่ไอโซเลทที่ได้มีลักษณะบางประการแตกต่างจากพันธุ์อ้างอิง ดังตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.6 สัณฐานวิทยาของเซลล์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกจำนวน 2 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างจากบ่อหมักน้ำปลาเดือนที่ 1 (a) และ 5 (b) และ *T. halophilus* ATCC 33315 (c) ย้อมสีเซลล์ (ลูกศร) แบบแกรม ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ (Bar = 1 μm)

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานและผลทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติก 2 ไอโซเลท และ *T. halophilus* ATCC 33315

Characteristics	*T. halophilus*[a] ATCC 33315	*T. halophilus*[b] JCM 5888	MS33[c]	MCD10-5-10[c]
Cell shape/ arrangement	Cocci/Tetrads	Cocci/Tetrads	Cocci/Pairs, Tetrads	Cocci/Pairs, Tetrads
Cell size (μm)	0.5-1.0	0.5-1.0	0.68-0.88	0.59-0.78
Oxidase	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-
Proteinase	+	NA	+	-
Lipase	-	NA	+	-
Amylase	-	NA	-	-
Growth at 10 °C	NA	NA	+	+
15 °C	NA	NA	+	+
20 °C	NA	NA	+	+
25 °C	NA	NA	+	+
30 °C	NA	NA	+	+
35 °C	NA	NA	+	+
40 °C	-	+	+	+
45 °C	-	NA	-	+
Growth at pH 4.5-9.0	+	NA	+	+
Growth at 0% NaCl	+	NA	+	+
3%	+	NA	+	+
6.5%	+	NA	+	+
10%	+	NA	+	+
15%	+	NA	+	+
25%	+	NA	+	+
Optimum NaCl for growth (%)	5-10	NA	5-10	5-10

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

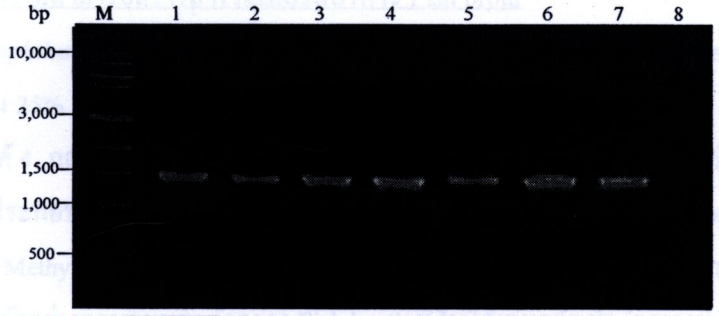
Characteristics	*T. halophilus*[a] ATCC 33315	*T. halophilus*[b] JCM 5888	MS33[c]	MCD10-5-10[c]
Gas from D-glucose	-	-	-	-
Acid from:				
L-Arabinose	+	+	-	-
D-Arabinose	-	NA	-	-
Glycerol	-	-	-	+
D-Mannitol	-	-	+	+
D-Sorbitol	-	-	+	+
D-Cellobiose	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+
D-Lactose	-	-	-	-
D-Maltose	+	+	+	+
D-Raffinose	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	NA	-	-
D-Mannose	+	NA	+	+
D-Melibiose	-	-	-	-
D-Saccharose	+	+	-	+
D-Melezitose	+	-	-	-
D-Ribose	+	+	+	+
Configuration of lactic acid	L	L	L	L

NA = Not available.

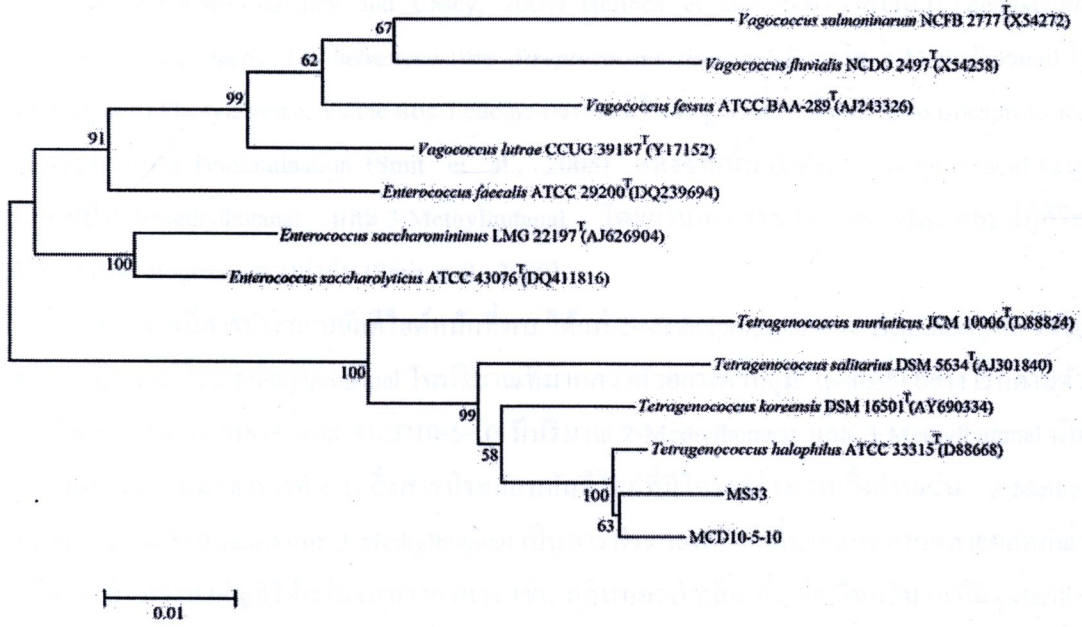
[a]Phenotypic characteristics were tested in this study.

[b]Ennahar and Cai (2005)

[c] MS33 isolated from the 1st month fermentation; MCD10-5-10 isolated from the 5th month fermentation.



รูปที่ 4.7 ผลผลิต PCR ของ 16S rRNA gene ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย Primers fD1/rP2; Lane M คือ 1 kb DNA Ladder (Fermentas life sciences) เป็น Molecular weight markers; 2 คือ MS33; 5 คือ MCD10-5-10; 8 คือตัวอย่างควบคุมเชิงลบ



รูปที่ 4.8 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เป็นสายพันธุ์คัดเลือก 2 สายพันธุ์และสายพันธุ์จาก NCBI nucleotide sequence database (U.S.A.) ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene (Partial sequence) โดยใช้วิธี Maximum Parsimony ตัวเลขที่ Branch เป็นค่า Bootstrap จาก 1,000 replications

4.2.2 ความสามารถสร้างสารระเหยในอาหาร Fish broth

T. halophilus MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 ที่เจริญในอาหาร Fish broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% สามารถสร้างสารระเหยได้ 22 สารประกอบ ดังตารางที่ 4.2 โดยสามารถจัดกลุ่มสารประกอบได้ 4 กลุ่ม คือ แอลกอฮอล์ (Alcohol) อัลดีไฮด์ (Aldehyde) เอสเตอร์ (Ester) และ คีโตน (Ketone) สารประกอบแอลกอฮอล์ (Alcohol) ที่พบได้แก่ Isopropyl alcohol, 1-Propanol, 1-Butanol, 1-Penten-3-ol, 3-Methyl-1-butanol, 1-Pentanol และ 1-Hexanol ไอโซเลท MS33 สามารถสร้าง Isopropyl alcohol สูงกว่าตัวอย่างควบคุมหรือตัวอย่าง Fish broth ที่ไม่ได้เติมกล้าเชื้อ (ตารางที่ 4.2, $p<0.05$) ในขณะที่ไอโซเลท MCD10-5-10 สามารถสร้าง (*E*)-2-Penten-1-ol และ 1-Hexanol เท่านั้น โดยพบน้อยกว่าไอโซเลท MS33 ($p<0.05$) จากผลการวิจัยนี้บ่งชี้ว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ชอบความเค็มสามารถสร้างสารประกอบแอลกอฮอล์ในอาหาร Fish broth ที่มีความเข้มข้นของเกลือในปริมาณสูง (25%) แบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถผลิตแอลกอฮอล์จากโปรตีน ไขมัน และ แลคโตส โดยผ่านวิถี Proteolysis Lipolysis และ Glycolysis ตามลำดับ (Marilley and Casey, 2004) Helinck et al. (2004) รายงานว่า *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. helveticus* และ *Streptococcus thermophilus* ผลิต 3-Methylbutanol ในปริมาณสูงจาก Phenylalanine, Valine และ Leucine กรดอะมิโนจะถูกเปลี่ยนเป็น α-Keto isocaproic acid โดยกระบวนการ Transamination (Smit et al., 2005) หลังจากนั้น α-Keto isocaproic acid จะถูกเปลี่ยนเป็น 2-Methylbutanal และ 3-Methylbutanal โดยผ่านกิจกรรม Decarboxylase และปฏิกิริยา Alcohol dehydrogenase ตามลำดับ (Smit et al., 2009)

