



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์สุขภาพบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

เทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชา

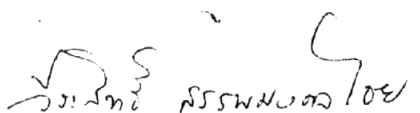
เรื่อง การศึกษาการผลิตและสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียทนเกลือเพื่อใช้ในการหมักน้ำปลา

Studies on Production and Characterization of Halophilic Lipase from Halotolerant Bacteria for Fish Sauce Fermentation

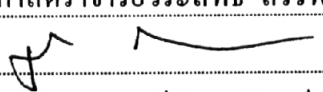
نامผู้วิจัย นายอนันต์ บุญปาน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

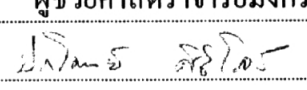
ประธานกรรมการ

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย, Ph.D.)

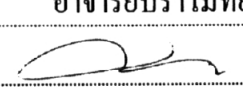
กรรมการ

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์มังกร โรจน์ประภากร, Ph.D.)

กรรมการ

( อาจารย์ปราโมทย์ ศิริโรจน์, D.Agr.Sci.)

หัวหน้าภาควิชา

( รองศาสตราจารย์สุรีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์วินัย อากงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 4 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2550

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาการผลิตและสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ
จากแบคทีเรียทนเกลือเพื่อใช้ในการหมักน้ำปลา

Studies on Production and Characterization of Halophilic Lipase
from Halotolerant Bacteria for Fish Sauce Fermentation

โดย

นายอนันต์ บุญปาน

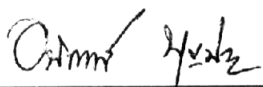
เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
พ.ศ. 2550

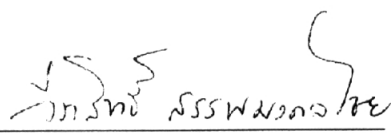
อนันต์ บุญปาน 2550: การศึกษาการผลิตและสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรีย
ทนเกลือเพื่อใช้ในการหมักน้ำปลา ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาวิชา
เทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประชานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์
วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย, Ph.D. 179 หน้า

จากการคัดเลือกแบคทีเรีย 20 ไอโซเลทที่แยกมาจากน้ำปลาดิบ เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิต
เอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง Sehgal and Gibbons Complex (SGC) ที่มี Tween 80 2.0 เปอร์เซ็นต์ และใน
อาหารเหลว SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3.0 โมลาร์ (18.0 เปอร์เซ็นต์)
พบว่า แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด คือ แบคทีเรียไอโซเลท PB233 เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
ไปทำการจัดจำแนกโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA กับ
แบคทีเรียสายพันธุ์อื่น พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท PB233 คือ *Staphylococcus warneri* และมีสมบัติเป็นแบคทีเรีย
ทนเกลือ (halotolerant bacteria) แบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดในสภาวะที่มีเกลือ
โซเดียมคลอไรด์ 3.0 โมลาร์ (18.0 เปอร์เซ็นต์) โดยมีการผลิตควบคู่ไปกับการเจริญและมีการผลิตเอนไซม์สูงสุด
เมื่อการเจริญอยู่ในระยะคงที่ การทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนโดยใช้เอทานอล
เจลดิลเตรนซ์ และโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ตรวจสอบความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี
อิเล็กโตรโฟเรซิสแบบ SDS-PAGE พบว่า เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ *S. warneri* PB233 มีน้ำหนัก
โมเลกุลประมาณ 45,000 ดาลตัน เอนไซม์ไลเปสที่ยังไม่บริสุทธิ์และที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วสามารถทำงาน
ได้ดีที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-9.0 และมีความเสถียรในช่วง
อุณหภูมิระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส เอนไซม์ไลเปสที่ยังไม่บริสุทธิ์และที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมีสมบัติ
เป็นเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ (halophilic lipase) โดยสามารถทำงานได้ดีที่สุดในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือ
โซเดียมคลอไรด์ 2.5 โมลาร์ (15.0 เปอร์เซ็นต์)

การทดลองหมักน้ำปลาโดยเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือร่วมกับการหมัก พบว่า การเติมเอนไซม์
ร่วมกับการหมักน้ำปลาจะทำให้ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ (acetic acid, propionic acid, isobutyric acid,
butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid) ซึ่งมีบทบาทต่อกลิ่นของน้ำปลาเพิ่มสูงขึ้นได้ ความเข้มข้นที่
เหมาะสมของเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือสำหรับการใช้ร่วมกับการหมักน้ำปลา คือ 1.0 เปอร์เซ็นต์ การทดลองหมัก
น้ำปลาโดยเติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือ 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์โปรติเอส (1.5 เปอร์เซ็นต์) จากแบคทีเรียชอบเกลือ
Halobacterium salinarum PB407 เอนไซม์โรโบนิวคลีเอส (0.5 เปอร์เซ็นต์) จากแบคทีเรียทนเกลือ
Pseudomonas sp. No. 3241 และเอนไซม์ไลเปส (1.0 เปอร์เซ็นต์) จากแบคทีเรียทนเกลือ *S. warneri* PB233
ลงไปร่วมกับการหมัก พบว่าปริมาณฟอสโมลโนโครเจน ในโครเจนทั้งหมด สารประกอบนิวคลีโอไทด์
5'-GMP และกรดไขมันที่ระเหยได้ของน้ำปลาที่เติมเอนไซม์จะมีปริมาณสูงกว่าน้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติ



ลายมือชื่อนิติ



ลายมือชื่อประธานกรรมการ

28 / 12 / 50

Anan Boonpan 2007: Studies on Production and Characterization of Halophilic Lipase from Halotolerant Bacteria for Fish Sauce Fermentation. Doctor of Philosophy (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Assistant Professor Werasit Sanpamongkolchai, Ph.D. 179 pages.

Twenty pure bacterial cultures isolated from raw Thai fish sauce were selected for lipase producing ability on Sehgal and Gibbons Complex (SGC) agar medium containing 2.0% Tween 80 and SGC liquid medium containing 1.0% olive oil, both media contained 3.0 M (18.0%) NaCl. The results showed that isolate PB233 could produce the highest lipase activity. This isolate was identified based on morphology, biochemical characteristics and 16S rRNA sequence database of other bacteria, it was classified as *Staphylococcus warneri*. This strain could grow in 0-4.0 M (0-24.0%) NaCl but the best growth was observed at 0 M NaCl, therefore, *S. warneri* PB233 could be grouped in halotolerant bacteria. A halotolerant *S. warneri* PB233 could produce the highest lipase activity in SGC liquid medium containing 1.0% olive oil and 3.0 M NaCl, a typical pattern of lipase production showed that enzyme secretion was coupled to active cell multiplication and maximum activity was obtained at stationary phase. Lipase was purified by ethanol precipitation, Sephadex G-100 gel filtration and DEAE Toyopearl 650M anion-exchange chromatography. The purity and molecular weight were determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The results showed that the molecular weight of lipase from halotolerant *S. warneri* PB233 was 45,000 Da. Crude and purified lipase were optimal at pH 7.0 and at temperature of 40 °C. They were stable between pH 7.0 and 9.0 and at temperatures between 30 and 40 °C. Crude and purified lipase had marked halophilic enzyme properties, showing maximal activities in the presence of 2.5 M (15.0%) NaCl.

Application of halophilic lipase to fish sauce fermentation was successful in these preliminary experiments. The results showed that increasing of halophilic lipase cause increasing of volatile fatty acids (acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid and valeric acid) that have been identified as aroma in fish sauce. The optimum halophilic lipase concentration that apply to fish sauce was 1.0%. In addition, the feasibility of making fish sauce by application of halophilic protease (1.5%) from *Halobacterium salinarum* PB407, halophilic ribonuclease (0.5%) from *Pseudomonas* sp. No. 3241 and halophilic lipase (1.0%) from *S. warneri* PB233 was studied. The results showed that halophilic enzymes added fish sauce contained significantly more formal nitrogen, total nitrogen, 5'-GMP and volatile fatty acids content compared to fish sauce without enzyme added.

Anan Boonpan

Student's signature

Werasit Sanpamongkolchai 28 June 07

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาในการทำวิทยานิพนธ์และการศึกษาระดับปริญญาเอกมาโดยตลอด ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มังกร โรจน์ประภากร กรรมการวิชาเอก ดร. ปราโมทย์ ศิริโรจน์ กรรมการวิชาการ และ ดร. สายพิน ทานัชนาสัย ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติมและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณศิรินาถ หลวงนรินทร์ สำหรับการช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านเป็นอย่างดีมาตลอด ขอขอบคุณ ดร. ปรียานุช บวรเรืองโรจน์ ที่กรุณาให้เชื่อแบคทีเรียสำหรับงานวิจัยและคำแนะนำต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่ได้ให้การช่วยเหลือด้านต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ พ่อ (ด.ต. อำนวย บุญปาน) พ.ต.ท. สมบัติ-พ.ญ. นันทกร-ค.ช. ปราบดา บุญปาน พ.ต.ต. สุทิน-คุณดวงเดือน-ค.ญ. เอื้ออังกูร มูลศิริ สำหรับการช่วยเหลือ ความห่วงใย กำลังใจ และการสนับสนุนที่มีให้ตลอดเวลา ขอขอบคุณ พ.ต.ท. สมบัติ บุญปาน สำหรับการสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการเรียนตลอดการศึกษา

ความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขออุทิศแด่คุณแม่อำนวย บุญปาน ผู้ที่เป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยและเสียสละทุก ๆ อย่างเพื่อการศึกษาของลูก ๆ

อนันต์ บุญปาน

มิถุนายน 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(8)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	40
อุปกรณ์	40
วิธีการ	41
ผลและวิจารณ์	55
สรุปและข้อเสนอแนะ	102
สรุป	102
ข้อเสนอแนะ	104
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	105
ภาคผนวก	117
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	118
ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ	122
ภาคผนวก ค การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	126
ภาคผนวก ง วิธีวิเคราะห์ทางเคมีและวิธีการทดลอง	129
ภาคผนวก จ ผลการทดลอง	152
ภาคผนวก ฉ การวิเคราะห์ทางสถิติ	172
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	179

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 มาตรฐานน้ำปลาเพื่อการบริโภคของกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 203) พ.ศ. 2543	12
2 มาตรฐานน้ำปลาเพื่อการผลิตของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม (มอก. 3-2536)	13
3 ค่า water activity (a_w) ต่ำที่สุดที่เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญได้	23
4 การใช้เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม	33
5 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง SGC ที่เติม Tween 80 ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์และเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-4.0 โมลาร์	56
6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท PB233	59
7 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% Similarity) ของลำดับเบส 16S rRNA ระหว่าง แบคทีเรียไอโซเลท PB233 และแบคทีเรียในกลุ่ม <i>Staphylococcus</i> sp.	61
8 ลำดับขั้นตอนการทำเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233 ให้บริสุทธิ์	81
9 ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจาก แบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการหมักเป็นเวลา 24 สัปดาห์	91
10 องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดกับน้ำปลาที่ได้ จากการเติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือร่วมกับการหมัก	101
 ตารางผนวกที่	
ง1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโปรตีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	136
จ1 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหาร เหลว SGC ที่เติมน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเกลือ NaCl ความเข้มข้น 2.0-3.0 โมลาร์	153

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
จ2 ผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อการเจริญของแบคทีเรีย <i>Staphylococcus warneri</i> PB233	154
จ3 ผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย <i>Staphylococcus warneri</i> PB233	155
จ4 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233 ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ	156
จ5 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร	157
จ6 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233	158
จ7 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233	158
จ8 ความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233 ที่พีเอชต่าง ๆ	159
จ9 ความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	159
จ10 ผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233	160
จ11 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233	160
จ12 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233	161
จ13 ความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233 ที่พีเอชต่าง ๆ	161

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
จ14 ความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	162
จ15 ผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233	162
จ16 ปริมาณ acetic acid ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการหมัก	163
จ17 ปริมาณ propionic acid ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการหมัก	164
จ18 ปริมาณ isobutyric acid ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการหมัก	165
จ19 ปริมาณ butyric acid ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการหมัก	166
จ20 ปริมาณ isovaleric acid ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการหมัก	167
จ21 ปริมาณ valeric acid ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการหมัก	168
จ22 ปริมาณเกลือที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่ไม่เติมและเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับการหมัก	169
จ23 พิเอชที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่ไม่เติมและเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับการหมัก	170
จ24 ระดับความขุ่นที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่ไม่เติมและเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับการหมัก	171
ฉ1 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ acetic acid ในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%	173

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ฅ2 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ propionic acid ในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%	173
ฅ3 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ isobutyric acid ในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%	173
ฅ4 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ butyric acid ในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%	174
ฅ5 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ isovaleric acid ในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%	174
ฅ6 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ valeric acid ในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%	174
ฅ7 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณฟอर्मอลในโตรเจนในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%	175
ฅ8 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%	175
ฅ9 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณ 5'-GMP ในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%	175

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
น10 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณเกลือในน้ำปลาที่เดิม เอนไซม์ที่ชอบเกลือชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%	176
น11 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของพีเอชในน้ำปลาที่เดิมเอนไซม์ที่ชอบ เกลือชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบ ความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%	176
น12 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของระดับความเข้มข้นในน้ำปลาที่เดิม เอนไซม์ที่ชอบเกลือชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%	176
น13 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณ acetic acid ในน้ำปลาที่เดิม เอนไซม์ที่ชอบเกลือชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%	177
น14 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณ propionic acid ในน้ำปลาที่ เดิมเอนไซม์ที่ชอบเกลือชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%	177
น15 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณ isobutyric acid ในน้ำปลาที่ เดิมเอนไซม์ที่ชอบเกลือชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และ ใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%	177
น16 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณ butyric acid ในน้ำปลาที่ เดิมเอนไซม์ที่ชอบเกลือชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และ ใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%	178
น17 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณ isovaleric acid ในน้ำปลาที่ เดิมเอนไซม์ที่ชอบเกลือชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และ ใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%	178

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่

หน้า

- ฉ18 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณ valeric acid ในน้ำปลาที่เติม
เอนไซม์ที่ชอบเกลือชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และ
ใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

178

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ขั้นตอนการทำน้ำปลา	7
2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวถูกละลาย (solute) ชนิดต่าง ๆ กับค่า water activity (a_w) ในสารละลายแต่ละชนิด	22
3 กลไกการถ่ายโอนพลังงาน (energy transduction) เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรีย ชอบเกลือกับแบคทีเรียทนเกลือ	24
4 ปฏิกริยาการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ด้วยเอนไซม์ไลเปส	26
5 ลักษณะการทำงานที่แตกต่างกันระหว่างเอนไซม์ไลเปสและเอสเทอเรส	26
6 กลไกการทำงานของเอนไซม์ไลเปส	27
7 ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ไลเปส	28
8 ชนิดของเอนไซม์ไลเปสแบ่งตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์	31
9 ปฏิกริยาการย่อยสลายกรดไขมันนิวคลีอิกด้วยเอนไซม์นิวคลีเอส	37
10 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลท PB233 ที่เจริญบนอาหารแข็ง SGC ที่เติม Tween 80 ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ และเติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์	57
11 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลว SGC ที่เติมน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์และเกลือ NaCl ความเข้มข้น 2.0-3.0 โมลาร์	57
12 ลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท PB233	60
13 ผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อการเจริญของแบคทีเรีย <i>Staphylococcus warneri</i> PB233 ในอาหารเหลว SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์	63
14 ผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส ของแบคทีเรีย <i>Staphylococcus warneri</i> PB233 ในอาหารเหลว SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์	63

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
15 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233 ในอาหารเหลว SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และมีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที	66
16 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233 ในอาหารเหลว SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และมีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm	67
17 อิทธิพลของพีเอชและอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233	71
18 ความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233 ที่พีเอชและอุณหภูมิต่าง ๆ	72
19 อิทธิพลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233	73
20 Sephadex G-100 เจลฟิเตรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233	77
21 DEAE Toyopearl 650M คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233	78
22 อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE ของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233 โดยใช้โพธิอะครีลาไมด์เจลความเข้มข้น 7.0 เปอร์เซ็นต์	79

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
23 การหาค่าน้ำหนักโมเลกุลจากของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233 ด้วยวิธีอิเล็กโตรฟอเรซิสแบบ SDS-PAGE	80
24 อิทธิพลของพีเอชและอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233	85
25 ความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233 ที่พีเอชและอุณหภูมิต่าง ๆ	86
26 อิทธิพลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233	87
27 ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ขบเกล็ดจากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233 ความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการหมัก	89
28 ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่ไม่เติมและเติมเอนไซม์ไลเปสที่ขบเกล็ดจากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233 ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับการหมัก	95
29 ปริมาณเกลือ พีเอช และความเข้มข้นที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่ไม่เติมและเติมเอนไซม์ไลเปสที่ขบเกล็ดจากแบคทีเรียทนเกลือ <i>Staphylococcus warneri</i> PB233 ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับการหมัก	96
 ภาพผนวกที่	
ง1 กราฟมาตรฐานกรดโอเลอิก	133
ง2 กราฟมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)	136

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ง3 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ในน้ำปลา ที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือร่วมกับการหมัก	138
ง4 โครมาโทแกรมของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP มาตรฐาน และน้ำปลาที่เติมเอนไซม์โปรติเอส โรโบนิวคลีโอเอส และไลเปสที่ชอบเกลือ ร่วมกับการหมัก	141
ง5 กราฟมาตรฐานสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP	141

การศึกษาการผลิตและสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ จากแบคทีเรียทนเกลือเพื่อใช้ในการหมักน้ำปลา

Studies on Production and Characterization of Halophilic Lipase from Halotolerant Bacteria for Fish Sauce Fermentation

คำนำ

ไลเปส (lipase) หรือ ไตรเอซิลกลีเซอรอล เอซิลไฮโดรเลส (triacylglycerol acylhydrolases) หรือ กลีเซอรอล เอสเทอร์ ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) (EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม ไฮโดรเลส (hydrolase) เอนไซม์ไลเปสมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโมเลกุลของ ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ได้เป็นกลีเซอรอล (glycerol) และกรดไขมัน (fatty acid) โดยเอนไซม์ ไลเปสจะย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ (ester bond) ที่อยู่ระหว่างกรดไขมันกับกลีเซอรอลในโมเลกุล ของไตรกลีเซอไรด์ เอนไซม์ไลเปสจะทำปฏิกิริยาดังกล่าวได้ดี เมื่อไตรกลีเซอไรด์อยู่ในสภาพที่ไม่ ละลายน้ำ (water-insoluble substrate) หรือที่บริเวณผิวสัมผัสของน้ำและน้ำมัน (oil-water interface) (Jensen, 1983; Macrae, 1983) ซึ่งเรียกลักษณะการทำงานของเอนไซม์ไลเปสว่า “interfacial activation” (Jaeger *et al.*, 1994; Jaeger and Reetz, 1998; Weete, 1998; Sharma *et al.*, 2001) เป็นที่ทราบกันดีว่ากรดไขมันแต่ละชนิด โดยเฉพาะพวกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและระเหยได้ เช่น acetic acid, propionic acid, butyric acid, valeric acid และ caproic acid จะมีกลิ่นเฉพาะตัว และทำให้เกิดกลิ่นที่ดีขึ้นในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่าง ๆ ได้ ดังนั้น เอนไซม์ไลเปสจึงถูกนำไปใช้ ประโยชน์ในการปรับปรุงกลิ่นในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เช่น โยเกิร์ต เนยแข็ง และไส้กรอก เป็นต้น (Jaeger *et al.*, 1994; Sharma *et al.*, 2001)

น้ำปลาเป็นผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำพื้นเมืองของประเทศไทยที่จำเป็นในการประกอบอาหาร ประจำวัน ประชาชนคนไทยจะนิยมใช้น้ำปลาช่วยปรุงแต่งรสอาหารกันทุกครัวเรือน น้ำปลาได้จากการหมักปลากับเกลือนานประมาณ 8-12 เดือน โดยใช้ปลาขนาดเล็กซึ่งอาจเป็นปลาน้ำจืดหรือน้ำเค็มก็ได้ ในกระบวนการหมักจะเกิดการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) โดยเอนไซม์จากอวัยวะ ภายในของปลาก่อนแล้วเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนจะย่อยสลายเนื้อปลาในขั้นต่อไปจน กลายเป็นน้ำปลา (ประเสริฐ, 2511) ไม่เพียงแต่ในประเทศไทยเท่านั้นที่ใช้น้ำปลาเป็นเครื่องปรุงรส

อาหารยังมีประเทศอื่น ๆ ในเอเชียที่ผลิตและบริโภคน้ำปลาเช่นเดียวกัน เช่น เวียดนาม พม่า มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย และญี่ปุ่น เป็นต้น โดยแต่ละประเทศก็จะมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไป น้ำปลานอกจากจะใช้เป็นเครื่องปรุงรสอาหารซึ่งให้รสเค็มและมีกลิ่นชวนรับประทานแล้ว น้ำปลายังมีความสำคัญทางโภชนาการประกอบด้วย โปรตีน วิตามิน เกลือ และแร่ธาตุต่าง ๆ ที่มีความจำเป็นต่อร่างกายโดยเฉพาะน้ำปลาแท้ชั้นคุณภาพที่ 1 ตามมาตรฐานน้ำปลาเพื่อการผลิตของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก. 3-2526) ซึ่งจัดเป็นน้ำปลาคุณภาพดีมีคุณค่าทางโภชนาการสูง