นอกจากนี้สารประกอบอัลดีไฮด์หลักที่พบ ได้แก่ 2-Methylpropanal และ Benzaldehyde ซึ่งไอโซเลท MS33 สร้าง 2-Methylpropanal ในปริมาณที่มากกว่าตัวอย่างควบคุม ($p<0.05$) อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่เติมไอโซเลท MS33 และ MCD10-5-10 มีปริมาณ 2-Methylbutanal และ 3-Methylbutanal น้อยกว่าตัวอย่างควบคุม (ตารางที่ 4.2) ซึ่งสารประกอบอัลดีไฮด์ที่มีโครงสร้างแบบกิ่งก้านเช่น 2-Methylpropanal, 2-Methylbutanal และ 3-Methylbutanal เป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสในหลากหลายผลิตภัณฑ์ อัลดีไฮด์เป็นสารสำคัญที่ให้กลิ่นรสทางอาหาร เช่น กลิ่นมอลล์ กลิ่นเนื้อ ซึ่งเป็นกลิ่นรสที่ดี (Marilley and Casey, 2004) กระบวนการสำคัญที่ทำให้เกิดสารประกอบ 3-Methylbutanal คือปฏิกิริยาที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (Non-enzymatic) ซึ่งประกอบด้วยการเหนี่ยวนำด้วยความร้อน ปฏิกิริยา Strecker degradation (Fukami et al., 2002; Sanceda et al., 1992) ส่วนสารประกอบ Benzaldehyde เกิดจากสารตั้งต้นกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างอะโรมาติก เช่น Phenylalanine ซึ่งช่วยให้เกิดรสขมในถั่วอัลมอนด์ (Curioni and Bosset, 2002) นอกจากนี้ Smit et al. (2009) รายงานว่า 2-Methylpropanal, 2-Methylbutanal และ 3-Methylbutanal ได้จากกระบวนการ Catabolism ของกรดอะมิโน โดยเริ่มต้นจากกระบวนการ Transami-

nation ของ Leucine, Valine และIsoleucine ตามด้วยการเกิดปฏิกิริยา Decarboxylation ของอัลดีไฮด์ นอกจากนี้สารประกอบ Benzaldehyde ยังสามารถเกิดปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ α-Keto isocaproic acid จะถูกกระตุ้นโดย Mn^{2+} ได้สารประกอบ 2-Methylpropanal ซึ่งปฏิกิริยานี้สามารถทำให้เกิดน้อยลงโดยควบคุมความเข้มข้นของ Mn^{2+} และออกซิเจน (Smit and Engels, 2004)

ตัวอย่าง Fish broth ที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 มีปริมาณ Ethyl acetate น้อยกว่าตัวอย่างควบคุม (ตารางที่ 4.2) สารประกอบอัลดีไฮด์จะถูกรีดิวซ์เป็นแอลกอฮอล์ และถูกออกซิไดซ์เป็นกรดคาร์บอกซิลิก (Carboxylic acid) ต่อไป ซึ่งสารประกอบสองกลุ่มนี้เป็นสารตั้งต้นของสารประกอบเอสเตอร์ (Marilley and Casey, 2004) ปริมาณ Acetone, 2-Butanone, 2,3-Butanedione และ Cyclohexanone ในตัวอย่างที่เติมแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 2 สายพันธุ์ มีปริมาณที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4.2) ไอโซเลท MS33 มีแนวโน้มให้กลิ่นเนื้อกับผลิตภัณฑ์หมักที่ปริมาณเกลือสูง นอกจากนี้สารประกอบที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ เช่น Dimethyl sulfide และ Dimethyl disulfide จะทำให้เกิดกลิ่นรสไม่พึงประสงค์ในน้ำปลา (Fukami et al., 2004) ซึ่งตัวอย่างที่เติม MS33 และ MCD10-5-10 ไม่สร้างสารประกอบซัลเฟอร์ แบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 2 ไอโซเลทมีแนวโน้มที่จะไม่ทำให้เกิดกลิ่นรสไม่พึงประสงค์ในผลิตภัณฑ์น้ำปลา จากผลการทดลองนี้แบคทีเรียกรดแล็กติก 2 ไอโซเลทที่เลี้ยงในอาหาร Fish broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% โดยสร้างสารระเหยที่แตกต่าง

4.2.3 การใช้แบคทีเรียกรดแล็กติกในการหมักน้ำปลา

ตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียมีปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนเพิ่มขึ้นจากวันเริ่มต้น ($p<0.05$, ตารางที่ 4.3) ตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 มีปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนเพิ่มเป็น 704-740 มิลลิโมลาร์ ในเดือนที่ 6 (ตารางที่ 4.3) และเพิ่มขึ้นมากกว่าตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้เติมกล้าเชื้อ ($p<0.05$) ผลวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเติมแบคทีเรียกรดแล็กติกทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนปลามากขึ้น การเพิ่มขึ้นของแอลฟาอะมิโนอาจมีผลต่อการสร้างสารระเหยที่ให้กลิ่นรสในน้ำปลาได้อีกด้วย เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของแอลฟาอะมิโนแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของเพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งแบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสได้ (Law and Haandrikman, 1995; Magboul and McSweeney, 1999) ถึงแม้ว่าผลจากการศึกษาความสามารถในการย่อยโปรตีนโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม Skim milk (Skim milk agar) ของไอโซเลท MCD10-5-10 จะให้ผลเป็นลบ แต่เมื่อใช้ในระบบการหมักพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอลฟาอะมิโนเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ซึ่งบ่งชี้ว่าในระบบการหมักน้ำปลามีผลต่อการเหนี่ยวนำการย่อยสลายโปรตีนของ *T. halophilus* MCD10-5-10 ดังนั้น *T.*

halophilus MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 น่าจะเป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เหมาะต่อการนำไปพัฒนากล้าเชื้อเพื่อใช้ในกระบวนการหมักน้ำปลาต่อไป

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารระเหยสัมพัทธ์ในตัวอย่าง Fish broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% และเติมแบคทีเรียกรดแล็กติก บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน

RI*	Compounds	Relative peak area**		
		Control	*T. halophilus* MCD10-5-10	*T. halophilus* MS33
	Alcohols			
1011	Isopropyl alcohol	0.063	ND	0.501
1041	2-Butanol	ND	ND	0.022
1049	1-Propanol	0.026	ND	0.063
1110	2-Methyl-1-propanol	ND	ND	0.024
1185	1-Butanol	ND	ND	ND
1193	1-Penten-3-ol	ND	ND	ND
1205	3-Methyl-1-butanol	ND	ND	ND
1255	1-Pentanol	ND	ND	0.033
1327	(*E*)-2-Penten-1-ol	0.064	0.004	0.018
1336	(*Z*)-2-Penten-1-ol	0.018	ND	ND
1360	1-Hexanol	ND	0.014	0.024
	Aldehydes			
784	Propanal	0.030	0.001	0.004
800	2-Methylpropanal	ND	0.126	0.372
909	2-Methylbutanal	0.107	0.028	0.038
911	3-Methylbutanal	0.091	ND	0.034
1097	Hexanal	0.024	ND	ND
1459	Benzaldehyde	0.004	0.045	0.039
	Ester			
863	Ethyl acetate	0.101	0.005	0.045
	Ketones			
809	Acetone	0.202	0.054	0.391
888	2-Butanone	ND	ND	0.020
1028	2,3-Butanedione	ND	ND	0.011
1315	Cyclohexanone	ND	ND	0.086

Note: Bacterial cell count of all isolates were 10^7-10^8 cell/ml; ND= not detected.

*Retention indices calculated for DB-WAX column using n-alkanes as standards.

**The values represent the ratio of the peak area of any compound to that of internal standard (cyclohexanol).

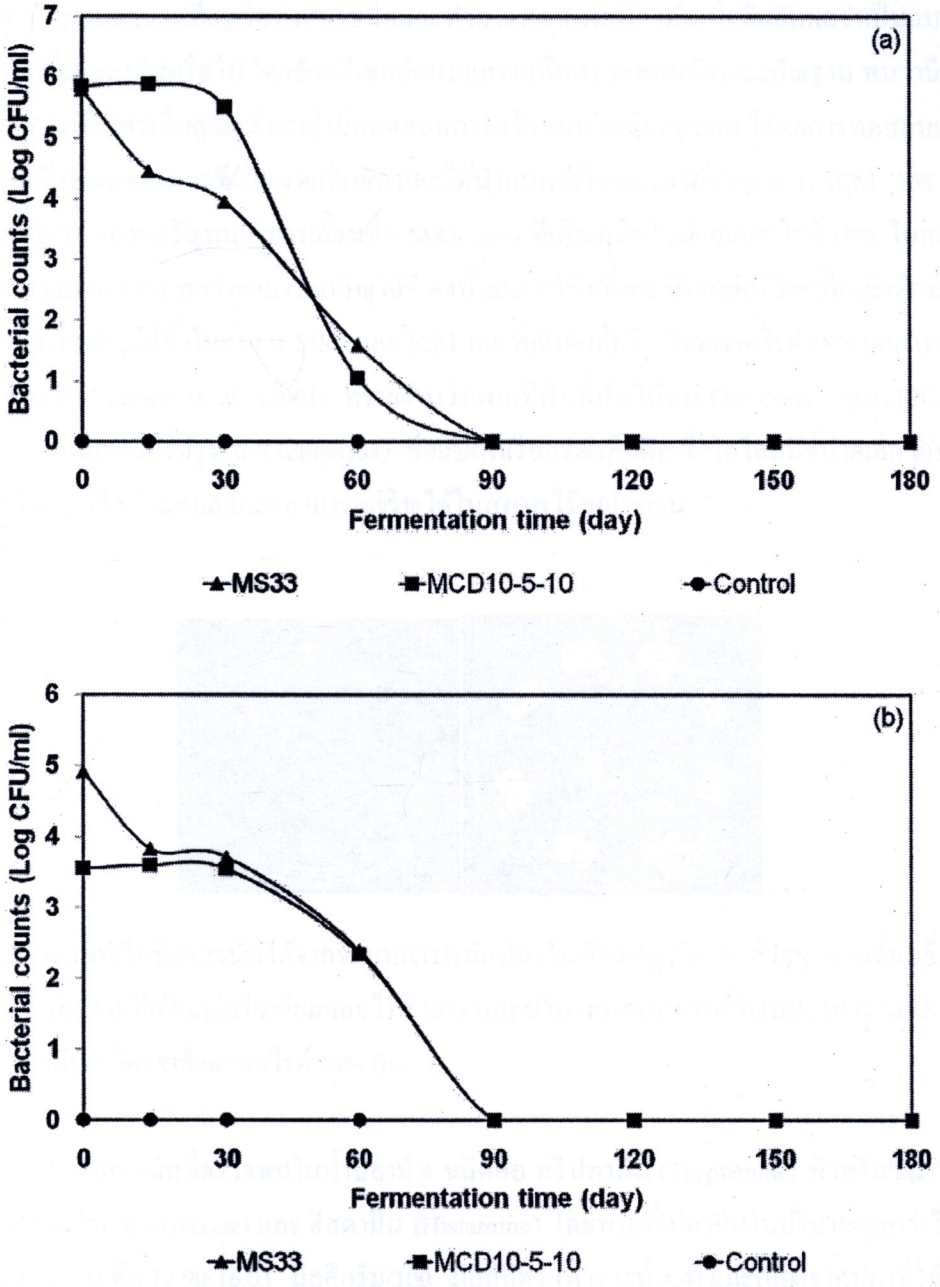
ตารางที่ 4.3 ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนของตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อ บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน

Fermentation time (Day)	Control	*T. halophilus* MS33	*T. halophilus* MCD10-5-10
0	436.49 ± 24.11	445.87 ± 38.58	458.65 ± 42.20
14	584.08 ± 28.09^{b}	636.12 ± 32.76^{a}	691.74 ± 51.14^{a}
30	644.89 ± 40.45	684.14 ± 23.51	676.95 ± 27.80
60	611.60 ± 85.11^{b}	679.52 ± 69.84^{a}	711.51 ± 27.00^{a}
90	676.13 ± 15.55^{b}	726.92 ± 40.20^{a}	744.95 ± 38.79^{a}
120	658.64 ± 1.57^{c}	704.50 ± 8.52^{b}	740.35 ± 79.42^{a}
150	691.46 ± 12.75^{c}	724.17 ± 7.94^{b}	786.15 ± 45.81^{a}
180	707.46 ± 3.58^{b}	783.96 ± 19.18^{a}	779.65 ± 32.58^{a}

Letters indicate significant difference in the same row ($p<0.05$).

การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียกรดแล็กติกระหว่างกระบวนการหมักโดยใช้อาหาร MRS agar ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 18% และแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5% พบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกในวันเริ่มต้นของการหมักมีจำนวน 10^{5} CFU/มิลลิลิตร และลดลง 3-4 Log CFU/มิลลิลิตร ในเดือนที่ 2 และไม่พบการเจริญในเดือนที่ 3 (**รูปที่ 4.9a**) นอกจากนี้ไม่พบแบคทีเรียกรดแล็กติกในตัวอย่างควบคุม แสดงว่าแบคทีเรียที่ตรวจนับได้ในตัวอย่างเป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เติมลงไป แม้ว่าแบคทีเรียที่เติมลงไปไม่สามารถเจริญเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก แต่ก็มีผลทำให้ปริมาณแอลฟาอะมิโนเพิ่มขึ้นมากกว่าตัวอย่างควบคุม (ตัวอย่างที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ)

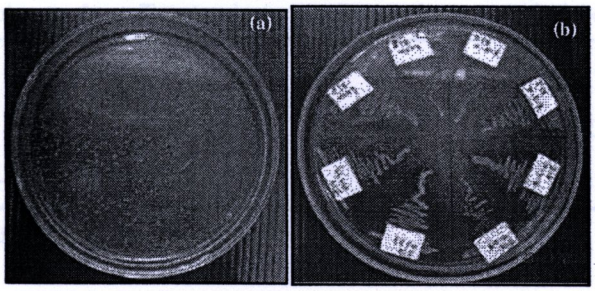
เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียในอาหาร JCM 168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 18% ไม่พบแบคทีเรียในตัวอย่างควบคุม (รูปที่ 4.9b) อาจเนื่องจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างปลากะตักถูกทำลาย เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำให้แบคทีเรียที่ชอบเค็ม/ทนเค็มที่มีในระบบถูกทำลายด้วยความร้อน ส่วนตัวอย่างที่เติมแบคทีเรียกรดแล็กติกมีจำนวนแบคทีเรียใกล้เคียงกับจำนวนแบคทีเรียที่เติมลงไป และลดลง 3-4 Log CFU/มิลลิลิตร ในเดือนที่ 2 และไม่สามารถตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ได้ในเดือนที่ 3 (รูปที่ 4.9b) สังเกตได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ซึ่งตรวจนับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ JCM 168 มีลักษณะคล้ายกับผลที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (รูปที่ 4.9a,b)



รูปที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลง**ของจำนวน**แบคทีเรียตรวจนับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (a) และ JCM 168 (b) ที่เติม**โซเดียมคลอไรด์** 18% ระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา

มีความเป็นไปได้ว่า**แบคทีเรียที่**ตรวจนับได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ JCM 168 จะเป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เติมลงไปซึ่งมี**ความสามารถในการ**ทนออกซิเจนได้เล็กน้อย (Aerotolerance) ทั้งนี้ได้สุ่มเก็บ

โคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดและทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อยืนยันผลว่าเป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เติมลงไปหรือไม่ โดยย้อมสีเซลล์แบบแกรมเพื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐาน พบว่ามีรูปร่างเซลล์กลม การเรียงตัวเป็นคู่และสี่เซลล์ เมื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส ได้ผลการทดสอบเป็นลบตรงกับคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแล็กติก และได้นำแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหาร JCM 168 (รูปที่ 4.10a) มาทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 18% ในสภาพไร้ออกซิเจน (รูปที่ 4.10b) พบว่าสามารถเจริญได้ดี ดังนั้นแบคทีเรียที่พบเป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เติมลงไป ซึ่งสามารถเจริญได้ทั้งในอาหาร MRS และ JCM 168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 18% ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Leisner et al. (2001) ที่รายงานว่าแบคทีเรียที่นับได้บน Plat count agar (PCA) ในกระบวนการหมักเครื่องปรุงรส (Tempoyak) คือแบคทีเรียกรดแล็กติก ซึ่งโคโลนีมีขนาดเล็ก สีเทาหรือขาว ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลสและสามารถเจริญได้ในสภาพไร้ออกซิเจน



รูปที่ 4.10 แบคทีเรียที่ตรวจนับได้จากระบบการหมักปลาในห้องปฏิบัติการ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ JCM 168 (a) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 18% และนำมาทดสอบการเจริญบนอาหาร MRS agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 18% (b)

ไบโอจีนิกเอมีนที่ตรวจพบในน้ำปลามี 4 ชนิดคือ ทริปตามีน (Tryptamine) พิวทรีสซีน (Putrescine) คาดาเวอรีน (Cadaverine) และ ฮีสตามีน (Histamine) โดยพบทริปตามีนในปริมาณสูงกว่าไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่น คือ 12.90-16.03 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร (ตารางที่ 4.4) และเนื่องจากปลาที่ใช้ในการทดลองเป็นปลาที่มีคุณภาพความสดสูง จึงตรวจไม่พบพิวทรีสซีนหรือพบน้อยเพราะพิวทรีสซีนเป็นไบโอจีนิกเอมีนที่พบในปลาที่ไม่สด (Yongsawatdigul et al., 2004) จากการทดสอบการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ mGYP ที่รายงานก่อนหน้านี้ (Udomsil, 2008) พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลทที่ศึกษาสามารถสร้างไบโอจีนิกเอมีนได้ ซึ่งอาจเป็นเพราะในอาหารเลี้ยงเชื้อมีสารตั้งต้นกรดอะมิ-

โนของสารไบโอจีนิกเอมีน แต่เมื่อทดสอบในระบบการหมักปลาพบว่า ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนของน้ำปลาในเดือนที่ 6 ไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุม ($p>0.05$) บ่งชี้ว่าการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 ไม่ได้ทำให้ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนเพิ่มขึ้น ซึ่งไบโอจีนิกเอมีนสามารถผลิตได้โดยผ่านกระบวนการ Decarboxylation ของกรดอะมิโน ประเทศแคนาดาได้กำหนดค่าฮีสตามีนให้มีได้สูงสุดไม่เกิน 20 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร (CFIA, 2003) ตัวอย่างที่เติมแบคทีเรียไอโซเลท MS33 และ MCD10-5-10 มีปริมาณฮีสตามีนน้อยกว่าตัวอย่างควบคุม ($p<0.05$) (ตารางที่ 3.4) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทไม่มีผลต่อการสร้างฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์น้ำปลา

ตารางที่ 4.4 ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในน้ำปลาที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 6 เดือน

Fish sauce sample	Biogenic amine content (mg/100ml)			
	Tryptamine	Putrescine	Cadaverine	Histamine
Control	16.03 ± 1.06^{a}	ND	2.40 ± 0.50^{b}	10.24 ± 3.12^{a}
T. halophilus MS33	14.39 ± 1.15^{ab}	ND	ND	6.06 ± 0.01^{ab}
T. halophilus MCD10-5-10	12.90 ± 1.64^{b}	2.33 ± 1.76	6.12 ± 2.70^{a}	4.50 ± 1.94^{b}

Letters indicate significant difference in the same column ($p<0.05$).