น้ำปลาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่นิยมใช้กันแพร่หลาย มีความสำคัญทั้งทางด้านโภชนาการและทางด้านเศรษฐกิจ ปัจจัยสำคัญที่จะทำให้ผู้บริโภคยอมรับน้ำปลา คือ กลิ่นและรสชาติ โดยกลิ่นของน้ำปลาจะเกิดจากสารประกอบหลายชนิดในน้ำปลา โดยเฉพาะกรดไขมันโมเลกุลต่ำ ๆ ที่ระเหยได้ (volatile fatty acid) เช่น acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acids (Saisithi, 1967; Dougan and Howard, 1975; McIver *et al.*, 1982; Sanceda *et al.*, 2003) ปัจจุบันการผลิตน้ำปลาในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ยังใช้การหมักโดยวิธีธรรมชาติแบบดั้งเดิมซึ่งต้องใช้เวลาในการหมักนานและคุณภาพน้ำปลาที่ได้ไม่สม่ำเสมอ จึงได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการหมักน้ำปลาโดยใช้วิธีการต่าง ๆ เช่น การใช้กรด-ด่าง (Beddows and Ardesir, 1979b; Poosaran, 1986a; Sanceda *et al.*, 1996) การใช้เชื้อจุลินทรีย์ (บุญศรี, 2533; Ok *et al.*, 1982b) การใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (ปราโมทย์, 2507; วรรณ, 2534; Beddows and Ardesir, 1979a; Nakano *et al.*, 1986; Poosaran, 1986b) เพื่อเร่งกระบวนการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลาให้กลายเป็นน้ำปลาเร็วขึ้น ซึ่งการศึกษาวินิจฉัยเพื่อพัฒนากระบวนการหมักน้ำปลาส่วนใหญ่จะเป็นการพัฒนาเพื่อย่นระยะเวลาในการหมักน้ำปลาแต่น้ำปลาที่ได้มักจะยังมีกลิ่นและรสชาติคือน้ำปลาที่หมักโดยวิธีธรรมชาติ การวิจัยเพื่อพัฒนาปรับปรุงกลิ่นและรสชาติของน้ำปลาให้ดีขึ้นน่าที่จะทำได้โดยการเติมเอนไซม์ไลเปสและไรโบนิวคลีเอสที่ชอบเกลือ (halophilic lipase and ribonuclease) ร่วมไปกับการหมักน้ำปลา เอนไซม์ไลเปสและไรโบนิวคลีเอสที่ชอบเกลือจะมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันและกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid, RNA) ในตัวปลาให้เป็นกรดไขมันชนิดต่าง ๆ และสารประกอบนิวคลีโอไทด์กัวโนซีน 5'-โมโนฟอสเฟต (guanosine 5'-monophosphate, 5'-GMP) ซึ่งจะช่วยให้กลิ่นและรสชาติของน้ำปลาดีขึ้น

ดังนั้น ถ้าได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการผลิตและสมบัติของเอนไซม์ไลเปสชอบเกลือที่ผลิตจากแบคทีเรียทนเกลือที่แยกได้จากน้ำปลา ซึ่งมีความสามารถในการผลิตกรดไขมันชนิดต่าง ๆ ที่มีบทบาทต่อการเกิดกลิ่นในน้ำปลาในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง ๆ ได้ และนำไปใช้ร่วมกับเอนไซม์โรโบนิวคลีเอสและโปรติเอสที่ชอบเกลือ (อนันต์, 2545; Ikeda, 2000; Bovornreungroj, 2005) ในการหมักน้ำปลาจึงน่าที่จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาให้เกิดกลิ่นและรสชาติที่ดีขึ้นในน้ำปลาและช่วยย่นระยะเวลาในการหมักน้ำปลาลงได้

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกและจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำปลาดิบซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง
2. ศึกษาวิธีการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้และศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ดังกล่าว
3. ศึกษาวิธีการทำเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือให้มีความบริสุทธิ์สูง
4. เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือชนิดต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปส ไรโบนิวคลีเอส และโปรติเอสร่วมในการหมัก กับน้ำปลาที่หมักโดยวิธีธรรมชาติ

การตรวจเอกสาร

น้ำปลา (fish sauce) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักปลากับเกลือแล้วบ่มทิ้งไว้นานประมาณ 8-12 เดือน เกลือจะซึมเข้าไปในเนื้อปลา เอนไซม์จากตัวปลาและจากจุลินทรีย์ที่ปะปนมาจะทำให้การย่อยสลายเนื้อปลากลายเป็นของเหลว (ประเสริฐ, 2511) น้ำปลาเป็นเครื่องปรุงแต่งรสอาหารที่สำคัญและนิยมกันอย่างกว้างขวางของประชาชนในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แต่ละประเทศจะมีชื่อเรียกน้ำปลาหรือของเหลวซึ่งผลิตโดยวิธีการที่คล้ายคลึงกับการผลิตน้ำปลาแตกต่างกันออกไป เช่น เวียดนาม เรียกว่า Nuoc-mam กัมพูชา เรียกว่า Nuoc-mam-gua-ca พม่า เรียกว่า Ngam-ya-ye อินโดนีเซีย เรียกว่า Ketjap-Ikan มาเลเซีย เรียกว่า Budu สิงคโปร์ เรียกว่า Sambal-Ikan ฟิลิปปินส์ เรียกว่า Patis ญี่ปุ่น เรียกว่า Shottsuru ลาว เรียกว่า Nam-pa และไทย เรียกว่า Nam-pla (Saisithi *et al.*, 1966)

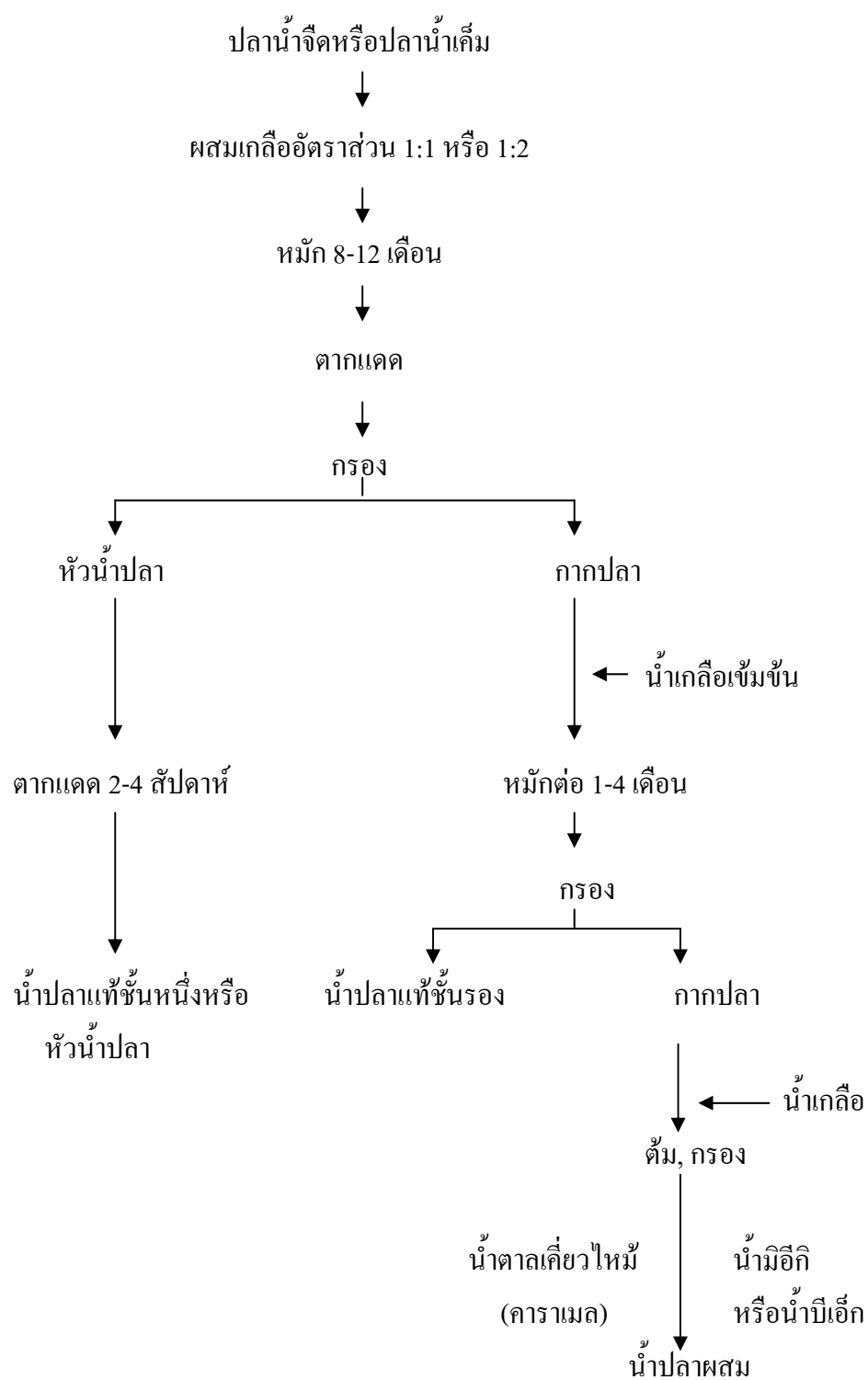
น้ำปลาเป็นเครื่องปรุงแต่งรสอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงประกอบด้วยเกลือ 27.5-28.9 เปอร์เซ็นต์ สารอินทรีย์ในโตรเจน 0.6-2.0 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียในโตรเจน 0.2-0.7 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีนในโตรเจน 7.6 เปอร์เซ็นต์ (Amano, 1962) นอกจากนั้นน้ำปลายังเป็นแหล่งใหญ่ของเกลือแร่มากมายหลายชนิด ได้แก่ แคลเซียม เหล็ก ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม แมงกานีส ไอโอดีนและกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายไม่น้อยกว่า 13 ชนิด โดยเฉพาะไลซีน ซึ่งมีปริมาณสูงพอที่จะทดแทนการขาดไลซีนในคนที่บริโภคข้าวเป็นอาหารหลักได้ (Dougan and Howard, 1975)

1. กระบวนการผลิตน้ำปลา

วัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตน้ำปลา ได้แก่ ปลาสดและเกลือ โดยปลาที่ใช้จะใช้ได้ทั้งปลาน้ำเค็มและปลาน้ำจืด แต่การใช้ปลาน้ำจืดมาทำน้ำปลาจะทำให้ได้น้ำปลาที่มีกลิ่นและรสชาติดีกว่าการใช้ปลาน้ำเค็ม (Lafont, 1950) น้ำปลาคุณภาพดีเป็นน้ำปลาที่ผลิตจากปลาน้ำเค็มถึง 97 เปอร์เซ็นต์ เช่น ปลากระดัก (*Clupeoides lile*) ปลาไส้ตัน (*Stolephorus* sp.) ปลาหลังเขียว (*Sardinella* sp.) ปลาทรายแดง (*Nemipterus* sp.) และปลาเบญจพรรณอื่น ๆ ส่วนปลาน้ำจืดมีการนำมาใช้ในการผลิตน้ำปลาเพียง 3 เปอร์เซ็นต์ เช่น ปลาสร้อย (*Cirrhinus* sp.) ปลาตะเพียน (*Puntius* sp.) และปลาชิว (*Rasbora* sp.) เป็นต้น น้ำปลาคุณภาพดีส่วนใหญ่จะผลิตจากปลากระดัก เนื่องจากลักษณะเนื้อของปลากระดักจะแน่นและละเอียดกว่าปลาชนิดอื่นทำให้เมื่อนำมาทำน้ำปลาแล้วจะมีกลิ่นและ

รสชาติดี สีสวย เป็นน้ำปลาที่มีคุณภาพดีที่สุด สำหรับเกลือที่ใช้ในการหมักน้ำปลามี 2 ชนิด คือ เกลือสมุทรหรือเกลือทะเล (solar salt) และเกลือสินเธาว์ (rock salt) โดยทั่วไปจะนิยมใช้เกลือสมุทรหรือเกลือทะเลเพราะมีความชื้นเหมาะสมและมีเกลือแร่ต่าง ๆ ที่มีคุณค่าทางอาหารมาก เกลือสมุทรหรือเกลือทะเลจะมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 85.0 เปอร์เซ็นต์ และมีความชื้นประมาณ 11.0 เปอร์เซ็นต์ (นนุช, 2538)

สำหรับขั้นตอนในการผลิตน้ำปลา ขั้นแรกจะนำปลาที่ได้มาล้างเพื่อกำจัดความเปรี้ยว และสิ่งสกปรกที่ติดมากับปลาออก จากนั้นจึงนำมาคลุกเคล้ากับเกลือ โดยใช้เกลือในอัตรา 1 ส่วนต่อปลา 1 ถึง 4 ส่วน เมื่อคลุกเคล้าปลากับเกลือเข้ากันดีแล้วจึงนำไปบรรจุในภาชนะซึ่งอาจเป็นไห โอ่ง หรือบ่อซีเมนต์ ภาชนะที่ใช้บรรจุจะมีเกลือรองอยู่ก่อนแล้ว เมื่อบรรจุส่วนผสมของปลาและเกลือแล้วต้องโรยเกลือทับชั้นบนเพื่อป้องกันไม่ให้ปลาชั้นบนเน่าเสีย จากนั้นทำการปิดภาชนะบรรจุปลาและทับด้วยของหนักเพื่อถ่วงให้น้ำปลาไหลออกมาตามเวลาเกิดน้ำปลา ปล่อยทิ้งไว้ให้เกิดการหมักซึ่งโดยทั่ว ๆ ไปจะใช้เวลาประมาณหนึ่งปี จะได้ของเหลวที่มีสีน้ำตาลแดง ขุ่น และมีกลิ่นคาว เรียกว่า หัวน้ำปลา หรือน้ำปลาชั้นหนึ่ง นำน้ำปลาที่ได้ไปผึ่งแดดประมาณ 1 เดือน ก็จะได้ น้ำปลาแท้คุณภาพดี สีน้ำตาลแดง ใส และมีกลิ่นรสที่ดีของน้ำปลา สำหรับกากปลาที่เหลือจากการทำน้ำปลาชั้นหนึ่งแล้วจะนำไปหมักกับน้ำเกลือเข้มข้นอีก 2 หรือ 3 ครั้ง แต่ละครั้งใช้เวลาประมาณ 2-3 เดือน จะได้ น้ำปลาชั้นที่ 2 และ 3 ซึ่งมีคุณภาพลดหลั่นกันตามลำดับ และมักจะนำไปปรุงแต่งสี กลิ่นและรสชาติ โดยอาจแต่งสีด้วยการเติมสีหรือน้ำตาลเคี้ยวไหม้ ปรุงแต่งรสให้ดีขึ้นด้วยผงชูรส หรือน้ำที่เหลือจากการแยกผงชูรสที่เรียกว่า น้ำบีเอ็กซ์ บางครั้งก็ใช้หัวน้ำปลา สำหรับน้ำปลาที่มีการแต่งสี กลิ่น และรสชาตินี้ เรียกว่า น้ำปลาผสม (บุญศรี, 2533) กระบวนการผลิตน้ำปลาสามารถสรุปได้ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการทำน้ำปลา

ที่มา: บุญศรี (2533)

2. กระบวนการหรือขั้นตอนในการเกิดน้ำปลา

กระบวนการหรือขั้นตอนในการเกิดน้ำปลาจะเกิดจากกระบวนการหลัก ๆ 3 กระบวนการ ได้แก่ การย่อยสลายของเนื้อปลา การเกิดสี การเกิดกลิ่นและรสชาติของน้ำปลา (Saisithi, 1967)

2.1 การย่อยสลายของเนื้อปลา

การย่อยสลายของเนื้อปลาเป็นการเปลี่ยนแปลงทางฟิสิกส์ เคมี และจุลชีววิทยา ซึ่งเป็นการเปลี่ยนสภาพของเนื้อปลาจากของแข็งให้กลายเป็นของเหลวโดยอาศัยกิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ที่ได้จากตัวปลาและจุลินทรีย์ปนเปื้อน (Visco and Fratoni, 1960; Amano, 1962; Voskresensky, 1965) เนื่องจากตัวปลาประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน และเกลือแร่ในปริมาณต่าง ๆ กันแต่มีโปรตีนมากที่สุดดังนั้นปฏิกิริยาที่สำคัญคือ การย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนในปลาซึ่งมักพบในกระเพาะของปลาเอง เช่น ทริปซิน (trypsin) คาเทปซิน (cathepsin) เปปซิน (pepsin) และอีเรปซิน (erepsin) เมื่อปลาดายเอนไซม์จากตัวปลาและจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนทั้งก่อนและหลังปลาดายจะย่อยสลายโปรตีนทันทีทำให้สารโมเลกุลใหญ่กลายเป็นสารโมเลกุลเล็กลง ได้แก่ เปปไทด์ และกรดอะมิโน (Alm, 1965) ซึ่งจะถูกลดสลายต่อไปอีกเป็นเอมีน คีโตน แอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ (บุญศรี, 2533)

ในกระบวนการเกิดน้ำปลานอกจากจะเกิดการย่อยสลายโปรตีนแล้วยังเกิดการย่อยสลายไขมันในตัวปลาโดยไขมันในตัวปลาส่วนใหญ่จะเป็นพวกไตรกลีเซอไรด์ มีฟอสฟอลิปิดเป็นส่วนน้อย และมักเป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีโมเลกุลยาว ๆ มีคาร์บอน 20-22 อะตอม (Stanby, 1962) ไขมันในปลาจะถูกย่อยสลายเป็นกรดไขมันที่ระเหยได้และที่ระเหยไม่ได้รวมทั้งคีโตนและแอลดีไฮด์โดยกิจกรรมของเอนไซม์จากปลาและจุลินทรีย์ (Lerke *et al.*, 1967; Spinelli, 1971)

2.2 การเกิดสีของน้ำปลา

สีของน้ำปลาที่เกิดขึ้นในช่วงแรก ๆ พบว่ามีสีเหลืองอำพันแล้วจะค่อย ๆ เข้มขึ้นและเมื่อถึงระยะสุดท้ายของการหมักน้ำปลาจะมีสีน้ำตาลอมแดง สีน้ำตาลอมแดงของน้ำปลานั้นเกิดจากปฏิกิริยาเคมีที่เรียกว่า non-enzymatic browning หรือ maillard reaction ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยา

ระหว่างสารประกอบคาร์บอนิลและสารประกอบอะมิโน สารประกอบคาร์บอนิล ได้แก่ สารประกอบพวกน้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาล รวมทั้งสารประกอบที่เกิดจากการเติมออกซิเจนของไขมัน ส่วนสารประกอบอะมิโนที่พบในเนื้อปลาคือ โปรตีน กรดอะมิโน และบางส่วนของกรดอะมิโนที่ถูกย่อยแล้ว (ประเสริฐ, 2511; Jones, 1962; Saisithi, 1967)

น้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาลที่สำคัญในการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวและพบเสมอขณะที่ปลาตายใหม่ ๆ คือ ไรโบสและไรโบสฟอสเฟตซึ่งได้จากการย่อยสลายอาร์เอ็นเอ (ประเสริฐ, 2511) จากการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลระหว่างกรดอะมิโนและน้ำตาลไรโบสในห้องทดลองพบว่า กรดอะมิโนไลซีน (lysine) เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำตาลไรโบสที่พีเอช 6.7 จะให้สีน้ำตาลเข้มที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ ความเข้มข้นของสีน้ำตาลจะเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับอุณหภูมิและปริมาณออกซิเจนที่เพิ่มขึ้น แสงไม่มีผลทำให้สีน้ำตาลเข้มขึ้นขึ้น เกลือ K_2HPO_4 จะช่วยส่งเสริมให้เกิดปฏิกิริยา maillard reaction ได้ และเกลือ Ca^{++} 0.1 ppm, Fe^{++} 0.1 ppm, Mg^{++} 1.0 ppm ก็จะกระตุ้นในปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลนี้ได้เช่นกัน (Saisithi *et al.*, 1966) สำหรับไขมันพวกฟอสโฟลิปิดและไลโปโปรตีน เมื่อน้ำตาลและออกซิเจนจะเกิดปฏิกิริยาระหว่างกลุ่มอะมิโนและแอลดีไฮด์เปลี่ยนไปเป็นสารประกอบคาร์บอนิลซึ่งจะทำปฏิกิริยาเกิดเป็นสีน้ำตาลต่อไป (Reynolds, 1965)