ND = not detected.

ไนโตรเจนรวมทั้งหมดรวมถึงปริมาณโปรตีนไนโตรเจนและสารประกอบที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น แอมโมเนีย กรดอะมิโนอิสระ นิวคลีโอไทด์ ยูเรีย และไตรเมทิลามีน (Trimethylamine, TMA) (Shahidi et al., 1994) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้ช่วยทำให้เกิดความจำเพาะของกลิ่นรสในน้ำปลา (Dougan and Howard, 1975) Dougan and Howard (1975) รายงานว่า 80% ของไนโตรเจนรวมทั้งหมดของน้ำปลาจะอยู่ในรูปของกรดอะมิโน นอกจากนี้ปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดของน้ำปลาจะขึ้นกับปลาแต่ละชนิดและองค์ประกอบทางเคมีของปลา (Tungkawachara et al., 2003) ซึ่งปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพของน้ำปลา (Park et al., 2001) เกณฑ์มาตรฐานของน้ำปลาคุณภาพชั้นที่ 1 ของประเทศไทยจะต้องมีค่ามากกว่า 2.0% จากผลการวิจัยพบว่าปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมด (Total nitrogen) ของตัวอย่างที่เติมแบคทีเรียกรดแล็กติก *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 มีค่ามากกว่า 2.0% (ตารางที่ 4.5) ซึ่งเป็นเกณฑ์มาตรฐานของน้ำปลาคุณภาพชั้นที่ 1

เมื่อพิจารณาปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนของตัวอย่างที่ใช้กล้าเชื้อและตัวอย่างควบคุมพบว่ามีค่าประมาณ 0.1% ($p>0.05$, ตารางที่ 4.5) การเพิ่มขึ้นของปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนเกิดจากการย่อยของสายพอลีเพปไทด์ (Tungkawachara et al., 2003) ซึ่งปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนเป็นตัวบ่งชี้ถึงสารประกอบไนโตรเจนเริ่มต้นที่ช่วยให้เกิดกลิ่นแอมโมเนียในน้ำปลา (Dougan and Howard, 1975; Beddows et al., 1976; McIver et al., 1982) อย่างไรก็ตาม การยอมรับของผู้บริโภคต่อกลิ่นที่เกิดจากแอมโมเนียยังไม่มีรายงานการศึกษา

ดัชนีสีน้ำตาลในทุกตัวอย่างไม่ต่างกัน ($p>0.05$, ตารางที่ 4.5) ปฏิกิริยา Maillard ทำให้เกิดสารสีน้ำตาล (Melanoidin) ในน้ำปลาระหว่างกระบวนการหมัก (Lopetcharat et al., 2001) ปริมาณเกลือของตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อคือ 26 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของมาตรฐานอุตสาหกรรม (ตารางที่ 4.5) การเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 ไม่มีผลต่อปริมาณเกลือในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ pH ของตัวอย่างน้ำปลาคือ 5.43-5.46 (ตารางที่ 4.5) ซึ่งน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 มีค่า pH ต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม ($p<0.05$, ตารางที่ 4.5) Michihata et al. (2000) รายงานว่ากรดอินทรีย์ เช่น กรดแล็กติก และกรดอะซิติกทำให้ค่า pH ของน้ำปลาลดลงระหว่างกระบวนการหมัก ถึงแม้ว่าจะมีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก แต่ไม่ได้ทำให้เกิดการลดลงของ pH อย่างมาก เนื่องจากในกระบวนการหมักน้ำปลาไม่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนประกอบ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ใช้ผลิตกรดแล็กติก

ตารางที่ 4.5 คุณสมบัติทางเคมีของน้ำปลาที่หมักโดยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 6 เดือน

Sample	Total nitrogen (%)	Ammonical Nitrogen (%)	Salt (%)	Browning indiex (Abs@440nm)	pH
Control	2.03 ± 0.08	0.11 ± 0.01	25.87 ± 0.41	0.441 ± 0.01	5.46 ± 0.00[a]
T. halophilus MS33	2.10 ± 0.00	0.11 ± 0.01	26.38 ± 0.041	0.474 ± 0.01	5.43 ± 0.01[b]
T. halophilus MCD10-5-10	2.05 ± 0.57	0.11 ± 0.00	26.20 ± 1.44	0.456 ± 0.00	5.43 ± 0.01[b]

Letters indicate significant difference in the same column ($p<0.05$).

ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในตัวอย่าง ซึ่งมีผลต่อรสชาติของผลิตภัณฑ์แสดงดังตารางที่ 4.6 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระรวมของตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* มีค่าสูงกว่าตัวอย่างที่หมักทางการค้าเป็นเวลา 12 เดือน ตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 2 ไอโซเลท มีปริมาณกรดอะมิโน

โพรลีน (Proline) และวาลีน (Valine) สูงกว่าตัวอย่างควบคุม (ไม่ได้เติมกล้าเชื้อ) และตัวอย่างทางการค้าที่หมักเป็นเวลา 12 เดือน กรดอะมิโน 2 ชนิดนี้น่าจะเป็นผลิตผลจาก Protein metabolism ของแบคทีเรียกรดแล็กติก ตัวอย่างทางการค้ามีปริมาณกรดอะมิโนไลซีน (Lysine) และกลูทามิก (Glutamin) อิสระมากที่สุด ส่วนตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 มีปริมาณกรดอะมิโนกลูทามิกอิสระมากกว่าตัวอย่างควบคุม ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ให้รสชาติ Umami ในผลิตภัณฑ์ ดังนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไม่เพียงแต่เร่งกระบวนการหมักแต่ยังให้ผลิตผลเป็นกรดอะมิโนที่มีผลต่อรสชาติ Umami อีกด้วย กรดอะมิโนอิสระอาร์จีนีน (Arginine) ในตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมดมีค่าสูงกว่าในตัวอย่างทางการค้า กรดอะมิโนอาร์จีนีนเป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของปลา ปลาที่มีคุณภาพความสดต่ำจะมีอาร์จีนีนต่ำด้วย เนื่องจากอาร์จีนีนจะถูกเอนไซม์ในจุลินทรีย์เปลี่ยนไปเป็น Ornithin และ Putrescine ในที่สุด ปลาที่ใช้ในการทดลองมีคุณภาพความสดสูงกว่าปลาที่ใช้ในโรงงาน ปริมาณอาร์จีนีนอิสระจึงมีค่าสูงกว่า

ตารางที่ 4.6 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (Free amino acid, มก./100 มล.) ในตัวอย่างน้ำปลาที่หมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 6 เดือน และหมักทางการค้าเป็นเวลา 12 เดือน

Amino acid	Control	*T. halophilus* MS33	*T. halophilus* MCD10-5-10	Commercial
Aspartic acid	550.47	592.82	592.94	590.15
Threonine	527.68	570.9	563.21	515.35
Serine	418.24	303.06	284.78	388.16
Glutamic acid	906.91	981.24	970.83	1035.50
Proline	846.64	988.08	924.43	526.80
Glycine	211.94	235.72	236.25	322.83
Alanine	362.95	714.37	705.56	698.39
Valine	701.49	756.22	744.78	649.79
Methionine	255.56	263.53	268.09	254.56
Isoleucine	405.63	433.66	416.06	376.38
Leucine	479.18	513.62	482.41	489.63
Tyrosine	89.23	96.1	86.32	81.59
Phenylalanine	398.72	427.57	417.67	354.42
Histidine	910.92	988.91	973.76	316.09
Lysine	361.78	385.26	386.13	971.35
Arginine	696.41	405.73	421.88	5.11
Total	8123.74	8656.79	8475.08	7576.10

เมื่อพิจารณาปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด (Total amino) จะพบว่าปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 มีค่าสูงกว่าตัวอย่างน้ำปลาที่หมักในห้องปฏิบัติการ แต่น้อยกว่าตัวอย่างทางการค้าที่หมักเป็นเวลา 12 เดือน (ตารางที่ 4.7) โดยปริมาณกรดอะมิโนอิสระมีค่าใกล้เคียงกับกรดอะมิโนทั้งหมด ซึ่งบ่งชี้ว่ากรดอะมิโนที่อยู่ในตัวอย่างที่เติม *T. halophilus* MS33 อยู่ในรูปอิสระ ในขณะที่ตัวอย่างทางการค้าจะมีค่ากรดอะมิโนทั้งหมดสูงกว่ากรดอะมิโนอิสระ ซึ่งหมายถึงกรดอะมิโนที่อยู่ในน้ำปลาที่หมักทางการค้าจะดำรงอยู่ในรูปเพปไทด์ ซึ่งอาจไม่เป็นผลดีต่อเสถียรภาพของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากเพปไทด์มีแนวโน้มที่จะรวมตัวกันเป็นตะกอน ตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 มีปริมาณกรดอะมิโนโพรลีน (Proline) และไลซีน (Lysine) สูงกว่าตัวอย่างควบคุม

ตารางที่ 4.7 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด (Total amino acid, มก./100 มล.) ในตัวอย่างน้ำปลาที่หมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 6 เดือนและหมักทางการค้าเป็นเวลา 12 เดือน

Amino acid	Control	*T. halophilus* MS33	*T. halophilus* MCD10-5-10	Commercial
Aspartic acid	669.2	695.49	688.05	650.31
Threonine	443.05	447.28	445.62	529.48
Serine	389.92	353.65	316.32	471.46
Glutamic acid	926.77	1350.71	986.55	1244.64
Proline	570.06	729.74	575.88	510.56
Glycine	381.08	371.6	383.79	367.93
Alanine	487.07	486.01	493.93	494.35
Valine	443.92	489.23	448.6	644.88
Methionine	306.26	331.69	309.26	414.62
Isoleucine	423.46	449.31	422.94	535.57
Leucine	460.74	523.57	454.59	757.62
Tyrosine	97.06	169.44	91.3	418.08
Phenylalanine	430.05	572.8	460.13	815.78
Histidine	457.86	479.92	461.55	565.31
Lysine	607.13	752.16	738.23	778.21
Arginine	645.01	457.09	414.52	533.41
Total	7738.64	8659.68	7691.25	9732.21

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างน้ำปลาทางการค้าที่หมักโดยวิธีแบบดั้งเดิมมีปริมาณกรดอะมิโนกลูทามิก (Glutamin) วาลีน (Valine) ลูซีน (Leucine) ไทโรซีน (Tyrosine) และฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) สูงกว่าตัวอย่างอื่น (ตารางที่ 4.7) โดยกรดอะมิโนไทโรซีน และ ฟีนิลอะลานีน เป็นกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำและเป็นสาเหตุของการเกิดตะกอนเพปไทด์ในน้ำปลา จากการทดลองนี้พบว่าการใช้กล้าเชื้อโดยเฉพาะในกลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถปรับปรุงคุณภาพของกรดอะมิโนในน้ำปลาได้

เมื่อวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นรสจากน้ำปลาที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติกในเดือนที่ 6 พบว่าสารระเหยที่วิเคราะห์ได้จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบของอัลดีไฮด์ คีโตน และแอลกอฮอล์ สารระเหยในกลุ่มอัลดีไฮด์ที่พบคือ 2-Methylpropanal, 2-Methylbutanal, 3-Methylbutanal, 3-(Methylthio)-propanal และ Benzaldehyde (ตารางที่ 4.8) มีรายงานว่าสารประกอบ 2-Methylpropanal และ 2-Methylbutanal ให้กลิ่น "Meaty" ในน้ำปลา (Peralta et al., 1996; Fukami et al., 2002) ตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ 2 ไอโซเลท มีปริมาณของสารประกอบ 2-Methylbutanal, 3-Methylbutanal และ Benzaldehyde ไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุม ($p>0.05$) เมื่อพิจารณาถึงปริมาณแอลฟาอะมิโนของตัวอย่างที่มีการเติมแบคทีเรียไอโซเลท MS33 พบว่ามีปริมาณแอลฟาอะมิโนเพิ่มมากขึ้น (ตารางที่ 4.3) ซึ่งน่าจะส่งผลถึงการเพิ่มขึ้นของสารประกอบที่ให้กลิ่นรส เนื่องจากแบคทีเรียกรดแล็กติกใช้เพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระในการผลิตสารประกอบที่ให้กลิ่นรส (Law and Haandrikman, 1995; Magboul and McSweeney, 1999) ส่วนสารระเหยในกลุ่มคีโตนที่พบได้แก่ 2-Butanone, 3-Methyl-2-butanone, 2,3-Butanedione และ Cyclohexanone ซึ่งให้กลิ่นเนยแข็ง (Cheesy) ในน้ำปลา (Peralta et al., 1996) ไม่ได้มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม และมีค่าน้อยกว่าตัวอย่างที่หมักทางการค้าเป็นเวลา 12 เดือน Shimoda et al. (1996) รายงานถึงสารประกอบ Volatile fatty acids ที่เกี่ยวข้องกับการให้กลิ่น "Cheesy" ที่พบในน้ำปลา ได้แก่ Acetic acid, Propanoic acid, 2-Methylpropanoic acid, Butanoic acid และ 3-Methylbutanoic acid โดย 2-Methylpropanoic acid เป็นสารหลักที่ให้กลิ่นดังกล่าว แต่จากการวิเคราะห์สารประกอบที่ให้กลิ่นรสของน้ำปลาที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก ไม่พบสารประกอบในกลุ่ม Volatile fatty acids ส่วนสารประกอบแอลกอฮอล์ที่พบในตัวอย่างน้ำปลา ได้แก่ Ethanol, 1-Propanol, 2-Methyl-1-propanol, 1-Butanol, 1-Penten-3-ol, 1-Penten-3-ol, 3-Methyl-1-butanol และ 1-Pentanol แต่ยังไม่มีการรายงานถึงบทบาทของแอลกอฮอล์ต่อการให้กลิ่นรสของน้ำปลา จากการรับรู้ (Perception) ของชาวต่างประเทศหรือผู้ที่ไม่คุ้นเคยกับน้ำปลา จะให้ความเห็นว่าน้ำปลามีกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์ ซึ่งสารที่ให้กลิ่นดังกล่าว คือ Dimethyl disulfide ซึ่งให้กลิ่นอุจจาระ (Fecal note) ตัวอย่างน้ำปลาที่หมักจากโรงงานเป็นเวลา 12 เดือน มีสารดังกล่าวสูงกว่าตัวอย่างจากห้องปฏิบัติการ นอกจากน้ำปลาที่เติมแบคทีเรีย *T. halophilus* มีปริมาณ Dimethyl disulfide น้อยกว่าตัวอย่างควบคุม ($p<0.05$, ตารางที่ 4.8) โดยไม่พบ

สารประกอบ Dimethyl disulfide ในตัวอย่างน้ำปลาที่เติมไอโซเลท MCD10-5-10 จึงเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกมีผลช่วยลดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำปลาเพื่อให้กลิ่นที่เป็นที่ยอมรับในผู้บริโภคทั้งชาวไทยและต่างประเทศมากขึ้น

ตารางที่ 4.8 ปริมาณสารระเหยสัมพัทธ์กับสารมาตรฐานภายในของน้ำปลาหมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 6 เดือน เทียบกับตัวอย่างทางการค้าที่หมักเป็นเวลา 12 เดือน

RI*	Compounds	Relative peak area**			
		Commercial	Control	*T. halophilus* MS33	*T. halophilus* MCD10-5-10
	Alcohols				
1022	Ethanol	0.065[a]	0.040[b]	0.072[a]	ND
1041	2-Butanol	0.063[a]	0.001[b]	0.001[b]	0.001
1049	1-Propanol	1.094[a]	0.011[b]	0.006[b]	ND
1110	2-Methyl-1-propanol	0.062[a]	0.002[b]	0.004[b]	ND
1172	3-Pentanol	0.035[a]	ND	ND	0.002[b]
1188	2-Pentanol	0.005	ND	ND	ND
1185	1-Butanol	0.128[a]	0.026[b]	0.027[b]	0.027[b]
1193	1-Penten-3-ol	0.214[a]	0.061[b]	0.045[b]	ND
1205	3-Methyl-1-butanol	0.024[a]	0.001[c]	0.010[b]	ND
1255	1-Pentanol	0.014[a]	0.007[b]	0.004[b]	0.003[b]
1327	(*E*)-2-Penten-1-ol	0.010	0.004	ND	0.008
1336	(*Z*)-2-Penten-1-ol	0.027[a]	0.003[b]	0.005[b]	0.009[b]
1444	2-Ethyl-1-hexanol	0.001	0.003	0.002	0.003
	Aldehydes				
784	Propanal	0.511	ND	ND	ND
830	2-Methylpropanal	0.017[c]	ND	0.065[b]	0.076[b]
906	2-Methylbutanal	0.591[a]	0.220[b]	0.245[b]	0.227[b]
911	3-Methylbutanal	0.292[a]	0.232[a]	0.255[a]	0.073[c]
1104	2-Methyl-2-butenal	0.179	ND	ND	ND
1615	3-(Methylthio) propanal	0.051	0.015	0.019	0.016
1459	Benzaldehyde	0.025	0.014	0.023	0.028

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

RI*	Compounds	Relative peak area**			
		Commercial	Control	*T. halophilus* MS33	*T. halophilus* MCD10-5-10
	Ketones				
888	2-Butanone	0.894[a]	0.312[b]	0.270[b]	0.009[c]
929	3-Methyl-2-butanone	0.075[a]	0.020[b]	0.008[c]	ND
980	2-Pentanone	0.017	ND	ND	ND
1050	2,3-Butanedione	0.006	0.008	0.003	ND
1315	Cyclohexanone	0.117[a]	0.046[b]	0.043[b]	0.046[b]
	Esters				
863	Ethyl acetate	0.146[a]	0.006[b]	ND	0.121[a]
	Sulfur-contaning compounds				
818	Dimethyl sulfide	0.002	ND	ND	ND
1120	Dimethyl disulfide	0.075[a]	0.038[b]	0.013[c]	ND
	Nitrogen-containing compounds				
1176	Methylpyrazine	0.009	0.005	0.003	0.005
1377	2,6-Dimethyl pyrazine	0.008	0.001	0.002	ND

ND = Not detected.

Different superscripts indicate significant differences in the same row ($p<0.05$).

*Retention indices calculated for DB-WAX column using n-alkanes as standards.