2.3 การเกิดกลิ่นและรสชาติของน้ำปลา

กลิ่นและรสชาติของน้ำปลาเป็นปัจจัยที่สำคัญที่จะทำให้ผู้บริโภคยอมรับน้ำปลาที่ได้จากการหมัก กลิ่นและรสชาติของน้ำปลาจะเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมัก เนื่องจากมีรายงานว่าหากทำการหมักน้ำปลาในสภาวะปลอดเชื้อพบว่าน้ำปลาที่ได้จะขาดคุณสมบัติทางด้านกลิ่นและรสชาติตามธรรมชาติของน้ำปลา (Beddows *et al.*, 1976)

Saisithi *et al.* (1966) เชื่อว่ากลิ่นและรสชาติของน้ำปลาจะเป็นตัวบ่งบอกคุณภาพของน้ำปลาโดยพบว่าน้ำปลาที่ใช้เวลาในการหมัก 9 เดือนจะให้กลิ่นและรสชาติเฉพาะตัวซึ่งเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์แต่น้ำปลาที่ใช้เวลาในการหมัก 12 เดือนจะให้กลิ่นและรสชาติเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเนื่องจากกรดที่ระเหยได้จะมีปริมาณน้อยในขณะที่ค่าที่ระเหยได้จะเพิ่มขึ้นมากเมื่อใช้เวลาในการหมัก 9 เดือน และลดลงมากเมื่อใช้เวลาในการหมัก 12 เดือน นอกจากนั้นยังพบอีกว่าไนโตรเจนที่ละลายน้ำ ฮีสติดีน โปรตีน และกรดกลูตามิกจะเป็นตัวให้รสชาติในน้ำปลาไทย

ส่วนกลิ่นนั้นจะเป็นลักษณะเฉพาะตัวของกรดที่ระเหยได้ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียจะมีบทบาทก็จะช่วยสร้างกรดที่ระเหยได้และเอมีน

สายพิณ และ สิทธิพันธุ์ (2526) ได้ศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Pediococcus halophilus* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญที่สุดในการทำให้เกิดกลิ่นในน้ำปลาไทยขนานันท์ และ ช่อฟ้า (2527) ได้ทดลองหมักน้ำปลาโดยใช้ pyloric enzyme จะทำให้ได้ของเหลวใสสีน้ำตาลเหมือนน้ำปลา แต่ขาดกลิ่นที่ดีของน้ำปลา แต่ถ้าหมักร่วมกับเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือโดยเฉพาะ *Halobacterium* OR จะทำให้น้ำปลาที่ได้มีกลิ่นดี กฤษดา (2529) ได้ทดลองแยกเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือในน้ำปลาพบว่า *Halobacterium salinarium* น่าจะมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นที่ดีของน้ำปลา

ได้มีผู้อธิบายการเกิดกลิ่นหอมของน้ำปลาว่าเป็นผลรวมของกลิ่นที่แตกต่างกัน 3 กลิ่น คือ กลิ่นคล้ายเนยแข็ง (cheesy aroma) กลิ่นคล้ายเนื้อ (meaty aroma) และกลิ่นแอมโมเนีย (Saisithi *et al.*, 1966; Dougan and Howard, 1975; Beddows *et al.*, 1976; McIver *et al.*, 1982; Sanceda *et al.*, 2003) โดยกรดไขมันที่ระเหยได้โมเลกุลเล็ก ๆ ได้แก่ formic acid, acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid ที่แยกได้จากน้ำปลาช่วยทำให้เกิดกลิ่นคล้ายเนยแข็ง (Saisithi *et al.*, 1966; Dougan and Howard, 1975; Beddows *et al.*, 1976; McIver *et al.*, 1982; Sanceda *et al.*, 2003) น้ำปลาที่มีคุณภาพดีจะมีปริมาณของ acetic acid กับ butyric acid ในอัตราส่วนที่เท่ากัน (ประเสริฐ, 2511) กลิ่นแอมโมเนียเกิดจากแอมโมเนีย เอมีนชนิดต่าง ๆ และสารประกอบไนโตรเจน (basic nitrogenous compound) (Saisithi *et al.*, 1966; Dougan and Howard, 1975; McIver *et al.*, 1982) สำหรับกลิ่นคล้ายเนื้อได้จากสารประกอบลิโดนและกรดคีโตน ต่าง ๆ (Dougan and Howard, 1975; McIver *et al.*, 1982)

Saisithi *et al.* (1966) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp., *Coryneform*, *Streptococcus* sp., *Micrococcus* sp. และ *Staphylococcus* sp. ที่แยกได้จากน้ำปลาไทยอายุ 9 เดือน จะสร้างกรดที่ระเหยได้ (volatile acids) ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นในน้ำปลาโดย *Staphylococcus* sp. จะสร้างกรดที่ระเหยได้ปริมาณสูงที่สุด

McIver *et al.* (1982) ได้ศึกษาส่วนประกอบของกลิ่นรสในน้ำปลาโดยใช้กระบวนการสกัดเพื่อให้เกิดการแยกของสารผสมที่ทำให้เกิดรสชาติของน้ำปลา ได้สารประกอบทั้งหมด 43 ชนิด เป็นกรด 8 ชนิด แอลกอฮอล์ 10 ชนิด เอมีน 6 ชนิด สารประกอบอื่นที่มีไนโตรเจน 7 ชนิด แลคโตน 4 ชนิด คาร์บอนิล 3 ชนิด และสารประกอบที่มีซัลเฟอร์ 5 ชนิด

Saisithi (1967) ได้ทำการวิเคราะห์กลิ่นของน้ำปลาโดยวิธี paper chromatography พบว่ากลิ่นของน้ำปลาประกอบด้วย กรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ 5 ชนิดและกรดอินทรีย์ที่ระเหยไม่ได้ 1 ชนิด กรดอินทรีย์ที่ระเหยได้มี formic acid, acetic acid, propionic acid, isobutyric acid และตัวที่ 5 ยังบอกชื่อไม่ได้ กรดทั้ง 4 ชนิดแรกพบว่ามีปริมาณเกือบเท่า ๆ กันโดยการเปรียบเทียบขนาดของจุดที่พบบน chromatogram ส่วนตัวที่ 5 นั้นมีอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับ 4 ตัวแรก ส่วนกรดอินทรีย์ที่ระเหยไม่ได้นั้นพบว่าเป็น lactic acid เหตุผลที่ยืนยันได้คือการหนึ่งว่ากรดที่ระเหยได้ทั้ง 5 ชนิดนั้นเป็นกลิ่นของน้ำปลา คือ เมื่อกลั่นเอากรดเหล่านี้ออกจากน้ำปลา น้ำปลาจะไม่มีกลิ่นเลยถึงแม้ว่าจะทำให้พีเอชของน้ำปลากลับเป็นกรดอย่างเดิมก็ตาม

สำหรับรสชาติของน้ำปลาพบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้จะมีรสเฉพาะของตัวเอง บรรดากรดอะมิโนที่พบในน้ำปลาเกือบทุกระยะของการหมัก คือ lysine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, histidine, leucine และ phenylalanine จำนวนกรดอะมิโนจะลดน้อยลงเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น โดยในระยะ 1-3 เดือน จะมีกรดอะมิโน 20-22 ชนิด และเมื่อหมักครบหนึ่งปีจะมีกรดอะมิโนเหลืออยู่เพียง 13 ชนิด เพราะกรดอะมิโนเหล่านี้จะถูกใช้เป็นอาหารของแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำปลาหรือไปทำปฏิกิริยาเคมี เช่น non-enzymatic browning reaction ทำให้กรดอะมิโนลดน้อยลงไป (ประเสริฐ, 2511)

Saisithi (1967) ได้ศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่พบในน้ำปลาพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดกลิ่นในน้ำปลาได้ 3 พวก คือ

1. พวกที่สร้างกลิ่นหอมคล้ายกุหลาบ กลิ่นนี้จะสังเคราะห์ได้จากกระบวนการย่อยสลาย (strecker degradation) ของ aromatic amino acids เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้มีลักษณะเป็นแท่งแกรมบวก ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ และในอาหารที่ใช้เลี้ยงจะต้องมีเกลืออยู่ด้วยไม่น้อยกว่า 10.0 เปอร์เซ็นต์

2. พวกที่สร้างกลิ่นเหมือนกลิ่นเนื้อ พวกนี้เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่ เป็นแท่งสั้นและปลายมน

3. พวกที่ให้กลิ่นที่เป็นกรดใกล้เคียงกับกลิ่นของน้ำปลามาก กลิ่นนี้ได้จากเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม จากการศึกษาทางรูปร่างคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียตัวนี้จึงจัดเข้าไว้ในสกุล *Pediococcus* ของครอบครัว *Lactobacillaceae* ซึ่งปรากฏว่าคือ *Pediococcus halophilus*

3. มาตรฐานน้ำปลา

ประเทศไทยได้มีการประกาศใช้มาตรฐานน้ำปลาโดยแบ่งได้เป็น 2 มาตรฐาน เพื่อการบริโภคและการผลิต คือ มาตรฐานน้ำปลาตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (เพื่อการบริโภค) และ มาตรฐานน้ำปลาของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.) (เพื่อการผลิต)

ตารางที่ 1 มาตรฐานน้ำปลาเพื่อการบริโภคของกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 203) พ.ศ. 2543

น้ำปลาแท้ และน้ำปลาที่ทำจากสัตว์อื่น	น้ำปลาผสม
1. มีสีกลิ่นและรสของน้ำปลาแท้ หรือน้ำปลาที่ทำมาจากสัตว์อื่น	1. มีสี กลิ่น และรสของน้ำปลาผสม
2. โซ ไม่มีตะกอน เว้นแต่ตะกอนอันเกิดจากธรรมชาติไม่เกิน 0.1 กรัม/ลิตร	2. โซ ไม่มีตะกอน เว้นแต่ตะกอนอันเกิดมาจากรวมชาติไม่เกิน 1 กรัม /ลิตร
3. มีเกลือในน้ำปลา 1 ลิตร	3. มีเกลือในน้ำปลา 1 ลิตร
3.1 โซเดียมคลอไรด์ไม่น้อยกว่า 200 กรัม	3.1 โซเดียมคลอไรด์ไม่น้อยกว่า 200 กรัม
3.2 กรณีที่ใช้เกลือโพแทสเซียมคลอไรด์	3.2 กรณีที่ใช้เกลือโพแทสเซียมคลอไรด์
อย่างเดียวน จะต้องมีความเกลือชนิดใดชนิดหนึ่งหรือทั้ง 2 ชนิดรวมกันไม่น้อยกว่า 200 กรัม	อย่างเดียวนจะต้องมีความเกลือชนิดใดชนิดหนึ่งหรือทั้ง 2 ชนิดรวมกันไม่น้อยกว่า 200 กรัม
4. มีไนโตรเจนทั้งหมดไม่น้อยกว่า 9 กรัม/ลิตร	4. มีไนโตรเจนทั้งหมดไม่น้อยกว่า 4 กรัม/ลิตร
	5. มีกรดกลูตามิกต่อไนโตรเจนทั้งหมดไม่น้อยกว่า 0.4 แต่ไม่เกิน 1.3

ตารางที่ 1 (ต่อ)

น้ำปลาแท้ และน้ำปลาที่ทำจากสัตว์อื่น	น้ำปลาผสม
5. มีไนโตรเจนจากกรดอะมิโนไม่น้อยกว่าร้อยละ 40 และไม่เกินร้อยละ 60 ของไนโตรเจนทั้งหมด	6. ไม่ใช่สี เว้นแต่สีน้ำตาลเคี้ยว หรือสีคาราเมล
6. มีกรดกลูตามิกต่อไนโตรเจนทั้งหมดไม่น้อยกว่า 0.4 แต่เกิน 0.6	7. ใช้วัตถุที่ทำให้ความหวานแทนน้ำตาล หรือใช้ร่วมกับน้ำตาลนอกจากการใช้น้ำตาล
7. ไม่ใช่สี เว้นแต่สีน้ำตาลเคี้ยวไหม้ หรือสีคาราเมล	
8. ไม่ใช่วัตถุที่ทำให้ความหวานแทนน้ำตาล	

สำหรับมาตรฐานน้ำปลาของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม (มอก.) เพื่อการผลิตจะแบ่งน้ำปลาออกเป็น 2 ชั้นคุณภาพ คือ ชั้นคุณภาพ 1 และชั้นคุณภาพ 2 โดยการแบ่งชั้นคุณภาพของน้ำปลานั้นการกำหนดจะขึ้นอยู่กับคุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และไนโตรเจนจากกรดอะมิโน

ตารางที่ 2 มาตรฐานน้ำปลาเพื่อการผลิตของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม (มอก. 3-2526)

ชั้นคุณภาพ	ไนโตรเจนทั้งหมด กรัม/ ลบ.ดม	ไนโตรเจนจากกรดอะมิโน กรัม/ลบ.ดม.
ชั้นคุณภาพ 1	20	10
ชั้นคุณภาพ 2	15	7.5

มาตรฐานด้านอื่น ๆ ของน้ำปลาแท้

1. จะต้องมิกลินและรสของน้ำปลาแท้
2. ต้องใส สะอาด ไม่มีวัตถุอื่นเจือปนอยู่ ยกเว้นวัตถุที่ได้มาจากระบวนการหมักทางธรรมชาติเท่านั้น (ต้องไม่เกิน 0.1 กรัม ต่อ 1 ลิตร)
3. มีส่วนผสมของเกลือ (เกลือโซเดียมคลอไรด์) ในน้ำปลา 1 ลิตรไม่ต่ำกว่า 200 กรัม/ลิตร

4. ต้องมีปริมาณของโปรตีนไม่ต่ำกว่า 9 กรัม/ลิตร
5. มีกรดอะมิโนไนโตรเจนอยู่ระหว่างร้อยละ 40-60 ของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด
6. มีกรดกลูตามิกต่อไนโตรเจนทั้งหมดอยู่ระหว่าง 0.4-0.8
7. ไม่เจือสีใด ๆ ยกเว้นสีที่ได้จากน้ำตาลคาราเมล
8. ไม่ใส่สารให้รสหวานใด ๆ ยกเว้นน้ำตาล

4. จุลชีววิทยาของน้ำปลา

ในกระบวนการผลิตน้ำปลา ปลาที่ใช้จะมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนซึ่งอาจติดมากับตัวปลาเอง ปนเปื้อนมากับเครื่องมือเครื่องใช้หรือสถานที่หรือติดมากับเกลือที่ใช้ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเป็นพวกเชื้อแบคทีเรียโดยเชื้อแบคทีเรียที่ติดมากับปลานั้นจะมีทั้งพวกชอบเกลือและพวกไม่ชอบเกลือ เชื้อแบคทีเรียไม่ชอบเกลือเมื่อถูกเกลือจะตายอย่างรวดเร็ว ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ชอบเกลือก็จะเจริญเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว การเจริญของเชื้อแบคทีเรียจะสูงสุดในระยะแรก ๆ ของการหมักเท่านั้น แต่ก็เพียงพอที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเนื้อปลา คือ โปรตีน และไขมันที่อยู่ในตัวปลาจะถูกย่อยสลายไปบางส่วนและเมื่อแบคทีเรียตายลงก็ยังคงทิ้งเอนไซม์สำหรับย่อยสลายปลาต่อไป (Amano, 1962; Saisithi *et al.*, 1966)

สายสมร (2518) ได้ศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำปลาพบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียทนเกลือในสกุล *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Coryneform*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* และ *Sarcina* โดยใน 4 สกุลแรกจะผลิตเอนไซม์โปรติเอสย่อยสลายโปรตีนได้ดีและคาดว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีบทบาททำให้เกิดกลิ่นและรสชาติของน้ำปลา

มัทนา และ สมศักดิ์ (2527) ได้รายงานจุลินทรีย์ที่พบในน้ำปลาประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Micrococcus roseus*, *M. varians*, *Pediococcus cerevisiae*, *P. halophilus*, *Bacillus pumilus*, *B. megaterium*, *B. firmus*, *B. alvei* และ *B. laterosporus*

วิไลลักษณ์ (2538) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างกรดสร้างเอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์อะมิเลสในตัวอย่างน้ำปลาโดยพบเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus saprophyticus* 0113 มีความสามารถในการสร้างกรดและย่อยไขมัน

Bacillus pantothenicus 0188 มีความสามารถในการย่อยแป้งและโปรตีนนอกจากนั้นยังพบ *Halobacterium salinarium* 0509 และเชื้อแบคทีเรียรูปท่อน แกรมลบ ในตัวอย่างน้ำปลา

Visco and Fraton (1960) ได้แสดงให้เห็นว่าในกระบวนการทำน้ำปลาจะมีจุลินทรีย์และเอนไซม์เข้ามามีส่วนเกี่ยวข้องและได้แยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำปลาพบ *Achromobacter* sp., *Flavobacterium* sp. และ *Proteus* sp.

Crisan and Sands (1975) ได้ทำการแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างน้ำปลา 4 ชนิด ได้แก่ nampla, patis, koami และ ounago พบเชื้อแบคทีเรีย 11 สายพันธุ์ เชื้อยีสต์ 1 สายพันธุ์ และ เชื้อรา 3 สายพันธุ์

Thongthai and Siriwongpairat (1978) ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียจะมีการเจริญและมีบทบาทมากในช่วงเดือนแรกของการหมัก เชื้อแบคทีเรียใช้ออกซิเจนที่ต้องการความเข้มข้นเกลือ 5.0 หรือ 10.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีอยู่จำนวนน้อยจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเริ่มต้นการหมักหรืออาจทนอยู่ได้ในระยะเวลาสั้น ๆ แล้วจึงลดลงจนมีระดับต่ำสุด ส่วนเชื้อแบคทีเรียใช้ออกซิเจนที่ต้องการความเข้มข้นเกลือสูงในการเจริญซึ่งมีอยู่จำนวนมากจะเพิ่มจำนวนจาก 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่สองไปเป็น 7×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากหมักไปได้ 3 สัปดาห์ และได้ตั้งชื่อเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือหนึ่งในจำนวนนั้นว่า *Halobacterium* OR.

Suntinanalert (1979) ได้ศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำปลาไทย พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียพวก *Bacillus* sp., *Halobacterium* sp., Coryneform และ *Halococcus* sp. นอกจากนี้ยังพบ *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp. และ *Streptococcus* sp. สำหรับ *Halobacterium* sp. และ *Halococcus* sp. เป็นเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือที่มักพบเสมอในตัวอย่างน้ำปลา บางครั้งพบ *Proteus* sp. และ *Pseudomonas* sp. มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดกลิ่นเน่าเหม็นของน้ำปลา

Ok et al. (1982a) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างของน้ำปลา พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียพวกชอบเกลือในสกุล *Bacillus* ได้แก่ *Bacillus* B₃ และ *Bacillus* C₁ ซึ่งมีความสามารถในการเจริญและสร้างเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sehgal and Gibbons Complex (SGC) ที่มีเกลือความเข้มข้น 0-4.0 โมลาร์

5. บทบาทของเกลือที่มีต่อเชื้อแบคทีเรีย

เกลือเป็นวัตถุดิบที่สำคัญของการหมักน้ำปลาเพราะมีส่วนสำคัญต่อกลิ่น รสชาติ และคุณสมบัติการเก็บของปลา เกลือที่พบในน้ำปลาส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปโซเดียมคลอไรด์ซึ่งมีประมาณ 27.0-31.0 เปอร์เซ็นต์ สำหรับน้ำปลาคุณภาพดีจะมีเกลือประมาณ 26.0-29.0 เปอร์เซ็นต์ (Saisithi *et al.*, 1966) เกลือจะใช้เป็นสารป้องกันการเน่าเสียของปลาเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียเมื่อปลาสัมผัสกับเกลือที่มีความเข้มข้นมากกว่า 6.0 เปอร์เซ็นต์ จะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดกลิ่นเหม็น เช่น *Pseudomonas* sp. และ *Achromobacter* sp. ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่เป็นพวกทนเกลือหรือชอบเกลียยังสามารถเจริญได้ เช่น *Micrococcus* sp. และ *Coryneforms* (Shewan, 1961; Ingram and Kitchell, 1967)

Alm (1965) ได้ทำการทดลองพบว่าในขณะที่ปลาอยู่ในน้ำเกลื่อนั้นการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลาเป็นผลมาจากการย่อยโดยเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรีย เมื่อการหมักได้ที่แล้วการทำงานของเอนไซม์และการเจริญของเชื้อแบคทีเรียยังคงมีอยู่ ขณะที่อุณหภูมิสูงเชื้อแบคทีเรียจะเริ่มทำการหมักและมีก๊าซเกิดขึ้น เอนไซม์ย่อยโปรตีนจะทำการย่อยสลายเนื้อปลาจนกลายเป็นของเหลว (liquid fraction)

Voskresensky (1965) ได้มีรายงานว่าที่ความเข้มข้นเกลือสูง ๆ และมีพีเอชช่วง 6-7 เอนไซม์ย่อยโปรตีนทั้งจากอวัยวะภายในของปลาและเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรียจะมีประสิทธิภาพในการทำงานลดลงเล็กน้อย โดยเอนไซม์นี้จะทำงานได้ช้ามากถ้ามีความเข้มข้นของเกลือในเนื้อปลามากกว่า 15.0 เปอร์เซ็นต์