**The values represent the ratio of the peak area of any compound to that of internal standard (cyclohexanol).

เมื่อทดสอบความชอบโดยผู้ทดสอบจากสถานประกอบการ พบว่าผู้ทดสอบชอบสีของน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อเทียบเท่ากับน้ำปลาทางการค้าที่หมัก 12 เดือน และตัวอย่างควบคุม ($p>0.05$, ตารางที่ 4.9) แม้ว่ากลิ่นของตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียจะมีกลิ่นที่อ่อนกว่า แต่คะแนนความชอบกลิ่นรสของตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อไม่แตกต่างจากน้ำปลาทางการค้า และตัวอย่างควบคุม ($p>0.05$) เนื่องจากผู้ทดสอบมีความคุ้นเคยกับกลิ่นน้ำปลาแบบดั้งเดิม (ทางการค้า) ผู้ทดสอบบางคนให้ความเห็นว่าน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียมีกลิ่นที่อ่อนกว่าน้ำปลาทางการค้า เมื่อพิจารณาถึงกลิ่นรสและความชอบโดยรวม พบว่าคะแนนของกลิ่นรสและความชอบโดยรวมของตัวอย่างน้ำปลาที่เติมแบคทีเรียกรดแล็กติก *T.*

halophilus MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 ไม่แตกต่างจากน้ำปลาทางการค้า และตัวอย่างควบคุม ($p>0.05$)

ตารางที่ 4.9 คะแนนความชอบต่อตัวอย่างน้ำปลาเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก *T. halophilus* ที่หมักเป็นเวลา 6 เดือน เทียบกับตัวอย่างทางการค้าที่หมักเป็นเวลา 12 เดือน

Samples	Attributes			
	Color	Odor	Flavor	Overall acceptance
Commercial	5.45 ± 1.04	4.73 ± 1.74	4.73 ± 1.35^{a}	4.91 ± 1.38
Control	4.82 ± 0.40	4.27 ± 1.01	3.55 ± 0.82^{b}	4.09 ± 0.94
MS33	4.82 ± 0.60	4.00 ± 1.18	3.64 ± 1.36^{ab}	4.27 ± 1.10
MCD10-5-10	4.82 ± 0.60	4.18 ± 1.08	3.91 ± 1.22^{ab}	4.36 ± 1.12

Acceptance score: 7 = extremely like; 4 = neither like nor dislike; 1 = extremely dislike.

Different superscripts indicate significant difference in the same column ($p<0.05$).

4.3 การหมักน้ำปลาโดยใช้กล้าเชื้อจากแบคทีเรียกรดแล็กติกร่วมกับการใช้โปรติเนสจากปลากะตัก

แม้ว่าการศึกษาในหัวข้อ 4.1 พบว่าการบ่มปลากะตักที่ 50 องศาเซลเซียส ที่เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% มีผลต่อการเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองสูงสุด แต่ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าการบ่มที่อุณหภูมิสูงมีผลต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ในระยะยาว อีกทั้งการใช้อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นกระบวนการที่ต้องใช้พลังงานในกระบวนการผลิต หากสามารถลดอุณหภูมิลงได้แม้เพียง 1-2 องศาเซลเซียส จะทำให้ลดการใช้พลังงานลงมาก จึงได้ศึกษาเปรียบเทียบอุณหภูมิระหว่าง 40 และ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่าการย่อยสลายตัวเองของปลากะตักที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% ยังคงมีค่าสูงกว่าที่ 40 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.10) แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาปริมาณฮีสตามีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่าง พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ส่งผลให้เกิดการสะสมของฮีสตามีนสูงกว่าที่ 40 องศาเซลเซียส โดยมีค่าฮีสตามีนในช่วง 28.78-33.47 มิลลิกรัม/100 กรัม ซึ่งเกินค่ามาตรฐาน (20 มิลลิกรัม/100 กรัม) ของประเทศแคนาดา (CFIA, 2003) ดังนั้นจึงเลือกใช้สภาวะในการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เป็นสภาวะในการเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองในการหมักน้ำปลา

ตารางที่ 4.10 ระดับการย่อยสลายตัวเองของปลากะตักเมื่อบ่มที่ 40 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

Incubation temperature (°C)	NaCl (%)	TCA-soluble oligopeptide	
		Tyrosine (μmol/g sample)	α-Amino content (μmol/g sample)
40	10	1.20[c]	8.80[b]
	15	0.90[d]	6.15[d]
50	10	1.86[a]	10.40[a]
	15	1.47[b]	8.13[c]

Letters indicate significant difference in the same column ($p<0.05$).

4.3.1 ผลการเติมกล้าเชื้อในกระบวนการหมักน้ำปลา

ก. การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ที่ตรวจนับด้วยอาหาร PCA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 15% ซึ่งเป็นการตรวจนับประชากรแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง (Moderate holophiles) ที่ต้องการอากาศ พบว่าในช่วงเริ่มต้นของการหมักตัวอย่างควบคุมมีเชื้อประจำถิ่นอยู่เพียงเล็กน้อยคือ 2-3 Log CFU/มิลลิลิตร และตรวจไม่พบในตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก (ตารางที่ 4.11) นอกจากนี้ยังตรวจไม่พบประชากรแบคทีเรียกรดแล็กติกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ในตัวอย่างควบคุมไม่ว่าจะบ่มหรือไม่บ่มตัวอย่างก่อนการหมัก ส่วนตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกมีประชากรแบคทีเรียกรดแล็กติกอยู่ประมาณ 7 Log CFU/มิลลิลิตร ปริมาณเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในเดือนที่ 2 ของการหมักในทุกตัวอย่าง เนื่องจากจำนวนเชื้อที่ตรวจนับได้ด้วยอาหาร PCA ที่เติมเกลือ 15% เพิ่มขึ้นเป็น 5-6 Log CFU/มิลลิลิตร ประชากรกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกมีแนวโน้มลดลงประมาณ 2-3 Log CFU/มิลลิลิตร ในเดือนที่ 2 ของการหมักเช่นกัน นอกจากนี้ตรวจไม่พบแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียกรดแล็กติกหลังจากเดือนที่ 3-7 ในตัวอย่างที่ไม่บ่ม ส่วนตัวอย่างที่บ่มก่อนเติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD10-5-10 พบการคงอยู่ของแบคทีเรียกรดแล็กติก 5-7 Log CFU/มิลลิลิตร ในเดือนที่ 3 และไม่พบประชากรแบคทีเรียหลังจากนั้น ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าการบ่มปลาก่อนการหมักที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการคงอยู่ของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก แม้ว่าตัวอย่างดังกล่าวจะมีปริมาณเพปไทด์และกรดอะมิโนสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้บ่มก็ตาม

ตารางที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงของ**จุลินทรีย์ในช่วง** 3 เดือนแรกของการหมัก ในตัวอย่างน้ำปลาบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส **ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น** 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และไม่บ่ม โดยหมักด้วยกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD10-5-10 และ *T. halophilus* MS33

Fermentation time (month)	Sample	Condition	Bacteria counts (Log CFU/mL) PCA	MRS
0	Control	Incubation at 40°C, 10%NaCl, 4h	2.77	ND
	MCD10-5-10		ND	7.11
	MS33		ND	7.00
	Control	No incubation	3.22	ND
	MCD10-5-10		ND	7.10
	MS33		ND	6.94
2	Control	Incubation at 40°C, 10%NaCl, 4h	5.26	4.94
	MCD10-5-10		5.88	5.15
	MS33		5.46	5.15
	Control	No incubation	5.34	4.63
	MCD10-5-10		5.57	5.20
	MS33		5.57	4.80
3	Control	Incubation at 40°C, 10%NaCl, 4h	1.48	1.48
	MCD10-5-10		ND	5.75
	MS33		ND	ND
	Control	No incubation	ND	ND
	MCD10-5-10		ND	ND
	MS33		ND	ND

ND = Not detected.

ข. การเปลี่ยนแปลงทางเคมี

เมื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณโอลิโกเพปไทด์ในรูปไทโรซีนในตัวอย่างปลาที่ผ่านการบ่ม และไม่บ่มก่อนการหมักปลา **พบว่าปริมาณ**โอลิโกเพปไทด์รูปไทโรซีนมีแนวโน้มลดลงจาก

เดือนแรก ($p<0.05$, รูปที่ 4.11a, 4.12a) ตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD10-5-10 ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง มีปริมาณโอลิโก-เพปไทด์สูงสุดในเดือนแรกของการหมัก ซึ่งแสดงถึงการย่อยสลายโปรตีน ($p<0.05$, รูปที่ 3.11a) ในขณะที่ตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 ที่ไม่ผ่านการบ่ม มีปริมาณโอลิโกเพปไทด์สูงกว่าชุดทดลองที่ผ่านการบ่ม ($p<0.05$, รูปที่ 4.12a) ปริมาณไทโรซีนของทุกตัวอย่างใกล้เคียงกันในแต่ละช่วงเวลาของการหมัก ปริมาณโอลิโกเพปไทด์ในรูปไทโรซีนอาจไม่ใช่ดัชนีที่ดีในการบ่งบอกระดับการย่อยของโปรตีนในระบบการหมัก หากเพปไทด์ที่ถูกปลดปล่อยไม่มีกลุ่มไทโรซีน ปริมาณโอลิโกเพปไทด์จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Lowry จะไม่เพิ่มขึ้น

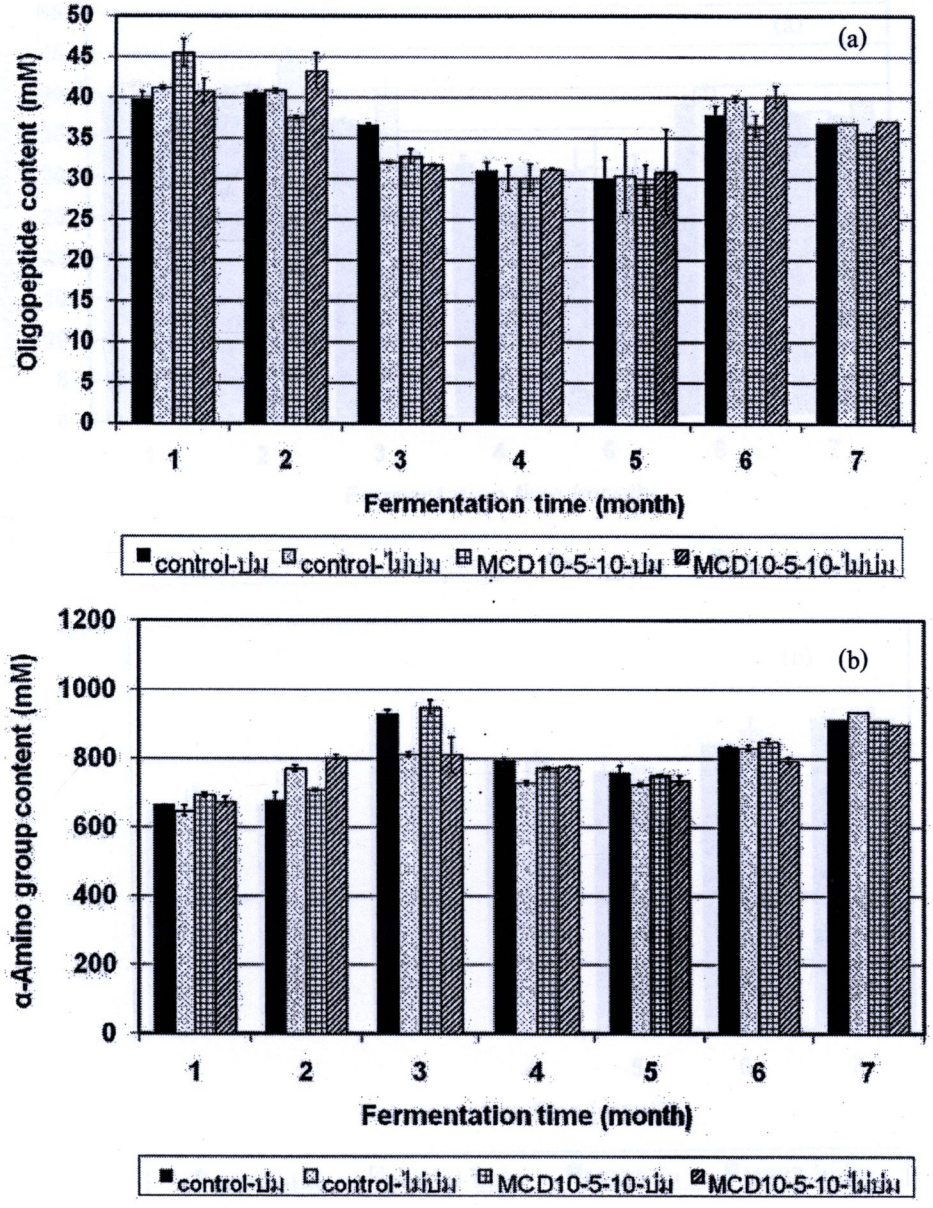
ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α-Amino group) ซึ่งแสดงถึงการย่อยสลายของโปรตีนมีค่าเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักในทุกตัวอย่างจากเดือนแรก ($p<0.05$, รูปที่ 4.11b, 4.12b) ตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD10-5-10 (ที่ผ่านการบ่ม และไม่บ่ม) และตัวอย่างบ่มที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 มีปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนสูงกว่าตัวอย่างควบคุมและมากกว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่ผ่านการบ่มก่อนการหมักในช่วง 3 เดือนแรก ($p<0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเติมกล้าเชื้อในตัวอย่างที่ผ่านการบ่มมีผลเร่งการย่อยสลายโปรตีนในช่วงต้น (3 เดือนแรก) ของการหมักมากกว่าการเติมกล้าเชื้อในตัวอย่างที่ไม่ได้บ่ม เมื่อหมักครบ 7 เดือน ยังพบว่าตัวอย่างที่ผ่านการบ่มก่อนการเติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 มีค่าปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ผ่านการบ่ม ($p<0.05$, รูปที่ 4.11b) ซึ่งยืนยันว่าการเหนี่ยวนำในปลาให้เกิดการย่อยสลายตัวเองที่ 40 องศาเซลเซียส ก่อนการเติมกล้าเชื้อส่งผลให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนในช่วงการหมัก อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมกลับพบว่าตัวอย่างบ่มมีค่าปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนต่ำกว่าตัวอย่างที่ไม่บ่มก่อนการหมัก แสดงให้เห็นว่าการเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองก่อนการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะมีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนปลาในระบบการหมักในระยะยาว โดยการบ่มที่อุณหภูมิดังกล่าวอาจมีผลต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ ส่งผลให้ระดับการย่อยสลายโปรตีนมีค่าต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้บ่ม ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในระบบการหมักน้ำปลาของตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 สูงกว่า *T. halophilus* MCD10-5-10 เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างควบคุมที่บ่มและตัวอย่างบ่มที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 พบว่าตัวอย่างบ่มที่เติมกล้าเชื้อมีค่าสูงกว่า แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการย่อยโปรตีนของกล้าเชื้อนี้ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้บ่มพบว่าตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 มีค่าต่ำกว่า จากที่กล่าวมาข้างต้น การบ่มมีแนวโน้มลดกิจกรรมของโปรติเนสในปลา และอาจทำลายเชื้อประจำถิ่นบางส่วน ส่งผลให้ระดับการย่อยลดลง ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าการเหนี่ยวนำปลาให้เกิดการย่อยสลายตัวเองที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อาจไม่เป็นผลดีต่อกระบวนการหมักน้ำปลาในระยะยาว แต่หากมีการเติมกล้าเชื้อใน

กระบวนการหมัก การเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองก่อนการหมักจะส่งผลให้การย่อยสลายโปรตีนของระบบการหมักดีกว่าการไม่ได้เหนี่ยวนำ

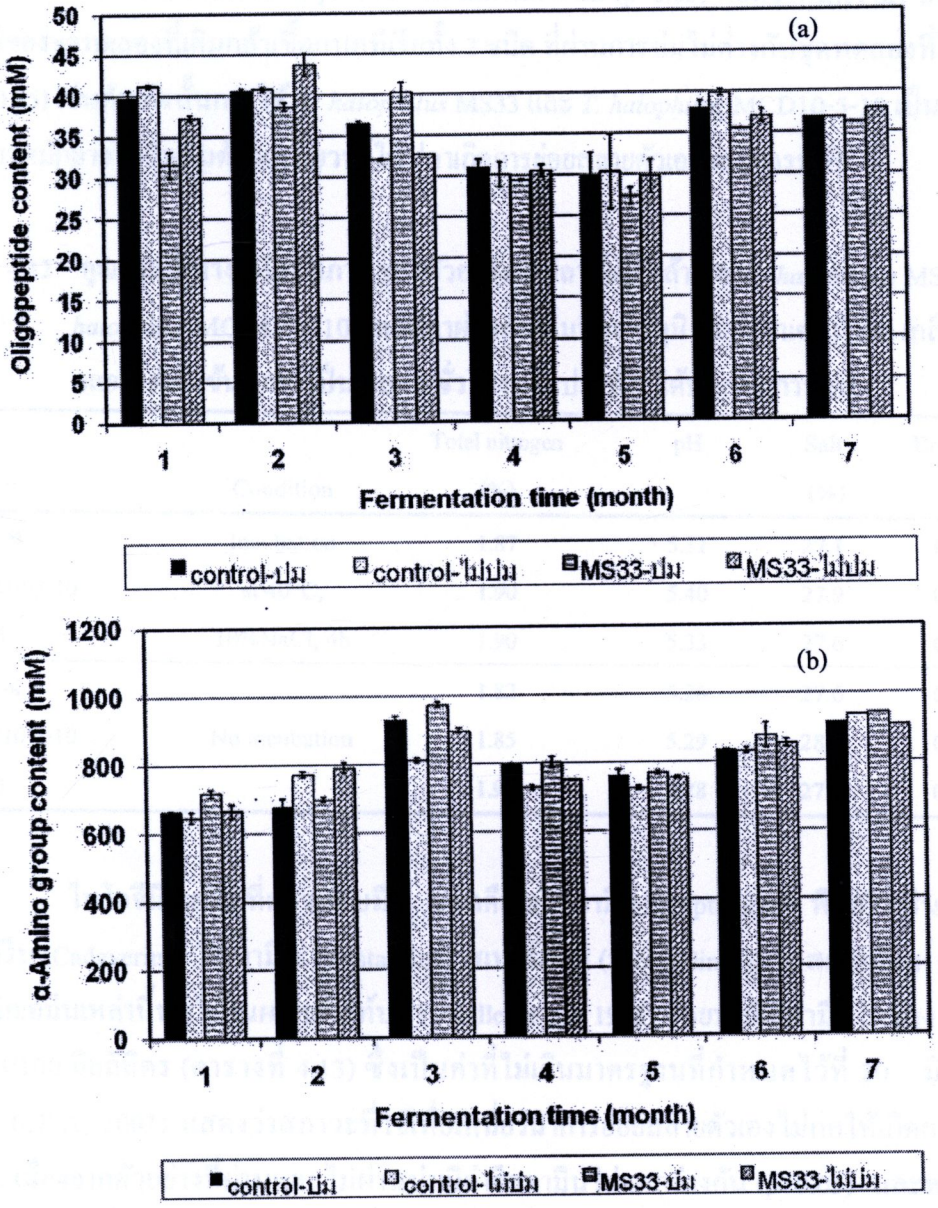
การเติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย *T. halophilus* MS33 ลงในตัวอย่างที่ผ่านการเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองก่อนการหมัก มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนได้สูงกว่า *T. halophilus* MCD10-5-10 การเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองก่อนการหมักมีผลเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายโปรตีนของกล้าเชื้อแบคทีเรีย *T. halophilus* MS33 แต่ไม่มีผลต่อการย่อยโปรตีนของกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD10-5-10 จะเห็นได้ว่าเชื้อต่างสายพันธุ์มีปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการสร้างโปรติเนสที่ต่างกัน ดังนั้นการใช้ *T. halophilus* MS33 เป็นกล้าเชื้อควรจะใช้ในระบบการหมักที่ปลาได้ผ่านการย่อยมาแล้วในระดับหนึ่ง ซึ่งจะทำให้ระดับการย่อยโปรตีนของปลามีค่าสูงเมื่อการหมักเสร็จสมบูรณ์ การเพิ่มขึ้นของแอลฟาอะมิโนอาจมีผลต่อการสร้างสารระเหยที่ให้กลิ่นรสในน้ำปลาได้อีกด้วย เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของแอลฟาอะมิโนแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของเพปไทด์สายสั้น และกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสได้ (Law and Haandrikman, 1995; Magboul and McSweeney, 1999)