Suntinanalerts (1979) ได้ศึกษาชนิดของเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างเกลือทะเลและเกลือสินเชาจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย พบว่าในเกลือทะเลมักพบเชื้อแบคทีเรียพวก *Halobacterium* sp., *Halococcus* sp. และ *Bacillus* sp. แต่ที่พบมากได้แก่ *Halobacterium* sp. และ *Halococcus* sp. บางแหล่งอาจพบ *Micrococcus* sp. และ *Staphylococcus* sp. สำหรับในเกลือสินเชาจะพบเชื้อแบคทีเรียพวก *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp. และ *Coryneforms*

Frazier (1958) ได้สรุปเกี่ยวกับบทบาทของเกลือที่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งทางตรงและทางอ้อมไว้ดังนี้

1. เกลือทำให้เกิดแรงดันออสโมซิส (osmotic pressure) เป็นผลให้โปรโตพลาสซึมของเซลล์แบคทีเรียหดตัวเนื่องจากการสูญเสียน้ำ (plasmolysis) ทำให้เซลล์แบคทีเรียได้รับอันตรายถึงตายหรืออาจทำให้การเจริญหยุดชะงักลง
2. เกลือจะเป็นตัวดึงความชื้นออกจากอาหาร เป็นการควบคุมปริมาณน้ำอิสระ (available water, a_w) ของเชื้อแบคทีเรียซึ่งเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดจะสามารถเจริญได้ในสภาพที่มีค่าปริมาณน้ำอิสระได้แตกต่างกัน
3. เมื่อเกลือเกิดการแตกตัวจะเกิดเป็นไอออนของ Na^+ และ Cl^- ซึ่งจะเป็นอันตรายต่อเชื้อแบคทีเรียที่อ่อนไหว (sensitive) ต่อไอออนชนิดนั้น ๆ โดย Na^+ จะทำปฏิกิริยากับ protoplasmic anion ของเซลล์ทำให้เชื้อแบคทีเรียตายได้ ส่วน Cl^- จะไปรวมตัวกับสารที่มีหมู่ sulhydryl (-SH) ทำให้สารนั้นไม่สามารถเคลื่อนย้ายหมู่ acyl ได้
4. เกลือจะขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่จะมาย่อยโปรตีนและทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง
5. เกลือมีผลทำให้เซลล์อ่อนไหว (sensitive) ต่อคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์
6. เกลือจะทำให้การละลายของออกซิเจนในอาหารลดลง ทำให้เกิดสภาพที่ค่อนข้างจะเป็น anaerobe นอกจากนี้เกลียยังทำให้การเจริญและรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียพวกชอบเกลือ (halophile) เปลี่ยนไป

6. การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ตามความต้องการของเกลือ

เชื้อแบคทีเรียชอบเกลือ (halophilic, salt loving bacteria) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการเกลือสำหรับการเจริญ ถูกจัดอยู่ในอาณาจักร Archaeobacteria ซึ่งเป็นอาณาจักรหนึ่งของระบบการจัดอาณาจักรสิ่งมีชีวิตออกเป็น 3 อาณาจักร ได้แก่ Archaeobacteria Eucaryotes และ Eubacteria (Tortora *et al.*, 2004) ส่วนเชื้อแบคทีเรียทนเกลือ (halotolerant bacteria) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการเกลือสำหรับการเจริญ แต่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือ ถูกจัดอยู่ในอาณาจักร Eubacteria (Tortora *et al.*, 2004) การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ตามความต้องการเกลือสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่

6.1 จุลินทรีย์พวกไม่ชอบเกลือ (non-halophilic, halophobic, salt-sensitive, inhalotolerant microorganism)

จุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถเจริญได้ดีที่สุดในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือต่ำกว่า 0.2 โมลาร์ (1.0 เปอร์เซ็นต์) จุลินทรีย์กลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นพวก eubacteria และจุลินทรีย์ที่มักพบตามแหล่งน้ำจืดทั่วไป (Kushner, 1978)

6.2 จุลินทรีย์พวกทนเกลือ (halotolerant, haloduric microorganism)

จุลินทรีย์กลุ่มนี้ไม่ต้องการเกลือสำหรับการเจริญ แต่สามารถทนต่อเกลือได้และอาจเจริญได้ในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือตั้งแต่ 2.5 โมลาร์ (15.0 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียพวก *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus aureus* และเชื้อแบคทีเรียพวกที่ไม่ต้องการอากาศบางชนิดโดยเฉพาะ *Clostridium botulinum* รวมถึงยีสต์และราบางชนิดด้วย (Kushner, 1978)

6.3 จุลินทรีย์พวกชอบเกลือ (halophilic, salt-loving microorganism)

จุลินทรีย์กลุ่มนี้จะไม่สามารถเจริญได้ในที่ไม่มีเกลืออาจแบ่งออกได้เป็นกลุ่มย่อยดังนี้

6.3.1 จุลินทรีย์พวกชอบเกลือความเข้มข้นต่ำ (slight halophilic microorganism) จุลินทรีย์พวกนี้สามารถเจริญได้ดีที่สุดในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 0.2-0.5 โมลาร์ (1.0-3.0 เปอร์เซ็นต์) จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มักพบในน้ำทะเล เช่น *Vibrio alginolyticus* (Kushner, 1978)

6.3.2 จุลินทรีย์พวกชอบเกลือความเข้มข้นปานกลาง (moderate halophilic microorganism) จุลินทรีย์พวกนี้สามารถเจริญได้ดีที่สุดในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 0.5-2.5 โมลาร์ (3.0-15.0 เปอร์เซ็นต์) จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ได้แก่สาหร่ายและเชื้อแบคทีเรียบางชนิดในกลุ่ม *Vibrio* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* sp. (Kushner, 1978)

6.3.3 จุลินทรีย์ชอบเกลือความเข้มข้นสูง (extream halophilic microorganism) จุลินทรีย์พวกนี้สามารถเจริญได้ดีที่สุดในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือตั้งแต่ 2.5-5.2 โมลาร์ (15.0-30.0 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียพวก Halobacteria และ Halococci จุลินทรีย์พวกนี้มักจะมีลักษณะเป็นสีแดง (red halophile) (Kushner, 1978)

Valera (1988) ได้รายงานว่าเชื้อจุลินทรีย์ทนเกลือจะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) แต่ก็ยังสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเกลือ NaCl สูงกว่าในน้ำทะเล นอกจากนั้นในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูง (hypersaline environmental) เชื้อจุลินทรีย์ทนเกลียวยังคงมีกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ สำหรับเชื้อแบคทีเรียทนเกลือที่สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือ NaCl สูงกว่า 2.5 โมลาร์ จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียทนเกลือความเข้มข้นสูง (extreamely halotolerant bacteria)

Kushner (1978) ได้รายงานว่าสาเหตุที่ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตลดลง เนื่องจากปริมาณน้ำอิสระที่เซลล์สามารถนำไปใช้ได้หรือที่เรียกว่าค่า water activity (a_w) ที่อยู่ในระบบมีปริมาณต่ำ โดยถ้าปริมาณน้ำอิสระที่เซลล์สามารถนำไปใช้ได้ภายนอกเซลล์ต่ำกว่าภายในเซลล์ น้ำภายในเซลล์จะไหลออกนอกเซลล์ทำให้สารต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์มีความเข้มข้น

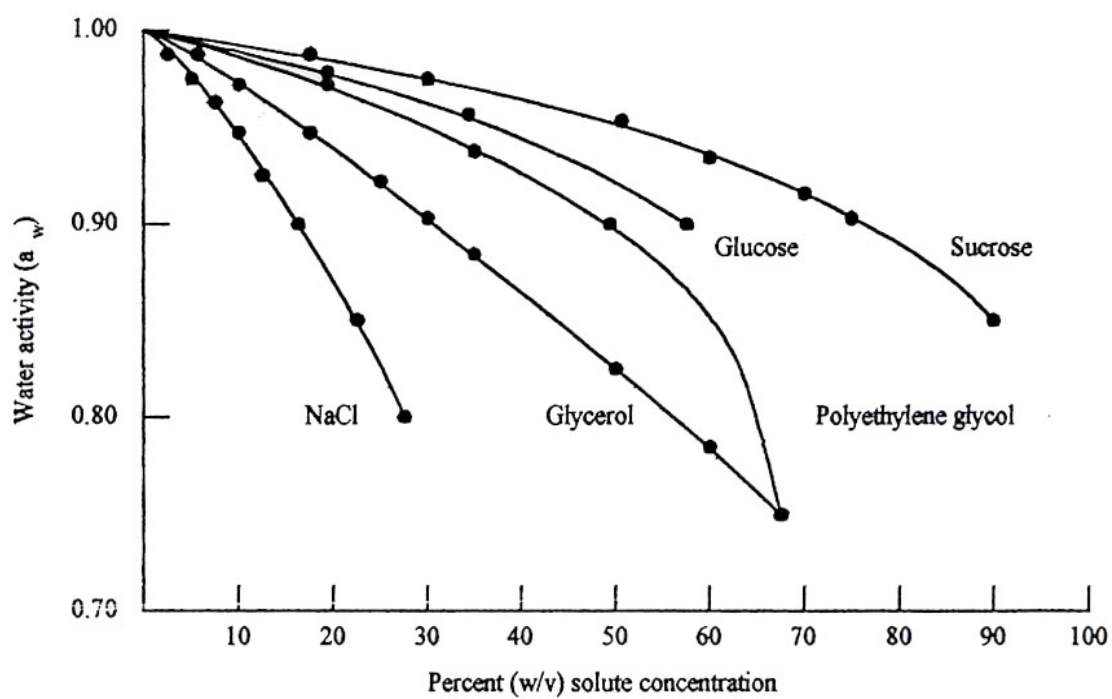
สูงมากขึ้นซึ่งจะส่งผลกระทบต่อระบบการทำงานภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวถูกละลาย (solute) ชนิดต่าง ๆ กับค่า water activity (a_w) ในสารละลายแต่ละชนิดแสดงดังภาพที่ 2

ค่า water activity (a_w) ต่ำที่สุดที่เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญได้แสดงดังตารางที่ 3 เชื้อจุลินทรีย์ชอบเกลือและทนเกลือซึ่งสามารถเจริญได้ในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือสูงจะเจริญได้ในที่มีค่า a_w ก่อนข้างต่ำคือระหว่าง 0.75-0.86 เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวจะมีไซโตพลาสซึมที่เหมาะสมกับสภาพความเค็มสูง สำหรับพวก eubacteria จะเจริญได้ในที่มีค่า a_w ประมาณ 0.90 โดยจะรักษาแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ให้สูงกว่าภายนอกเซลล์ เนื่องจากถ้าแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ต่ำกว่าภายนอกเซลล์ น้ำจะไหลออกนอกเซลล์และขนาดของไซโตพลาสซึมจะลดลงโดยในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกไซโตพลาสซึมจะมีลักษณะเหี่ยวยุบ (plasmolysed) ส่วนเชื้อแบคทีเรียแกรมลบผนังเซลล์จะดึงส่วนของเซลล์เมมเบรนเข้ามาทำให้เซลล์เมมเบรนถูกทำลาย (Kushner, 1978) ความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาพที่มีค่าของแรงดันออสโมติกที่แตกต่างกัน (osmotic tolerant) เกิดจากการที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถปรับแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ให้สูงกว่าภายนอกเซลล์อยู่เสมอ การสะสม K^+ ภายในเซลล์มีบทบาทสำคัญในการรักษาระดับแรงดันออสโมติก นอกจากนั้นเซลล์จุลินทรีย์ยังมีการสะสมสารชนิดอื่น ๆ ที่เรียกว่า “osmoregulator” หรือ “compatible solute” ซึ่งทำหน้าที่ปรับสภาพแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ สารดังกล่าวได้แก่ กรดอะมิโนบางชนิด เช่น glutamate, glutamine, alanine หรือน้ำตาลบางชนิด เช่น sucrose, trehalose และ glucosylglycerol เป็นต้น (วิเชียร, 2539) เชื้อแบคทีเรียชอบเกลือและทนเกลือส่วนใหญ่จะสะสม compatible solute ที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ไว้ภายในเซลล์ เนื่องจากสารดังกล่าวจะช่วยรักษาระดับของแรงดันออสโมติก เกี่ยวข้องในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ และมีผลต่อความคงทนและการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ สาร compatible solute ที่สำคัญในเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือได้แก่ betaine และ ectoin (Ventosa and Nieto, 1995)

Kushner and Kamekura (1988) ได้รายงานว่า การเพิ่มความเข้มข้นของเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือในสภาพแวดล้อมจะทำให้ปริมาณฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ในไซโตพลาสซึมของเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ส่วนเชื้อแบคทีเรียทนเกลือและชอบเกลือความเข้มข้นต่ำจะรักษาความเข้มข้นของ Na^+ ภายในเซลล์อยู่ในระดับต่ำ ได้มีการศึกษาสภาวะของ Na^+ และไอออนอื่น ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์โดยใช้ nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) พบว่าความเข้มข้นของ K^+ ภายในเซลล์จะสูงกว่าภายนอกเซลล์ ส่วนความเข้มข้นของ Na^+ ภายในเซลล์

จะต่ำกว่าภายนอกเซลล์ ซึ่งทั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ชอบเกลือและทนเกลือจะมีลักษณะดังกล่าวเหมือนกัน ในสิ่งมีชีวิตทั่ว ๆ ไป Na^+ มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของเซลล์ สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ทนเกลือหรือชอบเกลือความเข้มข้นต่ำต้องการ Na^+ เพื่อช่วยกลไกการขนส่งสารเข้าสู่เซลล์ ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ชอบเกลือความเข้มข้นสูงต้องการ Na^+ เพื่อเป็นสภาวะสภาพและการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้ต้องการ Na^+ เพื่อให้สามารถทำงานได้ดี นอกจากนี้ Na^+ ยังช่วยทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ซึ่งไม่ใช่ peptidoglycan แต่เป็นโมเลกุลโปรตีนมีความแข็งแรงโดยเพิ่มแรงยึดเกาะระหว่างหน่วยย่อย (subunit) ของโมเลกุลโปรตีน (วิเชียร, 2539)

ภาพที่ 3 แสดงกลไกการถ่ายโอนพลังงาน (energy transduction) เปรียบเทียบระหว่างเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือกับเชื้อแบคทีเรียทนเกลือ การขนส่งโปรตอน (H^+) เข้าสู่เซลล์ขณะที่ Na^+ ผ่านออกนอกเซลล์ (Na^+/H^+ antiporters) จะมีบทบาทสำคัญในกลไกการควบคุมและทำให้เกิดความสมดุลของไอออน (ion homeostasis) ของเซลล์ การขนส่ง Na^+ ผ่านเข้าออกเซลล์โดยอาศัยการผ่านเข้าของโปรตอน (Na^+ coupled secondary transport) จะพบได้บ่อยในระหว่างการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ชอบสภาวะที่รุนแรง (extremophilic bacteria) และพวก archaea ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงช่วงพีเอชที่เป็นด่าง หรือมีสภาพความเค็มสูง ส่วนการขนส่งโปรตอนที่เกิดจากแรงขับเคลื่อนโปรตอน (H^+ coupled transport) จะพบได้บ่อยในเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ชอบสภาวะที่รุนแรง (non-extremophilic bacteria) และเชื้อแบคทีเรียที่ชอบความเป็นกรด (acidophile) เชื้อแบคทีเรียชอบเกลือจะได้รับ ATP (adenosine triphosphate) ซึ่งเป็นสารที่ให้พลังงานสูงจากระบบการขนส่งโปรตอนแบบไม่ควบคู่ (H^+ noncoupled transport system) ส่วนเชื้อแบคทีเรียทนเกลือจะได้รับ ATP จากระบบการขนส่ง Na^+ และโปรตอนแบบควบคู่ (Na^+/H^+ coupled transport system) (Speelmanns *et al.*, 1995)



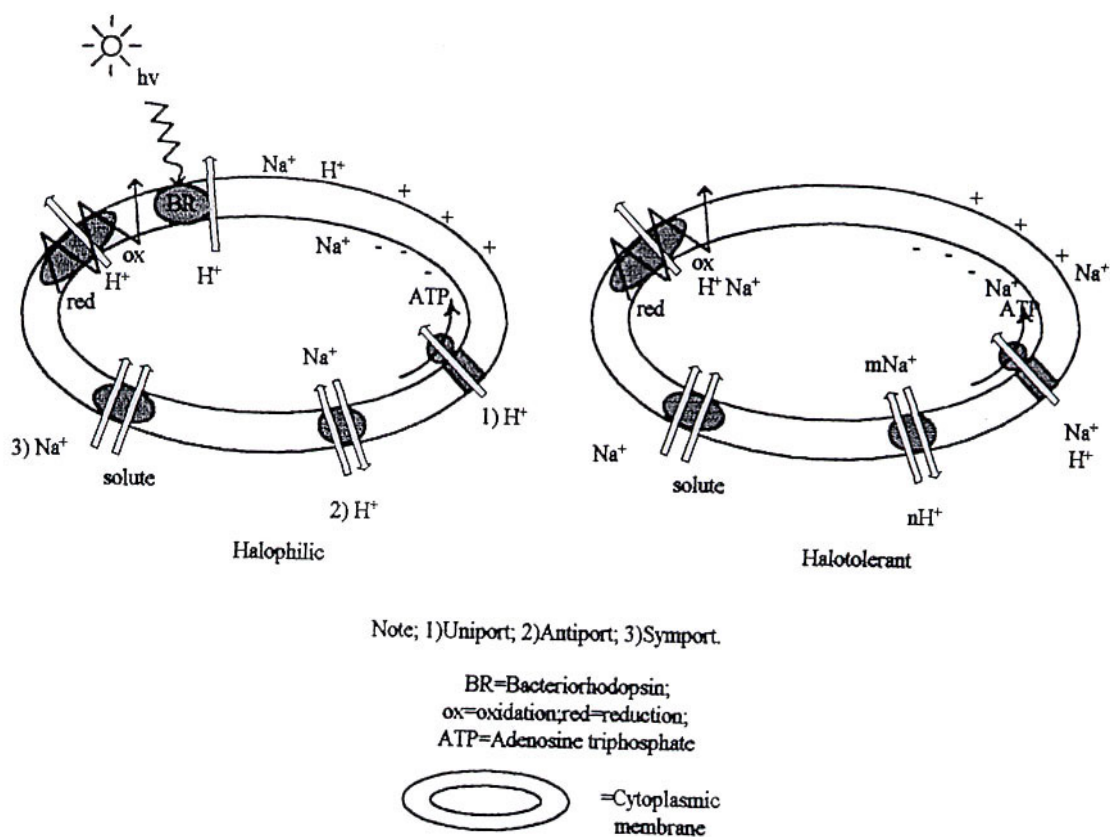
ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวถูกละลาย (solute) ชนิดต่าง ๆ กับค่า water activity (a_w) ในสารละลายแต่ละชนิด

ที่มา: Kushner (1978)

ตารางที่ 3 ค่า water activity (a_w) ต่ำที่สุดที่เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญได้

Organisms		Lower limit
Fungi	<i>Rhizopus nigricans</i>	0.93
	<i>Aspergillus flavus</i>	0.90
	<i>A. niger</i>	0.84
Yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.94 (in NaCl)
		0.92 (in glucose)
	<i>S. rouxii</i>	0.86 (in NaCl)
		0.857 (in sucrose)
Bacteria		0.845 (in glucose)
	<i>Bacillus subtilis</i>	0.949
	<i>Escherichia coli</i>	0.932
	<i>Lactobacillus</i>	0.90
Halotolerant	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.86-0.88
Moderate halophiles	<i>Vibrio costicola</i>	0.86-0.98 (in NaCl)
	<i>Paracoccus halodenitrificans</i>	0.86-0.98 (in NaCl)
Extreme halophiles	Halobacteria and Halococci	0.75-0.88 (in NaCl)

ที่มา: Kushner (1978)



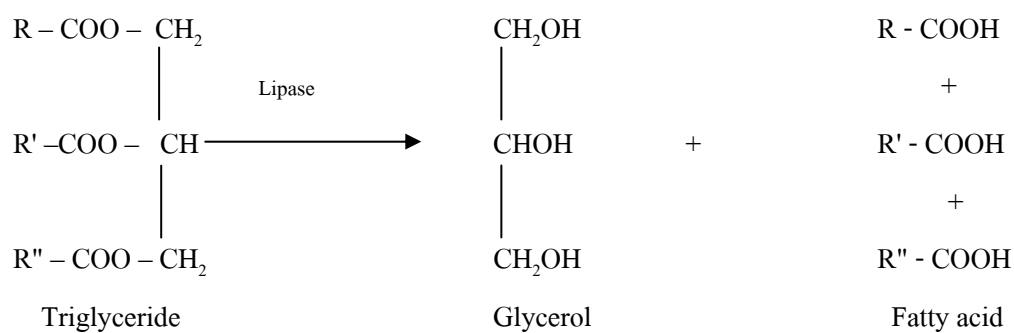
ภาพที่ 3 กลไกการถ่ายโอนพลังงาน (energy transduction) เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียชอบเกลือ กับแบคทีเรียทนเกลือ

ที่มา: Speelmans *et al.* (1995)

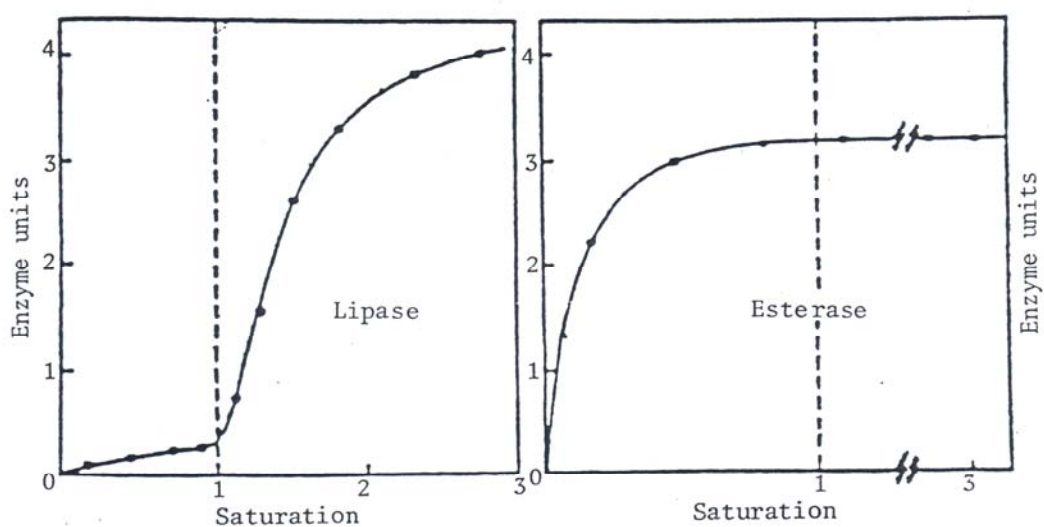
7. ลักษณะทั่วไปของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส (Lipase) หรือ triacylglycerol acylhydrolase หรือ glycerol ester hydrolase (EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ได้เป็นกลีเซอรอล (glycerol) และกรดไขมัน (fatty acid) โดยเอนไซม์ไลเปสจะย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ (ester bond) ที่อยู่ระหว่างกรดไขมันกับกลีเซอรอลในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ เอนไซม์ไลเปสจะทำปฏิกิริยาดังกล่าวได้ดีเมื่อไตรกลีเซอไรด์อยู่ในสภาพที่ไม่ละลายน้ำ (water-insoluble substrate) หรืออยู่ในสภาพที่มีการสัมผัสของน้ำและน้ำมัน (oil-water interface) (Jensen, 1983; Macrae, 1983) ซึ่งเรียกลักษณะการทำงานของเอนไซม์ไลเปสว่า “interfacial activation” (Jaeger *et al.*, 1994; Jaeger and Reetz, 1998; Weete, 1998; Sharma *et al.*, 2001) กลไกการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ของเอนไซม์ไลเปสแสดงดังภาพที่ 4

เอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ได้เหมือนกัน โดยเอนไซม์เอสเทอเรสหมายถึงเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ของกรดคาร์บอกซิลิกได้ทุกชนิด ดังนั้นเอนไซม์เอสเทอเรสจะรวมถึงเอนไซม์เปปติเดส (peptidase) เช่น ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) และปาเปน (papain) รวมทั้งเอนไซม์เพคตินเมทิลเอสเทอเรส (pectin methyl esterase) ด้วย (Shahani, 1975) ลักษณะที่แตกต่างกันของเอนไซม์ไลเปสและเอสเทอเรสซึ่งสามารถใช้ในการจำแนกเอนไซม์ทั้งสอง คือ เอนไซม์เอสเทอเรสจะทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่อยู่ในสภาพที่ละลายน้ำ (water-soluble substrate) เท่านั้น ส่วนเอนไซม์ไลเปสจะทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่อยู่ในสภาพไม่ละลายน้ำ (water-insoluble substrate) ที่บริเวณที่มีการสัมผัสกับน้ำและน้ำมัน (oil-water interface) โดยเมื่อสับสเตรทมีความเข้มข้นสูง ๆ เกินความสามารถในการละลายจะทำให้เอนไซม์ไลเปสสามารถทำงานได้ดีขึ้น (Shahani, 1975; Wong, 1995; Weete, 1998) ลักษณะการทำงานของเอนไซม์ไลเปสและเอสเทอเรสแสดงดังภาพที่ 5



ภาพที่ 4 ปฏิกริยาการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ด้วยเอนไซม์ไลเปส
ที่มา: Jaeger and Reetz (1998)



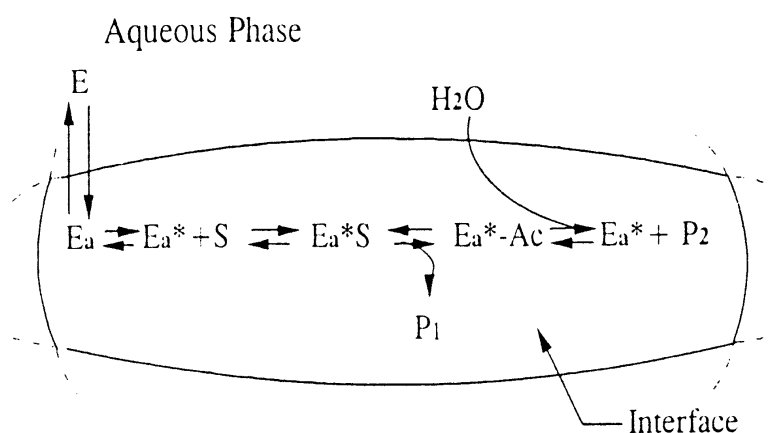
ภาพที่ 5 ลักษณะการทำงานที่แตกต่างกันระหว่างเอนไซม์ไลเปสและเอสเทอเรส
ที่มา: Shahani (1975)

8. กลไกการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรทพวกไขมันที่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมัน (oil–water interface) เรียกว่า “interfacial activation” ซึ่งกลไกการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจะเกี่ยวข้องกับ 2 กระบวนการ (Wong, 1995; Weete, 1998) ดังนี้

1. เอนไซม์ไลเปสจะถูกดูดซึม (adsorption) เข้าที่บริเวณผิวสัมผัส (interface) ระหว่างน้ำและน้ำมัน ทำให้รูปร่างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงเป็นเอนไซม์ที่พร้อมจะทำงาน (activated enzyme)

2. เอนไซม์จะเข้าทำปฏิกิริยากับสับสเตรทอยู่ในรูป “enzyme–substrate complex” เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ และเอนไซม์ถูกปล่อยออกมาจากบริเวณผิวสัมผัสไปอยู่ในส่วนที่เป็นน้ำซึ่งจะอยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ (inactivated enzyme) เมื่อเอนไซม์จะทำงานก็จะผ่านเข้ามาบริเวณผิวสัมผัสและทำการย่อยสลายสับสเตรทตามขั้นตอนที่ 1 และ 2 ต่อไปได้อีก กลไกการทำงานของเอนไซม์ไลเปสแสดงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 กลไกการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

หมายเหตุ E = enzyme in the aqueous phase, E_a = enzyme adsorbed at the interface,

E_a* = activated enzyme, S = substrate, E_a*S = enzyme substrate complex,

E_a*-Ac = acylenzyme, P₁ = product (diacylglycerol), P₂ = product (fatty acid)

ที่มา: Weete (1998)

เอนไซม์ไลเปสสามารถทำปฏิกิริยาได้ 3 ชนิดคือ hydrolysis of ester, synthesis of ester (esterification) และ transesterification (ปฏิกิริยานี้ประกอบด้วยปฏิกิริยาย่อย 4 ปฏิกิริยา คือ acidolysis, alcoholysis, ester exchange และ aminolysis) แสดงดังภาพที่ 7

1. Hydrolysis of ester



2. Synthesis of ester



3. Transesterification

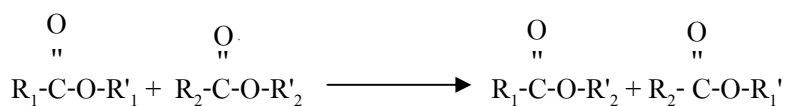
3.1 Acidolysis



3.2 Alcoholysis



3.3 Ester exchange (Interesterification)



3.4 Aminolysis



ภาพที่ 7 ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

ที่มา: Yamane (1987)

9. แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสพบได้ทั่วไปในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ในพืชจะพบเอนไซม์ไลเปสจากพวกธัญชาติและพืชน้ำมัน เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโอต ข้าวไรย์ (rye) ฝ้าย ถั่วเหลือง ละหุ่ง ปาล์ม น้ำมัน ข้าวโพด เมล็ดทานตะวัน และมะกอก (ณัฏฐภัทร, 2547; Arnold *et al.*, 1975) เอนไซม์ไลเปสในสัตว์จะพบในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ตับอ่อน (pancreatic lipase) ในน้ำนม (milk lipase) รวมถึงแมลงโดยเฉพาะ *Cephaloleia presignis* (ณัฏฐภัทร, 2547; Shahani, 1975) สำหรับเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์จะเป็นแหล่งที่ได้รับความสนใจและถูกนำมาใช้ในทางการค้ามากที่สุด เนื่องจากจุลินทรีย์จะเจริญได้รวดเร็วและเลี้ยงง่ายกว่าสัตว์ สามารถเพิ่มผลผลิตได้รวดเร็วโดยวิธีการปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ นอกจากนั้นยังสามารถปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้ง่ายกว่าและการสกัดเอนไซม์เพื่อนำมาใช้ประโยชน์จะง่ายกว่าพืชและสัตว์ (กิตติเดช, 2532; ณัฏฐภัทร, 2547)

เอนไซม์ไลเปสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา โดยเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์จะมีคุณสมบัติเฉพาะที่สำคัญ คือ มีความคงทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ ในการทำงานไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ (cofactors) มีความจำเพาะต่อสับสเตรทหลายชนิด และมี enantioselectivity สูง เอนไซม์ไลเปสสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวกที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Propionibacterium* sp. และ *Burkholderia* sp. เป็นต้น ส่วนแบคทีเรียแกรมลบที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ *Pseudomonas* sp., *Chromobacterium* sp., *Acinetobacter* sp. และ *Aeromonas* sp. เป็นต้น เชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp., *Geotrichum* sp. และ *Fusarium* sp. เป็นต้น สำหรับยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ *Candida* sp., *Saccharomyces* sp., *Yarrowia* sp. และ *Pichia* sp. เป็นต้น (กิตติเดช, 2532; ณัฏฐภัทร, 2547; Sharma *et al.*, 2001)

10. ประเภทของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์

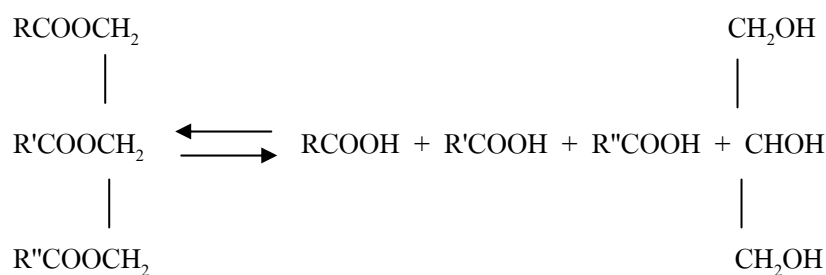
เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์สามารถแบ่งตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (positional specificity) ออกเป็น 3 กลุ่ม (Macrae, 1983) ได้แก่

1. เอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (nonspecific lipase) เอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้ไม่มีความจำเพาะในการย่อยสลายกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ดังนั้นเอนไซม์ไลเปสพวกนี้จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้อย่างสมบูรณ์ได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ แต่อาจจะพบ diglyceride หรือ monoglyceride เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus* ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสกลุ่มนี้แสดงดังภาพที่ 8

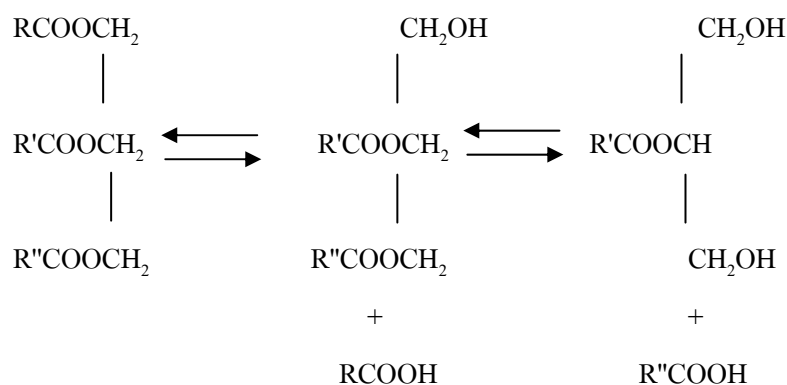
2. เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (1,3-specific lipase) เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อการย่อยกรดไขมันที่ตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งจะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้เป็นผลิตภัณฑ์คือ 1,2,(2,3)-diglyceride และ 2-monoglyceride เนื่องจาก 1,2,(2,3)-diglyceride และ 2-monoglyceride เป็นไขมันที่ไม่คงตัวถ้ามีการบ่มไว้เป็นเวลานานจะเกิดการเคลื่อนย้ายหมู่เอซิล (acyl migration) ได้เป็น 1,3-diglyceride และ 1(3)-monoglyceride ซึ่งจะถูกละลายต่อไปได้อย่างสมบูรณ์ได้กรดไขมันและกลีเซอรอล ตัวอย่างของเอนไซม์นี้ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจาก *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* และ *Rhizopus* sp. ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้แสดงในภาพที่ 8

3. เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (fatty acid specific lipase) เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติในข้อนี้ ยกเว้นเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Geotrichum candidum* ที่จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ที่มี cis double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ดี แต่จะย่อยสลายกรดไขมันอิ่มตัวกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ไม่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่งที่ 9 ได้ไม่ดี ปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มนี้แสดงในภาพที่ 8

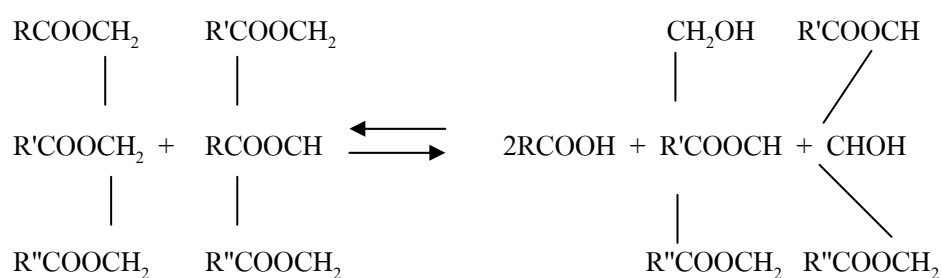
1. เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (Nonspecific lipase)



2. เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (1,3 specific lipase)



3. เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนไตรกลีเซอไรด์ (fatty acid specific lipase)



ภาพที่ 8 ชนิดของเอนไซม์ไลเปสแบ่งตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์

ที่มา: Macrae(1983)

11. การใช้เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม

เอนไซม์ไลเปสได้ถูกนำมาใช้ให้เป็นประโยชน์ในหลายทางด้วยกัน เช่น ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก อาหาร การสังเคราะห์สารเคมีและยา การผลิตกระดาษ การผลิตเครื่องสำอาง และการบำบัดของเสียที่มีไขมัน (Sharma *et al.*, 2001) การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียแสดงในตารางที่ 4 ในอุตสาหกรรมอาหารเอนไซม์ไลเปสจะเป็นตัวผลิตกลิ่นรส (flavor) ให้อาหารชนิดนั้น ๆ มีกลิ่นรสที่เฉพาะตัวและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค รูปแบบการใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมอาหารหมักนั้น มีทั้งตั้งใจเติมเอนไซม์ไลเปสลงไปเพื่อให้ได้ตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้ได้แก่ โยเกิร์ต เนยแข็ง เค้ก และนมช็อกโกแลต เป็นต้น หรืออาจใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารเหล่านั้นเป็นตัวให้กลิ่นรสก็ได้ เช่น แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกจะผลิตเอนไซม์ไลเปสทำให้มีกลิ่นรสในอาหารเนื้อหมัก ไส้กรอก และผักดอง เช่น แดงกวาดองและกะหล่ำปลีดอง (Seitz, 1974) เอนไซม์ไลเปสสามารถใช้ในการปรับปรุงคุณสมบัติของไขมันโดยการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งจะทำให้ผลิตภัณฑ์นั้นมีคุณสมบัติตามที่ต้องการ วิธีนี้ทำให้ได้น้ำมันชนิดใหม่ ๆ และนำไปสู่การพัฒนาสารให้กลิ่นรสในอาหารด้วย (ณกัญภัทร, 2547) นอกจากนี้ยังมีการนำเอนไซม์ไลเปสไปใช้ในกระบวนการผลิตกรดไขมันด้วย เพราะกรดไขมันที่ได้จากกระบวนการผลิตทางเคมีต้องใช้ความร้อนและความดันสูงทำให้มีข้อเสียคือ ต้องใช้อุปกรณ์ราคาแพงที่สามารถทนความร้อนสูงได้ รวมทั้งวิธีนี้สิ้นเปลืองพลังงาน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีคล้ำ และมีการสลายตัวของสารที่ไม่ต้องการด้วย ซึ่งถ้าใช้เอนไซม์ไลเปสทำงานแทนที่แล้ว ข้อเสียต่างๆเหล่านี้จะหมดไป

เอนไซม์ไลเปสพวก alkaline lipase สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ 2 ทางสำคัญคือ ใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก และใช้แทน pancreatic lipase ในทางการแพทย์ ปัจจุบันเอนไซม์ไลเปสได้ถูกใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกในปริมาณที่สูง โดยเอนไซม์ไลเปสจะช่วยย่อยสลายไขมันและน้ำมันบนเสื้อผ้า ดังนั้นคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก จะต้องมีความต่างดังต่อไปนี้ คือ ต้องมีความจำเพาะต่อสับสเตรตต่ำ โดยจะต้องมีความสามารถในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันได้หลายชนิด ต้องทนต่อสภาวะในการซักล้าง คือ พีเอช 10.0-11.0 อุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส และต้องทนต่อสารลดแรงตึงผิวและเอนไซม์ต่างๆ เช่น linear alkyl benzene sulfonates (LAS) และเอนไซม์โปรติเอสซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในผงซักฟอก (Sharma *et al.*, 2001)

ตารางที่ 4 การใช้เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม

Industry	Action	Product or application
Detergents	Hydrolysis of fats	Removal of oil stains from fabrics
Dairy foods	Hydrolysis of milk fat, cheese ripening, modification of butter fat	Development of flavoring agents in milk, cheese and butter
Bakery foods	Flavor improvement	Shelf-life prolongation
Beverages	Improved aroma	Beverages
Food dressings	Quality improvement	Mayonnaise, dressing and whippings
Health foods	Transesterification	Health foods
Meat and fish	Flavor development	Meat and fish product, fat removal
Fats and oils	Transesterification, hydrolysis	Cocoa butter, margarine, fatty acids, glycerol, mono-and diglycerids
Chemicals	Enantioselectivity, synthesis	Chiral building blocks, chemicals
Pharmaceuticals	Transesterification; hydrolysis	Specialty lipids, digestive aids
Cosmetics	Synthesis	Emulsifiers, moisturizers
Leather	Hydrolysis	Leather products
Paper	Hydrolysis	Paper with improved quality
Cleaning	Hydrolysis	Removal of fats

ที่มา: Sharma *et al.* (2001)

12. บทบาทของเอนไซม์นิวคลีเอสในการทำให้เกิดสารเสริมรสชาติในผลิตภัณฑ์อาหาร

เอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease) เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายกรดนิวคลีอิกให้เป็นสารประกอบนิวคลีโอไทด์ (2', 3', 5'-nucleotides) เอนไซม์นี้จะทำลายพันธะระหว่างน้ำตาลกับฟอสเฟต โดยถ้าเป็นการตัดพันธะที่เชื่อมระหว่าง 3' ของน้ำตาลกับฟอสเฟตจะเรียกว่าการตัดชนิด p-type และถ้าเป็นการตัดระหว่างพันธะที่เชื่อมระหว่าง 5' ของน้ำตาลกับฟอสเฟตจะเรียกว่าการตัดชนิด d-type เอนไซม์นิวคลีเอสเมื่อแบ่งตามลักษณะการทำงานจะแบ่งได้ 2 ประเภทคือ เอ็กโซนิวคลีเอส (exonuclease) จะทำลายพันธะจากปลายของกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid, DNA) หรือกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid, RNA) เข้ามาทีละพันธะ และเอ็นโดนิวคลีเอส (endonuclease) ซึ่งจะทำลายพันธะที่อยู่ภายในสาย DNA หรือ RNA (เรื่องลักษณะ, 2539)