ส่วนการหมักแบบไม่เติมกล้าเชื้อนั้น การบ่มปลาเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายตัวเองก่อนการหมักไม่ได้เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายในกระบวนการหมักอย่างที่เข้าใจกัน ดังจะเห็นได้ว่าการบ่มปลาก่อนการหมักไม่ได้ส่งผลให้ปริมาณแอลฟาอะมิโนสูงในเดือนที่ 7 เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านการบ่ม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส มีผลลดเสถียรภาพของเอนไซม์ในตัวปลา ซึ่งอาจไม่เร่งกระบวนการย่อยโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักในระยะยาว Orejana and Liston (1982) พบว่า Serine proteinase ประเภท Trypsin-like proteinase จากตัวปลามีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายโปรตีนโดยเฉพาะในระยะ 1 เดือนแรกของการหมัก Gildberg and Shi (1994) รายงานว่า กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินในน้ำปลาที่หมักจากเครื่องใน (Vicera) ของปลาคอด (Cod) นั้นลดลงอย่างต่อเนื่องนับจากวันเริ่มต้นของการหมัก และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ในวันที่ 25 ของการหมัก การย่อยสลายอย่างรวดเร็วนั้นเกิดจากเอนไซม์ในตัวปลาในกลุ่ม Cathepsins จะเห็นได้ว่าการย่อยสลายโดยเอนไซม์ในตัวปลามีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการหมักน้ำปลาโดยเฉพาะในระยะเวลาเริ่มต้นของการหมัก

เมื่อพิจารณาคุณสมบัติทางเคมีทั่วไปของน้ำปลาในเดือนที่ 7 (ตารางที่ 4.12) ไนโตรเจนรวมทั้งหมดซึ่งเป็นค่าที่บ่งชี้ปริมาณโปรตีนไนโตรเจนและสารประกอบที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น แอมโมเนีย กรดอะมิโนอิสระ นิวคลีโอไทด์ ยูเรีย และไตรเมทิลามีน (Trimethylamine, TMA) ซึ่งพบว่าปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดของชุดทดลองที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท ที่ผ่านการบ่มไม่ต่างกับชุดทดลองที่ไม่ผ่านการบ่ม ($p>0.05$) นอกจากนี้ค่า pH ปริมาณเกลือ และค่าสีของชุดทดลองที่เติมกล้าเชื้อทั้ง



รูปที่ 4.11 ปริมาณโอลิโกเพปไทด์ในรูป (a)ไทโรซีน และ (b)กลุ่มแอลฟาอะมิโน (α-Amino group content) ในตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD10-5-10 โดยปลาผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และปลาที่ไม่ผ่านการบ่มก่อนการหมักน้ำปลา ที่ระยะเวลาต่างๆ



รูปที่ 4.12 ปริมาณโอลิโกเพปไทด์ในรูป (a)ไทโรซีน และ (b)กลุ่มแอลฟาอะมิโน (α-Amino group content) ในตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 โดยปลาผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และปลาที่ไม่ผ่านการบ่มก่อนการหมักน้ำปลา ที่ระยะเวลาต่างๆ

2 ไอโซเลท ที่ผ่านการบ่มไม่ต่างกับชุดทดลองที่ไม่ผ่านการบ่ม ($p>0.05$) นอกจากนี้ค่า pH ปริมาณเกลือ และค่าสีของชุดทดลองที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ที่ผ่านการบ่มไม่ต่างกับชุดทดลองที่ไม่ผ่านการบ่ม ($p>0.05$) เช่นกัน ดังนั้นการใช้ *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 เป็นกล้าเชื้อในระบบการหมักอาจไม่จำเป็นต้องเหนี่ยวนำให้ปลาเกิดการย่อยสลายตัวเองก่อนการหมัก

ตารางที่ 4.12 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 โดยปลาผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และปลาที่ไม่ได้บ่มก่อนการหมัก

Sample	Condition	Total nitrogen (%)	pH	Salt (%)	Browning index
Control	Incubation at 40°C, 10%NaCl, 4h	1.87	5.31	27.1	0.674
MCD10-5-10		1.90	5.40	27.9	0.721
MS33		1.90	5.33	27.6	0.682
Control	No incubation	1.82	5.26	27.6	0.702
MCD10-5-10		1.85	5.29	28.7	0.720
MS33		1.91	5.28	27.4	0.716

ไบโอจีนิกเอมีนที่ตรวจพบมี 6 ชนิดคือ ทริปตามีน (Tryptamine) พิวทรีสซีน (Putrescine) คาดาเวอรีน (Cadaverine) ฮีสตามีน (Histamine) สเปอร์มิดีน (Spermidine) และ สเปอร์มีน (Spermidine) ไบโอจีนิกเอมีนเหล่านี้พบได้ในผลิตภัณฑ์ปลา (Malle et al., 1996) โดยพบฮีสตามีนในช่วง 12.91-16.22 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร (ตารางที่ 4.13) ซึ่งเป็นค่าที่ไม่เกินมาตรฐานที่กำหนดไว้ที่ 20 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร (CFIA, 2003) แสดงว่าสภาวะที่ใช้เพื่อเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองไม่ก่อให้เกิดการสะสมของฮีสตามีน เนื่องจากตัวอย่างที่ผ่านและไม่ผ่านบ่มมีค่าฮีสตามีนไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) และพบว่าตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD10-5-10 (ที่ผ่านและไม่ผ่านการบ่มก่อนการหมัก) และ *T. halophilus* MS33 ที่ผ่านการบ่มก่อนการหมักมีปริมาณฮีสตามีนสูงกว่าตัวอย่างน้ำปลาที่เติม *T. halophilus* MS33 ที่ไม่ผ่านการบ่ม และตัวอย่างควบคุม ($p<0.05$) การปนเปื้อนของฮีสตามีนในอาหารสามารถทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษได้ (Taylor, 1986) ปริมาณฮีสตามีนต่ำ (น้อยกว่า 5 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) ถือเป็นสิ่งปกติที่พบได้ในอาหาร ส่วนปริมาณฮีสตามีนที่สูงกว่า 100 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร จะทำให้ผู้บริโภคมีอาการอาหารเป็นพิษรุนแรงได้ นอกจากนี้ยังพบว่าไบโอจีนิกเอมีนบางชนิด เช่น พิวทรีสซีน และ คาดาเวอรีน มีผลเสริมความรุนแรงของฮีสตามีนด้วย (Taylor, 1986) แต่พิวทรีสซีน และ คาดาเวอรีน ในการศึกษานี้ไม่มี

ความแตกต่างกัน ($p>0.05$) แสดงว่าสภาวะการบ่มที่เติมและไม่เติมกล้าเชื้อไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณไบเจนิกเอมีนทั้ง 2 ชนิด ปริมาณทริปตามีนพบในตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 ที่ผ่านการบ่มมีค่าน้อยที่สุด (6.49 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) ส่วนปริมาณพิวทรีสซีน สเปอร์มิดีน และ สเปอร์มีน ในทุกตัวอย่างไม่ต่างกัน ($p>0.05$)

ตารางที่ 4.13 ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนของตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 โดยปลาผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และปลาที่ไม่ได้บ่มก่อนการหมัก

Sample	Condition	Biogenic amines content (mg/100 ml)					
		Tryptamine	Putrescine	Cadaverine	Histamine	Spermidine	Spermine
Control	Incubation	10.29^{ab}	1.95	4.15^{b}	13.43^{b}	1.45	0.29
MCD10-5-10	at 40°C,	11.67^{a}	2.52	4.27^{b}	15.91^{a}	1.45	0.36
MS33	10%NaCl, 4h	6.49^{b}	2.20	4.19^{b}	16.22^{a}	1.73	0.50
Control	No	9.37^{ab}	2.16	5.92^{a}	13.29^{b}	1.36	0.30
MCD10-5-10	incubation	10.96^{ab}	1.83	3.84^{b}	14.99^{a}	1.52	0.46
MS33		10.49^{ab}	1.91	4.12^{b}	12.91^{b}	1.29	0.42

Letters indicate significant difference in the same column ($p<0.05$).