เอนไซม์นิวคลีเอสมี 2 ชนิดที่สำคัญคือ ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (deoxyribonuclease, DNase) และไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease, RNase) โดยเอนไซม์ DNase จะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย DNA ให้เป็นสารประกอบนิวคลีโอไทด์กัวโนซีน 5'-โมโนฟอสเฟต (guanosine 5'-monophosphate, 5'-GMP), อะดีโนซีน 5'-โมโนฟอสเฟต (adenosine 5'-monophosphate, 5'-AMP), ไซทิดีน 5'-โมโนฟอสเฟต (cytidine 5'-monophosphate, 5'-CMP) และ ไทมิน 5'-โมโนฟอสเฟต (thymine 5'-monophosphate, 5'-TMP) ส่วนเอนไซม์ RNase จะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย RNA ให้เป็นสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP, 5'-AMP, 5'-CMP และยูริดีน 5'-โมโนฟอสเฟต (uridine 5'-monophosphate, 5'-UMP) ปฏิกิริยาการย่อยสลาย RNA โดยเอนไซม์นิวคลีเอสแสดงได้ดังภาพที่ 9 โดยเอนไซม์นิวคลีเอสจะตัดพันธะที่เชื่อมระหว่าง 3' ของน้ำตาลกับฟอสเฟตได้สารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP, 5'-AMP, 5'-CMP และ 5'-UMP ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าสารประกอบนิวคลีโอไทด์โดยเฉพาะ 5'-GMP และอิโนซีน 5'-โมโนฟอสเฟต (inosine 5'-monophosphate, 5'-IMP) ที่ได้จากการเปลี่ยน 5'-AMP โดยปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะมิโน (deamination) จะมีรสชาติเฉพาะตัวและจัดเป็นสารเสริมรสชาติ (flavor enhancers, flavor potentiators) ในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ โดยจะช่วยทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีรสชาติดีขึ้นเรียกรสชาตินี้ว่า อูมามิ (umami taste) (Kuninaka, 1996) มีรายงานเกี่ยวกับความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาเสริมรสชาติร่วมกัน (specific synergistic action) ของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP หรือ 5'-IMP กับโมโนโซเดียมกลูตาเมต (monosodium glutamate, MSG) ปฏิกิริยาเสริมรสชาติร่วมกันของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP หรือ

5'-IMP กับ MSG จะทำให้ระดับรสชาติอูมามิในผลิตภัณฑ์อาหารสูงขึ้นมากกว่ารสชาติของ 5'-GMP, 5'-IMP หรือ MSG อย่างเดียว นอกจากนั้นอัตราส่วนที่เหมาะสมของ 5'-GMP หรือ 5'-IMP กับ MSG จะทำให้ระดับรสชาติอูมามิในผลิตภัณฑ์อาหารสูงที่สุดด้วย (Kuninaka *et al.*, 1961)

อนันต์ (2545) ได้ทำการผลิตเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่ชอบเกลือ (halophilic ribonuclease) ซึ่งสามารถทำงานได้ดีในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือ NaCl 3.0 โมลาร์ จากแบคทีเรียทนเกลือ *Pseudomonas* sp. No. 3241 และทดลองเติมเอนไซม์ลงไปร่วมกับการหมักน้ำปลา พบว่า การเติมเอนไซม์ลงไปภายหลังการหมักน้ำปลาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะทำให้สารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP ในน้ำปลาเพิ่มสูงขึ้น ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่ชอบเกลือ สำหรับใช้ร่วมกับการหมักน้ำปลาคือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก)

Kamekura and Onishi (1974) พบว่าเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นปานกลาง *Micrococcus varians* ที่แยกจากกากชีวี่ สามารถผลิตเอนไซม์นิวคลีเอสแล้วขับออกมานอกเซลล์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) หรือเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ความเข้มข้น 1.0-4.0 โมลาร์ เอนไซม์นิวคลีเอสเมื่อถูกทำให้บริสุทธิ์จะมีกิจกรรมของทั้งเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (RNase) และดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (DNase) เอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือ NaCl 2.9 โมลาร์ หรือเกลือ KCl 2.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จึงจัดเป็นเอนไซม์นิวคลีเอสที่ชอบเกลือ (halophilic nuclease) กิจกรรมของเอนไซม์จะสูญเสียไปเมื่อนำไปผ่านการไลอะไลซิสในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเกลือต่ำ และเมื่อนำเอนไซม์ไปเมื่อนำไปผ่านการไลอะไลซิสในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเกลือ NaCl 3.4 โมลาร์ กิจกรรมของเอนไซม์จะกลับคืนมา 77.0 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น

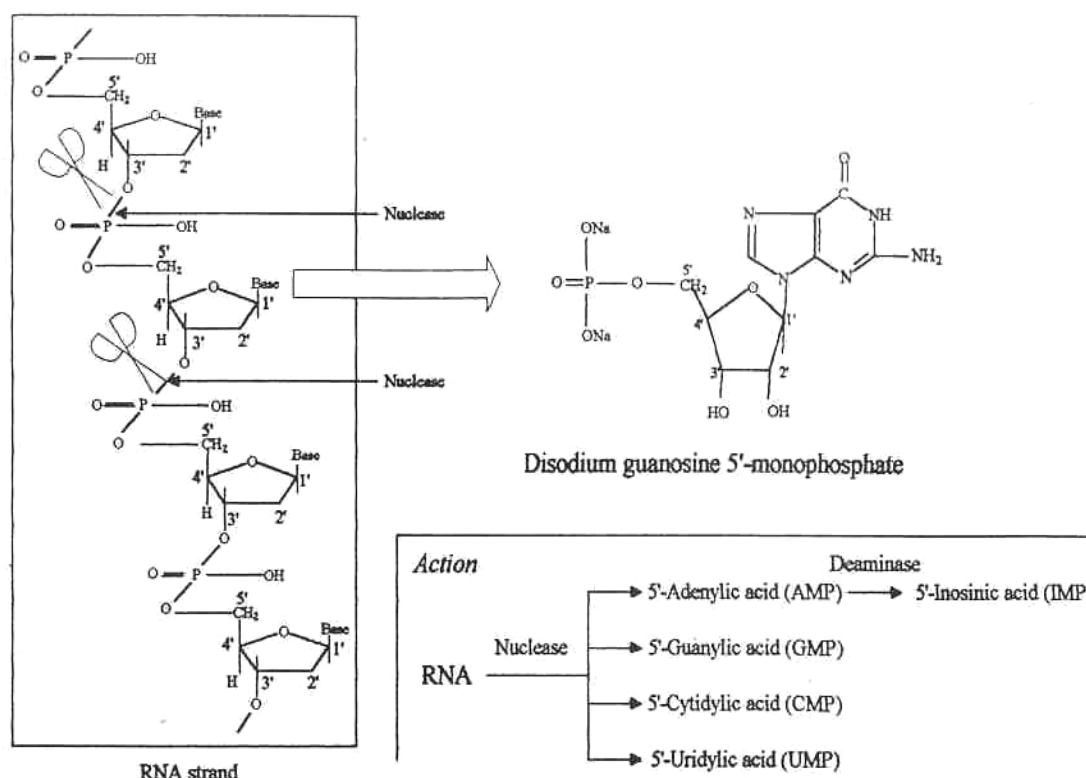
Kamekura and Onishi (1978) ได้เสนอชื่อเอนไซม์นิวคลีเอสที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Micrococcus varians* var. *halophilus* ว่า “nuclease H” ซึ่งหมายถึงเอนไซม์นิวคลีเอสที่ชอบเกลือ (halophilic nuclease) โดยเอนไซม์จะต้องการเกลือเพื่อให้การทำงานมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

Kamekura *et al.* (1982) ได้ทดลองใช้เอนไซม์นิวคลีเอสที่ชอบเกลือ (halophilic nuclease H) จากเชื้อแบคทีเรีย *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* ผลิตสารประกอบนิวคลีโอไทด์จาก RNA ที่สกัดจากยีสต์แห้ง (commercial dry yeast) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

พบว่าเอนไซม์นิวคลีเอสสามารถผลิตสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP ได้ผลผลิตเท่ากับ 805 มิลลิกรัมต่อ RNA 5 กรัม

Onishi *et al.* (1983) พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ชอบเกลือความเข้มข้นปานกลาง *Bacillus* sp. N23-2 (Ventosa, 1991) ที่แยกจากซากไม้ สามารถผลิตเอนไซม์นิวคลีเอสแล้วขับออกมานอกเซลล์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 1.0-2.0 โมลาร์ เอนไซม์นิวคลีเอสเมื่อถูกทำให้บริสุทธิ์จะมีกิจกรรมของทั้งเอนไซม์ RNase และ DNase เอนไซม์นี้มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์นิวคลีเอสที่ชอบเกลือ (halophilic nuclease) โดยจะทำงานได้ดีที่สุดในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือ NaCl 1.4-3.2 โมลาร์ หรือเกลือ KCl 2.3-3.2 โมลาร์ เอนไซม์สามารถผลิตสารประกอบนิวคลีโอไทด์ (5'-mononucleotide) จาก DNA และ RNA โดยจะทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 8.5 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสกับ DNA และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสกับ RNA

Hayashi *et al.* (1996) ได้รายงานเกี่ยวกับการผลิตสารประกอบ 5'-ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (5'-deoxyribonucleotides) จากของเหลวที่สกัดจากอวัยวะเพศของปลาแซลมอน (salmon milt) โดยใช้การย่อยสลายด้วยเอนไซม์แบบสองขั้นตอน เอนไซม์ที่ใช้คือ เอนไซม์แอคติเนส AS (Actinase AS) จากเชื้อ *Streptomyces griseus* (ของบริษัท Kaken Pharmaceutical ประเทศญี่ปุ่น) และเอนไซม์นิวคลีเอสจากเชื้อรา *Penicillium citrinum* (ของบริษัท Amano Pharmaceutical ประเทศญี่ปุ่น) พบว่าสามารถผลิตสารประกอบ 5'-ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ได้เท่ากับ 47 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ DNA เริ่มต้น และผลิตสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-กรดดีออกซีอะดีนิก (5'-deoxyadenylic acid, 5'-dAMP) และ 5'-กรดดีออกซีกวานิลิก (5'-deoxyguanylic acid, 5'-dGMP) ได้เท่ากับ 17 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 9 ปฏิกริยาการย่อยสลายกรดไรโบนิวคลีอิกด้วยเอนไซม์นิวคลีเอส

หมายเหตุ Base = Adenine, Guanine, Uracil, Cytosine

ที่มา: Black (1993)

13. การใช้เอนไซม์โปรติเอสในกระบวนการหมักน้ำปลา

เอนไซม์โปรติเอส (peptide hydrolase: EC 3.4) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนหรือสายพอลิเพปไทด์ให้มีโมเลกุลเล็กลง โดยทำลายพันธะเพปไทด์ เมื่อการย่อยสลายสมบูรณ์จะได้กรดอะมิโน เอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนมีหลายชนิด เช่น เปปซิน ไคโมทริปซิน ทริปซิน และปาเปอซิน เป็นต้น นอกจากนี้พืชและสัตว์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้แล้ว พบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ เช่น *Bacillus* sp., *Aspergillus* sp., *Mucor* sp. และ *Rhizopus* sp. เป็นต้น เอนไซม์โปรติเอสใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ หลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมซักล้าง อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมนมและเนย อุตสาหกรรมยา เป็นต้น (นวลพรรณ, 2540)

การผลิตน้ำปลาในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ใช้การหมักโดยวิธีธรรมชาติแบบดั้งเดิมซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการหมักนาน 6-12 เดือน สาเหตุเนื่องมาจากปริมาณเกลือที่ใช้ในการหมักสูงมาก ได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการหมักน้ำปลาโดยใช้วิธีการต่าง ๆ เช่น การใช้กรด-ด่าง การใช้เชื้อจุลินทรีย์ การใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เพื่อเร่งกระบวนการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลาให้กลายเป็นน้ำปลาเร็วขึ้น ซึ่งการศึกษาวินิจฉัยเพื่อพัฒนากระบวนการหมักน้ำปลาส่วนใหญ่จะเป็นการพัฒนาเพื่อย่นระยะเวลาในการหมักน้ำปลา

เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตขายเป็นการค้า อาทิเช่น biopase, pronase, papain, bromelain และ ficin ได้ถูกนำมาทดลองหมักน้ำปลา (Murayama *et al.*, 1962) โดย biopase และ pronase สามารถย่นระยะเวลาในการหมักน้ำปลาให้เหลือ 70 วัน และให้น้ำปลาที่มีคุณภาพดี ปราศจากพิษ (2507) พบว่า ทั้งเอนไซม์ biopase และ papain สามารถเร่งการเกิดน้ำปลาได้ ภายในเวลา 48 วัน โดยในระยะแรกของการหมัก papain จะให้อะมิโนไนโตรเจนออกมามากกว่า biopase และได้แนะนำให้ใช้ papain ในการหมักในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากยางมะละกอหาง่ายราคาถูก

ชนานันท์ และ ช่อฟ้า (2527) ทดลองใช้น้ำย่อยโปรตีน 2 ชนิด ซึ่งได้แก่ proteinase T และ crude pyloric enzyme จากปลาทะเล ร่วมกับแบคทีเรียชอบเกลือหมักน้ำปลา สรุปได้ว่า การเติม pyloric enzyme ได้น้ำปลาสีน้ำตาล และขาดกลิ่นรสที่ดีของน้ำปลา แต่ถ้าหมักร่วมกับ *Halobacterium* OR. จะสามารถลด volatile reducing substances (VRS) ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก ทำให้น้ำปลาที่ได้มีกลิ่นรสที่ดีขึ้น ในการใช้ proteinase T และ crude pyloric enzyme จะได้น้ำปลาที่มีคุณภาพดี เนื่องจากมีอัตราการย่อยสลายไม่เร็วเกินไป ทำให้น้ำปลาที่ได้มีกลิ่นรสดี

Beddows and Ardesir (1979a) ได้ทดลองใช้ papain ในการผลิตน้ำปลา โดยใช้ปลากระดูก (Stolephorus sp.) เป็นวัตถุดิบ ทำการหมักที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 21 วัน น้ำปลาที่ได้ไม่มีกลิ่นผิดปกติ และเมื่อทำการหมักน้ำปลาโดยเปรียบเทียบระหว่าง bromelain (0.80 เปอร์เซ็นต์), ficin (2.50 เปอร์เซ็นต์) และ papain (2.75 เปอร์เซ็นต์) พบว่า bromelain ให้ผลการหมักดีที่สุด

Ooshiro *et al.* (1981) ได้ทำการหมักน้ำปลาเปรียบเทียบโดยใช้ papain, bromelain และ trypsin พบว่า papain ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการหมักดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตามน้ำปลาที่ได้ขาดกลิ่นที่น้ำปลาถึงแม้จะให้รสและสีที่ดีก็ตาม

Raksakulthai (1986) ได้ทดลองใช้ trypsin, chymotrypsin, pronase, โปรติเอสจากเชื้อรา และ squid hepatopancreas enzyme ในการหมักปลา capelin พบว่า ในช่วงแรกของการหมัก กรดอะมิโนอิสระของน้ำหมักที่ใช้เอนไซม์จะสูงกว่า แต่หลังจากเดือนที่ 13 น้ำหมักที่ใช้เอนไซม์ โปรติเอสจากเชื้อรา, pronase, chymotrypsin และ trypsin จะมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระต่ำ ส่วนน้ำปลาที่ใช้เอนไซม์ squid hepatopancreas จะมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระสูงกว่า และน้ำปลาที่ได้มีคุณภาพด้านรสชาติ กลิ่น สี ที่ดี

Bovornreungroj (2005) ได้ผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ชอบเกลือ (halophilic protease) ซึ่งสามารถทำงานได้ดีในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือ NaCl 1.5-2.13 โมลาร์ จากแบคทีเรียชอบเกลือ *Halobacterium salinarum* PB407 และทดลองเติมเอนไซม์ลงไปร่วมกับการหมักน้ำปลา พบว่า เมื่อทำการหมักน้ำปลาเป็นเวลา 6 เดือน จะทำให้ปริมาณฟอสโมลในโตรเจน ในโตรเจน ทั้งหมด และกรดอะมิโนอิสระในน้ำปลาเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าน้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์โปรติเอสที่ชอบเกลือสำหรับใช้ร่วมกับการหมักน้ำปลา คือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นเมื่อใช้เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่ชอบเกลือ (halophilic ribonuclease) จากแบคทีเรียทนเกลือ *Pseudomonas* sp. No. 3241 ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมในการหมัก จะทำให้สารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP ในน้ำปลาเพิ่มสูงขึ้นได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์และวัตถุดิบ

- 1.1 เชื้อแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233
- 1.2 เชื้อแบคทีเรียทนเกลือ *Pseudomonas* sp. No. 3241
- 1.3 เชื้อแบคทีเรียชอบเกลือ *Halobacterium salinarum* PB407
- 1.4 ปลาไส้ตัน
- 1.5 เกลือป่นบริสุทธิ์

2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 2.1 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ
- 2.2 ถังหมักขนาด 2.5 ลิตร
- 2.3 ตู้แช่แข็ง
- 2.4 ตู้บ่มเชื้อ
- 2.5 หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
- 2.6 เครื่อง DNA Thermal Cycler
- 2.7 เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
- 2.8 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilizer)
- 2.9 คอลัมน์แก้วขนาด 2.0×100 เซนติเมตร และ 2.0×50 เซนติเมตร
- 2.10 เครื่องเก็บสารละลายจากคอลัมน์ (fraction collector)
- 2.11 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (spectrophotometer)
- 2.12 ถุงไดอะไลซิส (dialysis tube)
- 2.13 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
- 2.14 อุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis)
- 2.15 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

- 2.16 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC)
 2.17 ชุดย่อยโปรตีนและเครื่องกลั่นวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน

วิธีการ

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ 20 ไอโซเลท ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำปลาดิบจากโรงงานในจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย (Kanlayakrit and Bavornreungroj, 2002) เชื้อดังกล่าวจะถูกเก็บอยู่ในอาหารวุ้น Sehgal and Gibbons Complex (SGC) (Sehgal and Gibbons, 1960) (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0-4.0 โมลาร์ (0-24.0 เปอร์เซ็นต์)

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง

นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ 20 ไอโซเลท มาจุดลงบนอาหารแข็ง SGC ที่เติม Tween 80 ลงไป 2.0 เปอร์เซ็นต์ และเติมเกลือ NaCl ให้มีความเข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4 โมลาร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ถ้าเกิดตะกอนขาวขุ่นรอบ ๆ โคโลนี (opaque zone) แสดงว่าแบคทีเรียสามารถผลิตและปลดปล่อยเอนไซม์ไลเปสออกมาย่อย Tween 80 ได้ (Sharma *et al.*, 2001) จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณตะกอนขุ่นและของโคโลนี คัดเลือกไอโซเลทที่ให้อัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณตะกอนขุ่นและของโคโลนีสูงไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลว

ถ่ายแบคทีเรียบริสุทธิ์จากข้อ 2 ลงในอาหารเหลว SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และมีเกลือ NaCl ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแขวนลอยปริมาตร 15 มิลลิลิตรลงในฟลาस्कขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และมีเกลือ NaCl ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 150 มิลลิลิตรทำการบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส

ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน นำหมักที่ได้นำมาเหวี่ยงแยกเซลล์ออกและนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Yamada *et al.*, (1962) และ Horani (1996) (ภาคผนวก ง ข้อ 1)

4. การจำแนกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 มาจำแนกหาชนิดของแบคทีเรีย โดยศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี และเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA กับแบคทีเรียอื่น (Cowan, 1974; Krieg and Holt, 1984; Washington, 1985; Sneath *et al.*, 1986; Baron and Finegold, 1990; Arahall *et al.*, 1996; Delost, 1997)

4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา นำแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหาร SGC ที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้นที่เหมาะสมในงานเพาะเลี้ยง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำมาศึกษาการติดสีแบบแกรม (ภาคผนวก ข ข้อ 1) รูปร่าง และสีของโคโลนี

4.2. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ใช้แท่งแก้วขนาดเล็กหรือลูปเปียแบคทีเรียอายุ 24-48 ชั่วโมง แล้วขีดลงบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่เปียกชุ่มด้วยสารละลาย tetramethyl paraphenyl diamine-dihydrochloride ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข ข้อ 2) สังเกตการเปลี่ยนแปลงภายใน 1 นาที ถ้ามีสีม่วงเกิดขึ้นตามแนวที่ลากขีดลงไป แสดงว่า แบคทีเรียนั้นมีเอนไซม์ไฮโดรโครมออกซิเดส ให้ผลการทดสอบเป็นบวก

4.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส ปลูกเชื้อแบคทีเรียแบบจุด (point inoculation) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้นที่เหมาะสม (ภาคผนวก ก ข้อ 2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของฟิโนลเรดในอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเหลืองเป็นสีชมพู เนื่องจากแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสย่อยยูเรียและเกิดก๊าซแอมโมเนียทำให้อาหารมีสภาพเป็นด่างบันทึกผลการทดสอบเป็นบวก

4.4 การทดสอบการสร้างเอนไซม์อะเลส เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร SGC อายุ 24-48 ชั่วโมง แล้วหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข ข้อ 3) ลงบนโคโลนีของแบคทีเรีย ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลเป็นบวก

4.5 การรีดิวซ์ในเตรท บ่มเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวในเตรท (ภาคผนวก ก ข้อ 3) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้ออายุ 2, 3, 4 และ 5 วัน จะนำมาทดสอบการรีดิวซ์ในเตรท โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาหยดด้วย sulfanilic acid และ alpha naphthylamin (ภาคผนวก ข ข้อ 4) อย่างละ 2-3 หยด ในปริมาณที่เท่ากันถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง แสดงว่าแบคทีเรียสามารถรีดิวซ์ในเตรทเป็นไนไตรท์ได้ แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เกิดสีแดง นำมาทดสอบต่อโดยเติมผงสังกะสีลงไปเล็กน้อย ตั้งทิ้งไว้สักครู่ ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่าสังกะสีจะเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ ซึ่งไนไตรท์ที่ได้จะทำปฏิกิริยากับ sulfanilic acid และ alpha naphthylamin ได้สีแดง แสดงว่าแบคทีเรียไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ (ต้องให้สังกะสีทำปฏิกิริยาแทน) นั่นคือได้ผลลบ แต่ถ้าเติมสังกะสีแล้วไม่มีสีแดง แสดงว่าไนเตรทถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรท์ และไนไตรท์ถูกรีดิวซ์เป็นไนโตรเจนก๊าซหมดแล้ว นั่นคือ แบคทีเรียสามารถรีดิวซ์ไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ได้ผลจึงเป็นบวก

4.6 การทดสอบ Oxidation-Fermentation (O-F test) อาหารที่ใช้คือ oxidative fermentative medium (ภาคผนวก ก ข้อ 4) เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นปลูกเชื้อแบคทีเรียอายุ 24-48 ชั่วโมง แบบปักตรงตลอดความลึกของอาหารเชื้อละ 2 หลอด จากนั้นเทพาราฟินเหลวที่ปราศจากเชื้อปิดทับผิวหน้าอาหารหนาประมาณ 1 นิ้ว เพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาพไม่มีออกซิเจน ส่วนอีกหลอดหนึ่งไม่ต้องปิดทับพาราฟิน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-7 วัน เชื้อที่เป็น fermentative จะสร้างกรด โดยอาหารทั้งสองหลอดหรือเฉพาะหลอดที่พาราฟินทับจะเป็นสีเหลือง ส่วนเชื้อที่เป็น oxidative จะให้กรดโดยอาหารเฉพาะหลอดที่ไม่ปิดพาราฟินจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

4.7 การทดสอบการย่อยเจลาติน ปลูกเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหาร gelatin medium (ภาคผนวก ก ข้อ 5) ที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้นที่เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจผลเมื่อครบ 3-7 วัน บันทึกผลโดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน ถ้าแบคทีเรียย่อยเจลาตินได้ จะทำให้เจลาตินสูญเสียสมบัติการแข็งตัวที่อุณหภูมิดังกล่าว

4.8 การเจริญใน anaerobic agar ปลูกเชื้อแบคทีเรียแบบปักตรง (stab inoculation) ตลอดความลึกของอาหาร thioglycollate agar (ภาคผนวก ก ข้อ 6) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน สังเกตลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย ถ้าเจริญบริเวณผิวหน้าอาหารแสดงว่าเป็น

แบคทีเรียพวก aerobe ถ้าสามารถเจริญในส่วนลึกของอาหารได้แสดงว่าเป็นแบคทีเรียพวก anaerobe

4.9 ความสามารถในการสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต ปลุกเชื้อแบคทีเรียลงในอาหาร phenol red broth base (ภาคผนวก ก ข้อ 7) ที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้นที่เหมาะสม เติมน้ำคาร์โบไฮเดรตที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ กาแลคโตส ฟรุคโตส แลคโตส และซูโครส ลงไป 1.0 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลการสร้างกรดทุกวันจนครบ 7 วัน ถ้าแบคทีเรียสามารถสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรตได้จะทำให้อาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

4.10 ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียที่เกลือ NaCl ความเข้มข้นต่าง ๆ เชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลว SGC ที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 โมลาร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียโดยสังเกตจากความขุ่นของอาหารเทียบกับหลอดเปรียบเทียบ

4.11 ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 25, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลว SGC ที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียโดยสังเกตจากความขุ่นของอาหารเทียบกับอาหารเหลว SGC ที่ไม่ได้ใส่เชื้อ

4.12 การตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยการหาลำดับเบสของ 16S rRNA การตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ จะทำการสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณ 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้เครื่อง PCR (DNA Thermal Cycler, Perkin-Elmer รุ่น 9600) การหาลำดับเบสของ 16S rRNA จะใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (automatic DNA sequencer) นำข้อมูลลำดับเบสของ 16S rRNA ที่ได้จากแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้มาหาเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (%similarity, %identity) โดยใช้โปรแกรม BLASTn ทำการเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างลำดับเบสของแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้กับลำดับเบสของแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

5. การศึกษาความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปส

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้อายุประมาณ 1-2 วัน ลงในพลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแขวนลอยปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และมีเกลือ NaCl ความเข้มข้นต่าง ๆ (0-4.0 โมลาร์) (0-24.0 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นทำการเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

6. การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปส

6.1 ในระดับเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (New Brunswick Scientific Series 25, USA)

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้อายุประมาณ 1-2 วัน ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ (18.0 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแขวนลอยปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ (18.0 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ ฟิเอชและน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นทำการเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

6.2 ในระดับถังหมักขนาด 2.5 ลิตร (New Brunswick Scientific, USA)

ถ่ายแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้อายุประมาณ 1-2 วัน ลงในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ (18.0 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแขวนลอย ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในฟลาस्कขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลวชนิดเดียวกันปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อต่อลงในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ (18.0 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 VVM (ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรน้ำหมัก/นาที่) ทำการเพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ฟิโอสและน้ำหนักรีดเซลล์แห้ง ส่วนน้ำหมักที่แยกเซลล์ออกนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

7. การทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์

ทุกขั้นตอนของกระบวนการทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7.1 การทำเอนไซม์ไลเปสให้เข้มข้น

นำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ตามข้อ 6.2 มาเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ตกตะกอนน้ำใส (supernatant) ที่ได้ด้วยเอทานอล 99.8 เปอร์เซ็นต์ โดยให้มีปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอลในน้ำหมักเป็น 50.0 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้นาน 24 ชั่วโมง แยกตะกอนเอนไซม์ออกจากน้ำหมักโดยเหวี่ยงแยกตะกอนออกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ฟิโอส 7.0 นำสารละลายเอนไซม์มาไล้เกลือและโปรตีนปนเปื้อนออกด้วยวิธีไดอะไลซิส (dialysis) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) โดยใช้เครื่อง lyophilizer (Freezemobile 5SL, The Virtis Company Inc., NY, USA) โดยนำสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 50-100 มิลลิลิตร บรรจุลงในขวดแก้วกันกลม

ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส นานประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำการระเหิดภายใต้สภาวะสุญญากาศเป็นเวลานานประมาณ 12-24 ชั่วโมงจะได้เอนไซม์อยู่ในรูปผงแห้งเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

7.2 การทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) แบบเจลฟิเตรชัน (gel filtration)

นำเอนไซม์จากข้อ 7.1 มาเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.0 จำนวนความเข้มข้นของโปรตีนไม่เกิน 70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผ่านสารละลายเอนไซม์ลงในคอลัมน์แก้วขนาด 2.0×100 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุ Sephadex G-100 ที่อิมมิดัวในสารละลายบัฟเฟอร์นาน 24 ชั่วโมง ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.0 เป็นสารละลายในการชะด้วยอัตราเร็ว 120 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง แยกเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 4.0 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่อง Fraction Collector (Advantec รุ่น SF-160) เพื่อวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรและกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์มาทำแห้งแบบเยือกแข็งเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

7.3 การทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange chromatography)

นำเอนไซม์จากข้อ 7.2 มาเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.0 จำนวนความเข้มข้นของโปรตีนไม่เกิน 70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผ่านสารละลายเอนไซม์ลงในคอลัมน์แก้วขนาด 2.0×50 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุ DEAE Toyopearl 650M ที่อิมมิดัวในสารละลายบัฟเฟอร์นาน 24 ชั่วโมง ล้างคอลัมน์โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตรที่ใช้ประมาณ 2 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ด้วยอัตราเร็วคงที่ที่ 70 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.0 ในการชะโดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) จาก 0-0.5 โมลาร์ แบบเส้นตรง (linear gradient) ปริมาตรที่ใช้ประมาณ 2 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ที่อัตราเร็วเดียวกัน แยกเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 4.0 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่อง Fraction Collector (Advantec รุ่น SF-160) เพื่อวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ความเข้มข้นเกลือ NaCl และกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์มาไล่ออกด้วยวิธี

ไดอะไลซิส (dialysis) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสารละลายสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.0 และนำเอนไซม์มาทำแห้งแบบเยือกแข็งเพื่อเก็บไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

7.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE (SDS-PAGE electrophoresis)

ใช้อุปกรณ์อิเล็กโทรโฟริซิส (Atto รุ่น AE-6500) รายละเอียดการทดลองดังในภาคผนวก ง ข้อ 9 โดยมีสภาวะที่ใช้ในการทดลองคือ ควบคุมกระแสไฟฟ้าให้คงที่ที่ 40 มิลลิแอมแปร์ ความต่างศักย์คงที่ที่ 100 โวลต์ ตลอดการเคลื่อนที่ของโปรตีน

8. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไลเปส

8.1 การทดสอบพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

การทดสอบพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-12.0 จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส บัฟเฟอร์ที่ใช้คือ ช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-5.0 ใช้สารละลาย citrate buffer (ภาคผนวก ค ข้อ 1) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-8.0 ใช้สารละลาย phosphate buffer (ภาคผนวก ค ข้อ 2) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ช่วงพีเอชระหว่าง 9.0-10 ใช้สารละลาย Tris-HCl buffer (ภาคผนวก ค ข้อ 3) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ช่วงพีเอชระหว่าง 11.0-12.0 ใช้สารละลาย glycine-NaOH buffer (ภาคผนวก ค ข้อ 4) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอชที่ต้องการศึกษาคือ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 และ 12.0 ตามลำดับ

8.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสม จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ทำการทดลองในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทดลองเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็น 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

8.3 การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสที่พีเอชต่าง ๆ

การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสที่พีเอชต่าง ๆ โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-12.0 นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายเอนไซม์มาปรับพีเอชให้ได้พีเอชเริ่มต้น (พีเอช 7.0) โดยใช้สารละลายใช้สารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ พีเอช 7.0 จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่เหลือ (residual activity) บัฟเฟอร์และพีเอชที่ต้องการศึกษาเช่นเดียวกับที่ระบุไว้ในหัวข้อ 8.1

8.4 การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิต่าง ๆ

การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสม นำไปบ่มในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทันที จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่เหลือ (residual activity)

8.5 การทดสอบความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

การทดสอบความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสม จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยทำการแปรผันความเข้มข้นเกลือ NaCl ในสับสเตรทให้มีปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือ NaCl ในสารละลายเป็น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 โมลาร์ ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากหัวข้อ 8.2

9. การหมักน้ำปลา

9.1 วัตถุดิบ

วัตถุดิบสำหรับการหมักน้ำปลาใช้ปลาไส้ตัน (*Stolephorus indicus*) ที่มีความยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร และมีน้ำหนักประมาณ 10-20 กรัม เกลือป่น และเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ (crude halophilic lipase) จากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

9.2 การเตรียมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ (crude halophilic lipase, HL)

การเตรียมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้สำหรับการหมักน้ำปลา จะทำการถ่ายเตรียมเอนไซม์ตามหัวข้อ 6.2 น้ำหมักที่ได้จะนำมาเหวี่ยงแยกเซลล์ออก ตกตะกอนน้ำใส (supernatant) ที่ได้ด้วยเอทานอล แยกตะกอนเอนไซม์ออกจากน้ำหมัก นำตะกอนที่ได้ละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) นำสารละลายเอนไซม์มาไล้เกลือ และโปรตีนปนเปื้อนออกด้วยวิธีไดอะไลซิส (dialysis) จากนั้นนำมาทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) จะได้เอนไซม์อยู่ในรูปผงแห้งสำหรับการหมักน้ำปลา

9.3 การหมักน้ำปลาโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ (HLFS)

ใช้ปลาไส้ตันและเกลือป่นในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก โดยใช้ปลา 250 กรัม เกลือป่น 125 กรัม นำมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน และบรรจุใส่ขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาพลาสติก นำไปบ่มที่อุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือโดยแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 0.1 (19,050 หน่วย), 0.5 (95,250 หน่วย), 1.0 (190,500 หน่วย), 1.5 (285,750 หน่วย) และ 2.0 (381,000 หน่วย) เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ในแต่ละการทดลอง (treatment) จะทำ 3 ซ้ำ นำไปบ่มต่ออีกเป็นเวลา 24 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส สำหรับตัวอย่างควบคุม (control) จะเตรียมการหมักเช่นเดียวกันแต่ไม่เติมเอนไซม์ เก็บตัวอย่างน้ำปลา 3.0 มิลลิลิตร ทุก ๆ 7 วัน กรองตัวอย่างน้ำปลาด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ก่อนทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ (volatile fatty acid) ได้แก่ acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid

และ valeric acid ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Sanceda *et al.* (2003) (ภาคผนวก ง ข้อ 4)

9.4 การหมักน้ำปลาโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ (crude halophilic lipase, HL) ร่วมกับเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่ชอบเกลือ (crude halophilic ribonuclease, HR) และเอนไซม์โปรติเอสที่ชอบเกลือ (crude halophilic protease, HP)

9.4.1 การเตรียมเอนไซม์โปรติเอสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียชอบเกลือ *Halobacterium salinarum* PB407 สำหรับเติมลงไปร่วมกับการหมักน้ำปลาเพื่อเร่งกระบวนการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลาให้เร็วขึ้น ซึ่งจะเป็นการช่วยย่นระยะเวลาในการหมักน้ำปลา จะเตรียมตามวิธีการของ Bovornreungroj (2005) โดยจะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ M73 ที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 4 โมลาร์ (24.0 เปอร์เซ็นต์) น้ำหมักที่ได้จะนำมาเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที น้ำใส (supernatant) ที่ได้นำมาทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) จะได้เอนไซม์อยู่ในรูปผงแห้งสำหรับการใช้ในการหมักน้ำปลา

9.4.2 การเตรียมเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียทนเกลือ *Pseudomonas* sp. No. 3241 สำหรับเติมลงไปร่วมกับการหมักน้ำปลาเพื่อเพิ่มปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์กัวโนซีน 5'-โมโนฟอสเฟต (guanosine 5'-monophosphate, 5'-GMP) ซึ่งเป็นสารเสริมรสชาติที่จะช่วยทำให้น้ำปลามีรสชาติดีขึ้น จะเตรียมตามวิธีการของอนันต์ (2545) และ Ikeda (2000) โดยจะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ SGC น้ำหมักที่ได้จะนำมาเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ตกตะกอนน้ำใส (supernatant) ที่ได้ด้วยเอทานอล 99.8 เปอร์เซ็นต์ โดยให้มีปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอลในน้ำหมักเป็น 50.0 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้นาน 24 ชั่วโมง แยกตะกอนเอนไซม์ออกจากน้ำหมักโดยเหวี่ยงแยกตะกอนออกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ละลายด้วยสารละลาย Tris-HCL buffer ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 8.0 นำสารละลายเอนไซม์มาไล้เกลือและโปรตีนปนเปื้อนออกด้วยวิธีไดอะไลซิส (dialysis) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) จะได้เอนไซม์อยู่ในรูปผงแห้งสำหรับการใช้ในการหมักน้ำปลา

9.4.3 การหมักน้ำปลาจะใช้ปลาไส้ตันและเกลือป่นในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก โดยใช้ปลา 250 กรัม เกลือป่น 125 กรัม และเอนไซม์โปรติเอสที่ชอบเกลือ (HP) ความเข้มข้น 1.5

(3,750 หน่วย) เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก (Bovornreungroj, 2005) นำมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน และบรรจุใส่ขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาพลาสติก นำไปบ่มที่อุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส หลังจากการหมักเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการเติมเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่ชอบเกลือ (HR) ความเข้มข้น 0.5 (64,000 หน่วย) เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก (อนันต์, 2545) และเอนไซม์ไลเปส ที่ชอบเกลือ (HL) ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 9.3 ในแต่ละการทดลอง (treatment) จะทำ 3 ซ้ำ นำไปบ่มต่ออีกเป็นเวลา 24 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส สำหรับตัวอย่าง ควบคุม (control) จะเตรียมการหมักเช่นเดียวกันแต่ไม่เติมเอนไซม์ เก็บตัวอย่างน้ำปลา 5.0 มิลลิลิตร ทุก ๆ 7 วัน กรองตัวอย่างน้ำปลาด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำตัวอย่างน้ำปลา ไปทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพต่าง ๆ ได้แก่ ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ (volatile fatty acid) ได้แก่ acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC) ซึ่งดัดแปลงมาจาก วิธีการของ Sanceda *et al.* (2003) (ภาคผนวก ง ข้อ 4) ปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) (ภาคผนวก ง ข้อ 5) ปริมาณฟอर्मอลไนโตรเจน (formal nitrogen) ตามวิธีการของ Beddows *et al.* (1976) (ภาคผนวก ง ข้อ 6) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ตามวิธีมาตรฐานของ James (1995) (ภาคผนวก ง ข้อ 7) ปริมาณเกลือตามวิธีของ AOAC (1975) (ภาคผนวก ง ข้อ 8) พีเอชโดยใช้เครื่อง pH meter (Schott, CG 842, Germany) และสีของน้ำปลา โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Spectrophotometer UV-1201 Shimadzu, Japan) ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ในการทดลองจะวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีและกายภาพ ในน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดเพื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ร่วมกับการหมัก

10. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลของการเติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือทั้ง 3 ชนิด คือเอนไซม์ไลเปส ไรโบนิวคลีเอส และ โปรติเอสต่อองค์ประกอบทางเคมีและกายภาพต่าง ๆ ได้แก่ ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ ปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP ปริมาณฟอर्मอลไนโตรเจน ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณเกลือ พีเอช และสีของน้ำปลาโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

11. วิธีวิเคราะห์

11.1 วิธีวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

วิธีที่ใช้ในการหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ดัดแปลงมาจากวิธีของ Yamada *et al.* (1962) และ Horani (1996) (ภาคผนวก ง ข้อ 1)

11.2 วิธีวิเคราะห์ความเข้มข้นของเซลล์

การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ วัดในรูปของการหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ AOAC (1965) (ภาคผนวก ง ข้อ 2)

11.3 วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จะวิเคราะห์ตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951) (ภาคผนวก ง ข้อ 3)

11.4 วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ (volatile fatty acid)

ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ (volatile fatty acid) ได้แก่ acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid วิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Sanceda *et al.* (2003) (ภาคผนวก ง ข้อ 4)

11.5 วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์กัวโนซีน 5'-โมโนฟอสเฟต (guanosine 5'-monophosphate, 5'-GMP)

ปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์กัวโนซีน 5'-โมโนฟอสเฟต (guanosine 5'-monophosphate, 5'-GMP) วิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) (ภาคผนวก ง ข้อ 5)

11.6 วิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอรั่มอลไนโตรเจน (formal nitrogen)

ปริมาณฟอรั่มอลไนโตรเจน (formal nitrogen) วิเคราะห์ตามวิธีการของ Beddows *et al.* (1976) (ภาคผนวก ง ข้อ 6)

11.7 วิธีวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen)

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) วิเคราะห์ตามวิธีของ James (1995) (ภาคผนวก ง ข้อ 7)

11.8 วิธีวิเคราะห์ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

ความเข้มข้นเกลือ NaCl จะวิเคราะห์ตามวิธีของ AOAC (1975) (ภาคผนวก ง ข้อ 8)

12. สถานที่และระยะเวลาในการทดลอง

12.1 สถานที่ทำการทดลอง

ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

12.2 ระยะเวลาในการทดลอง

การทดลองเริ่มตั้งแต่เดือน พฤศจิกายน 2546 สิ้นสุดเดือนธันวาคม 2549

ผลและวิจารณ์

1. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง

จากการนำแบคทีเรียบริสุทธิ์ 20 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง SGC ที่เติม Tween 80 ปริมาณ 2.0 เปอร์เซ็นต์ และเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ให้มีความเข้มข้น 0-4.0 โมลาร์ (0-24.0 เปอร์เซ็นต์) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 5 จากผลการทดลอง พบว่า หลังจากบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน แบคทีเรีย ไอโซเลท PB213, PB221, PB233, PB262, PB314, PB372, PB373, PB374 และ PB376 ให้ค่าอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณตะกอนขุ่น (opaque zone) และของโคโลนีสูง ที่ความเข้มข้นเกลือ NaCl 2.0-3.0 โมลาร์ (12.0-18.0 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่าแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส (true lipase) ได้สูงและปลดปล่อยออกมาย่อย Tween 80 ได้ (ภาพที่ 10) ดังนั้น จึงคัดเลือกแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลทดังกล่าวสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลว

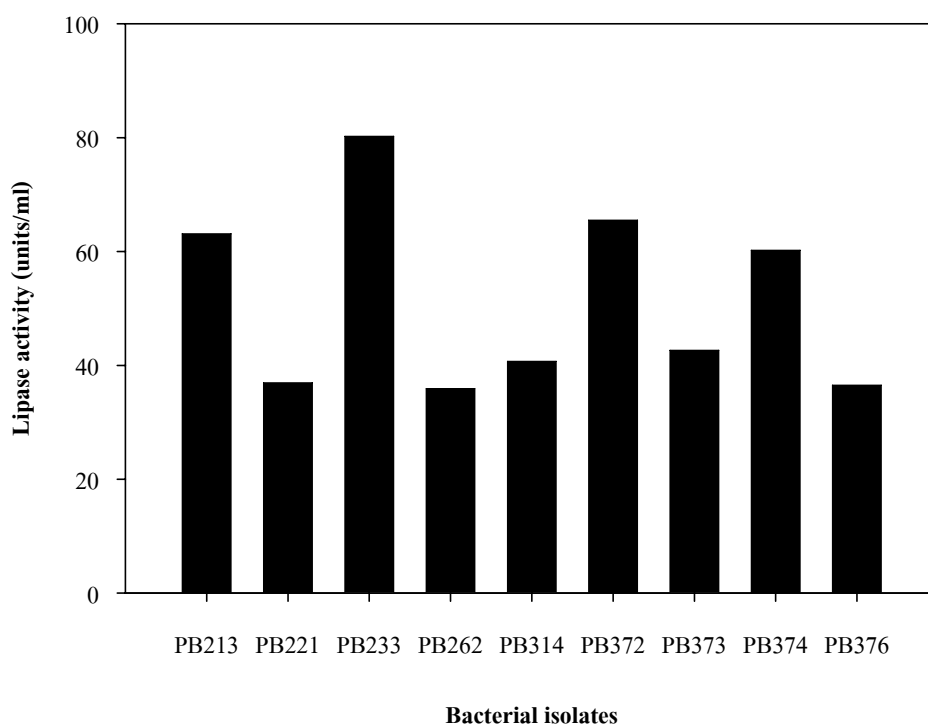
เมื่อนำแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือกในขั้นต้นทั้ง 9 ไอโซเลท มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลว SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และมีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 2.0-3.0 โมลาร์ (12.0-18.0 เปอร์เซ็นต์) ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 11 จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 4-5 วัน โดยแบคทีเรียไอโซเลท PB233 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด (80.25 หน่วยต่อมิลลิเมตร) เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย ไอโซเลทอื่น ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็งซึ่งแบคทีเรียไอโซเลท PB233 จะให้ค่าอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณตะกอนขุ่น (opaque zone) และของโคโลนีสูงที่สุดที่ความเข้มข้นเกลือ NaCl 3.0 โมลาร์ (18.0 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียไอโซเลทอื่น ดังผลการทดลองในตารางที่ 5 และภาพที่ 11 ดังนั้นแบคทีเรียไอโซเลท PB233 จึงถูกคัดเลือกไว้สำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปสต่อไป

ตารางที่ 5 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็ง SGC
ที่เติม Tween 80 ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์และเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-4.0 โมลาร์

แบคทีเรีย ไอโซเลข	อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณตะกอนขุ่น (มม.) และ เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (มม.)				
	0 M NaCl	1 M NaCl	2 M NaCl	3 M NaCl	4 M NaCl
PB213	-	1.80	4.10	1.50	1.00
PB214	-	-	-	2.63	1.10
PB221	-	-	-	3.17	-
PB222	-	-	-	-	-
PB232	-	-	-	2.28	-
PB233	-	2.80	3.50	4.95	1.80
PB241	-	-	-	1.75	1.70
PB251	-	1.30	1.42	1.50	1.20
PB262	-	-	1.35	3.14	1.90
PB264	-	-	-	2.40	2.10
PB311	-	-	-	2.00	-
PB314	-	2.57	2.88	3.25	1.90
PB315	-	1.57	2.83	2.00	-
PB322	-	1.63	1.20	2.57	-
PB361	-	-	1.33	1.28	-
PB372	-	-	3.66	4.13	-
PB373	-	1.62	2.83	3.43	1.50
PB374	-	-	4.00	2.50	-
PB375	-	2.16	2.83	1.55	1.15
PB376	-	1.78	3.00	2.50	1.10



ภาพที่ 10 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลต PB233 ที่เจริญบนอาหารแข็ง SGC ที่เติม Tween 80 ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ และเติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์



ภาพที่ 11 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลว SGC ที่เติมน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์และเกลือ NaCl ความเข้มข้น 2.0-3.0 โมลาร์

2. การจำแนกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

นำแบคทีเรียไอโซเลท PB233 มาจำแนกชนิดของแบคทีเรียตามวิธีของ Cowan (1974); Krieg and Holt (1984); Washington (1985); Sneath *et al.* (1986); Baron and Finegold (1990); Arahal *et al.* (1996); Delost (1997) โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท PB233 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก โคโลนีมีสีเหลือง เชลล์มีลักษณะรูปร่างกลม และมีการจัดเรียงตัวคล้ายพวงอุ้งน ออกซิเดสให้ผลลบ ยูรีเอสและอะซิเดสให้ผลลบ ไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรทได้ สร้างกรดจากการใช้น้ำตาลกลูโคสได้ในสภาพที่มีออกซิเจน ย่อยสลายเจลาตินได้ เจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน สร้างกรดจากน้ำตาลกาแลคโตส แลคโตส และซูโครสได้ และสามารถเจริญในสภาพที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-4.0 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25-45 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 6 จากลักษณะต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับหลักเกณฑ์จาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1 และ 2 (Krieg and Holt, 1984; Sneath *et al.*, 1986) พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท PB233 มีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri*

การตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลของแบคทีเรียไอโซเลท PB233 โดยทำการสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณ 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) และหาลำดับเบสของ 16S rRNA ด้วยเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติได้ลำดับเบสของ 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท PB233 แสดงดังภาพที่ 12 เมื่อนำลำดับเบสของ 16S rRNA ที่ได้จากแบคทีเรียไอโซเลท PB233 มาหาเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (%similarity, %identity) โดยใช้โปรแกรม BLASTn ทำการเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างลำดับเบสของแบคทีเรียไอโซเลท PB233 กับลำดับเบสของแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ได้ผลแสดงในตารางที่ 7 จากการเปรียบเทียบลำดับเบส (16S rRNA sequence) ของแบคทีเรียไอโซเลท PB233 กับลำดับเบสของแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GeneBankโดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท PB233 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus* sp. LMG 19417, *Staphylococcus* sp. ARCTIC-P62 และ *Staphylococcus pasteurii* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% similarity) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท PB233 มาพิจารณาร่วมกับผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท PB233 มีลักษณะต่าง ๆ คล้ายกับแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* มากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลท PB233 เป็นแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* PB233

ตารางที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท PB233

Characteristics	PB 3233	<i>Staphylococcus warneri</i> ^a
Gram stain	positive	positive
Morphology	cocci	cocci
Pigment	yellow	yellow/cream
Oxidase test	-	-
Urease test	+	+
Catalase test	+	+
Nitrate reduction	-	-
Oxidation-Fermentation (O-F test)	oxidative	oxidative
Gelatin hydrolysis	+	+
Anaerobic growth	+	+
Carbohydrate fermentation		
Galactose	+	+
Fructose	-	-
Lactose	+	+
Sucrose	+	+
Growth in : 0 M NaCl	+	+
1 M NaCl	+	+
2 M NaCl	+	+
3 M NaCl	+	+
4 M NaCl	+	+
Growth at : 25 °C	+	+
30 °C	+	+
37 °C	+	+
45 °C	+	+

หมายเหตุ + คือ ให้ผลการทดสอบเป็นบวก, - คือ ให้ผลการทดสอบเป็นลบ

^a ข้อมูลจาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1 และ 2

CGGCNGTGNA	GCANAATAAC	TGCANNTNCA	GCGAACAGAT	NAGGAGCTTG
CTCCTTTGAC	GTTAGCGGCG	GACGGGTGAG	TAACACGTGG	ATAACCTACC
TATAAGACTG	GGATAACTTC	GGGAAACCGG	AGCTAATACC	GGATAACATA
TTGAACCGCA	TGGTTCAATA	GTGAAAGGCG	GCTTTGCTGT	CACTTATAGA
TGGATCCGCG	CCGTATTAGC	TAGTTGGTAA	GGTAACGGCT	TACCAAGGCA
ACGATACGTA	GCCGACCTGA	GAGGGTGATC	GGCCACACTG	GAAGTGAAGC
ACGGTCCAGA	CTCCTACGGG	AGGCAGCAGT	AGGGAATCTT	CCGCAATGGG
CGAAAGCCTG	ACGGAGCAAC	GCCGCGTGAG	TGATGAAGGT	CTTOGGATCG
TAAAACTCTG	TTATCAGGGA	AGAACAAATG	TGTAAGTAAC	TGTGCACATC
TTGACGGTAC	CTGATCAGAA	AGCCACGGNT	AACTACGTGC	CAGCAGCCGC
GGTAATACGT	AGGTGGCAAG	CGTTATCCGG	AATTATTGGG	CGTAAAGCGC
GCGTAGGCGG	TTTTTTAAGT	CTGATGTGAA	AGCCCACGGC	TCAACCGTGG
AGGGTCATTG	GAAACTGGAA	AACTTGAGTG	CAAACACGGA	AAGTGGAATT
CCATGTGTAG	CGGTGAAATG	CGCAGAGATA	TGGAGGAACA	CCAGTGGCGA
AGGCGACTTT	CTGGTCTGTA	ACTGACGCTG	ATGTGCGAAA	GCGTGGGGAT
CAAACAGGAT	TAGATACCCT	GGTAGTCCAC	GCCGTAAACG	ATGAGTGCTA
AGTGTTAGGG	GGTTTCCGCC	CCTTCGTGCT	GCAGCTAACG	CATTAAGCAC
TCCGCCTGGG	GAGTACGACC	GCAAGGTTGA	AACTCAAAGG	AATTGACGGG
GACCCGCACA	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	AATTCGAAGC	AACTCGAAGA
ACCTTACCAA	ATCTTGACAT	CCTTTGACCG	CTCTAGAGAT	AGAGTCTTCC
CCTTCGGGGG	ACAAAGTGAC	AGGTGGTGCA	TGGTTGTCGT	CAGCTCGTGT
CGTGAGATGT	TGGGTAAAGT	CCCGCAACGA	GCGCAACCCT	TAAGCTTAGT
TGCCATCATT	AAGTTGGGCA	CTCTAAGTTG	ACTGCCGGTG	ACAAACCCGA
GGAAGTCGG	GATGACGTCA	AATCATCATG	CCCCTTATGA	TTTGGGCTAC
ACACGTGCTA	CAATGGACAA	TACAAAGGGC	AGCTAAACCG	CGAGGTCAAG
CAAATCCCAT	AAAGTTGTTC	TCAGTTCGGA	TTGTAGTCTG	CAACTCGACT
ACATGAAGCT	GGAATCGCTA	GTAATCGTAG	ATCAGCATGC	TACGGTGAAT
ACGTTCCCGG	GTCTTGTACA	CACCGCCCGT	CACACCACGA	GAGTTTGTAA

ภาพที่ 12 ลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท PB233

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% Similarity) ของลำดับเบส 16S rRNA ระหว่างแบคทีเรีย
ไอโซเลต PB233 และแบคทีเรียในกลุ่ม *Staphylococcus* sp.

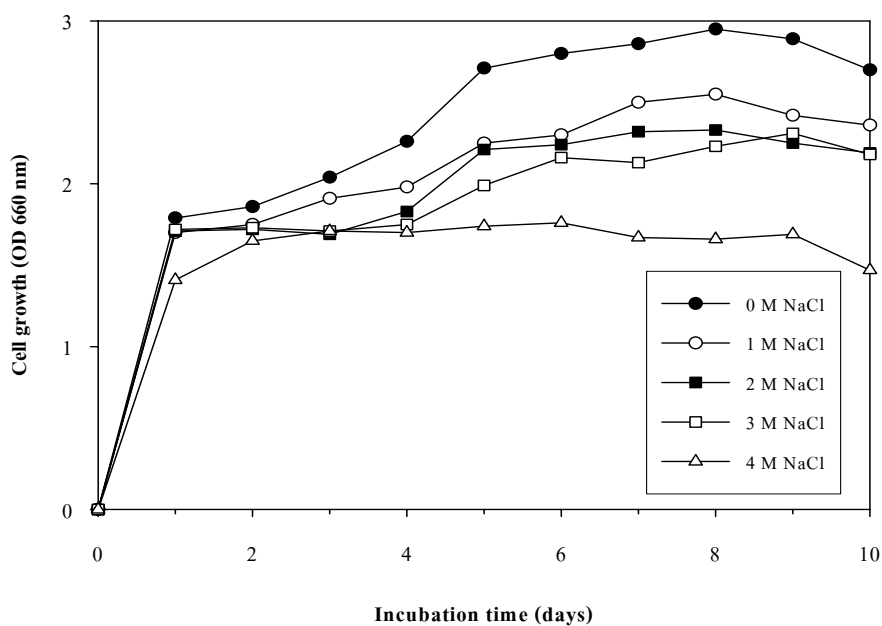
Strains	% Similarity
	PB233
1. <i>Staphylococcus warneri</i>	99
2. <i>Staphylococcus</i> sp. LMG 19417	99
3. <i>Staphylococcus</i> sp. ARCTIC-P62	99
4. <i>Staphylococcus pasteurii</i>	99
5. <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	98
6. <i>Staphylococcus</i> sp. MO28	98
7. <i>Staphylococcus aureus</i> MO50	98
8. <i>Staphylococcus succinus</i>	97
9. <i>Staphylococcus hominis</i>	97
10. <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	97
11. <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	96
12. <i>Staphylococcus xylosus</i>	96
13. <i>Staphylococcus capitis</i>	96
14. <i>Staphylococcus cohnii</i>	95
15. <i>Staphylococcus caprae</i>	95

3. การศึกษาความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปส

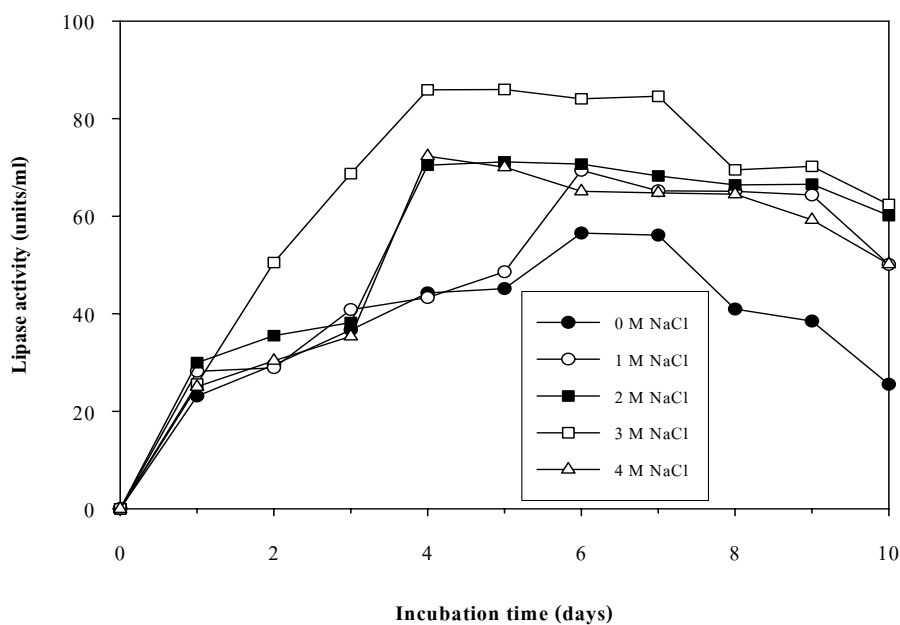
การศึกษาความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* PB233 โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และมีเกลือ NaCl ความเข้มข้นต่าง ๆ (0-4.0 โมลาร์) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 13 และ 14

จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* PB233 สามารถเจริญได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือและที่มีเกลือความเข้มข้น 1.0-4.0 โมลาร์ (6.0-24.0 เปอร์เซ็นต์) โดยแบคทีเรียจะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ และการเจริญจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้น ดังผลการทดลองในภาพที่ 13 จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* PB233 เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียทนเกลือ (halotolerant bacteria) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการเกลือสำหรับการเจริญ แต่สามารถทนต่อเกลือและเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นตั้งแต่ 2.5 โมลาร์ (15.0 เปอร์เซ็นต์) (Kushner, 1978; Garabito *et al.*, 1998)

การศึกษาความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* PB233 พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือและไม่มีเกลือ โดยแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ (18.0 เปอร์เซ็นต์) ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ได้ต่ำที่สุด ดังผลการทดลองในภาพที่ 14 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* PB233 แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียจะเจริญได้ดีที่สุดในสภาวะที่ไม่มีเกลือแต่จะผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ (18.0 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้นในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* PB233 ต้องเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ (18.0 เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 13 ผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* PB233 ในอาหารเหลว SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 14 ผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* PB233 ในอาหารเหลว SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์

4. การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปส

4.1 ในระดับเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ

การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Sehgal and Gibbons Complex (SGC) ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และมีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ (18.0 เปอร์เซ็นต์) บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ฟิเอชของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง และกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ดังผลการทดลองในภาพที่ 15

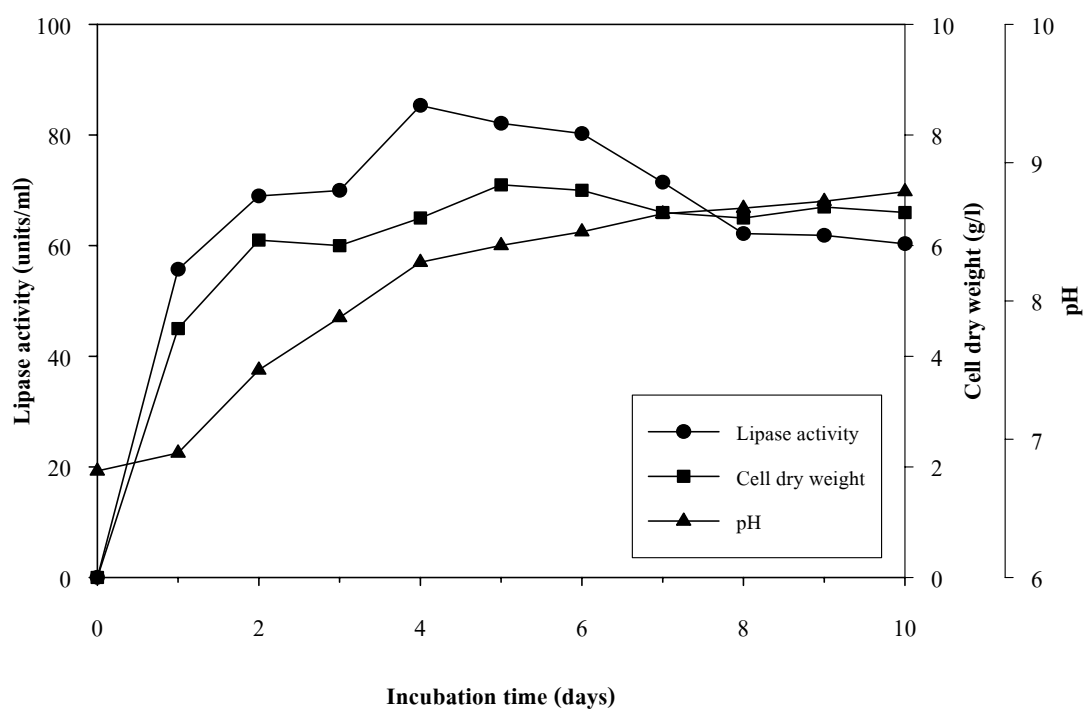
จากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 จะมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง (วันที่ 2) จากนั้นการเจริญจะค่อนข้างคงที่จนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ฟิเอชของน้ำหมักจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจาก 7.0 เป็น 8.8 เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง (วันที่ 2) จากนั้นจะค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นและสูงสุดเมื่อการเพาะเลี้ยงเข้าสู่ชั่วโมงที่ 96 (วันที่ 4) โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 4 วัน เท่ากับ 85.34 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะค่อย ๆ ลดต่ำลงจนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง จากผลการทดลองจะเห็นว่าเชื้อแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 มีรูปแบบการเจริญควบคุมไปกับการผลิตเอนไซม์หรือมีลักษณะเป็น growth link associate product formation โดยในขณะที่มีการเจริญจะมีการผลิตเอนไซม์ออกมาด้วย และจะมีการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อการเจริญอยู่ในระยะคงที่หรืออยู่ในระยะ stationary phase แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 สามารถผลิตเอนไซม์ในกระบวนการเมตาบอลิซึมแบบปฐมภูมิ (primary metabolism) และเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จัดเป็นผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิ (primary metabolite) (เบญจพร, 2542; Lee *et al.*, 1999)

4.2 ในระดับถังหมักขนาด 2.0 ลิตร

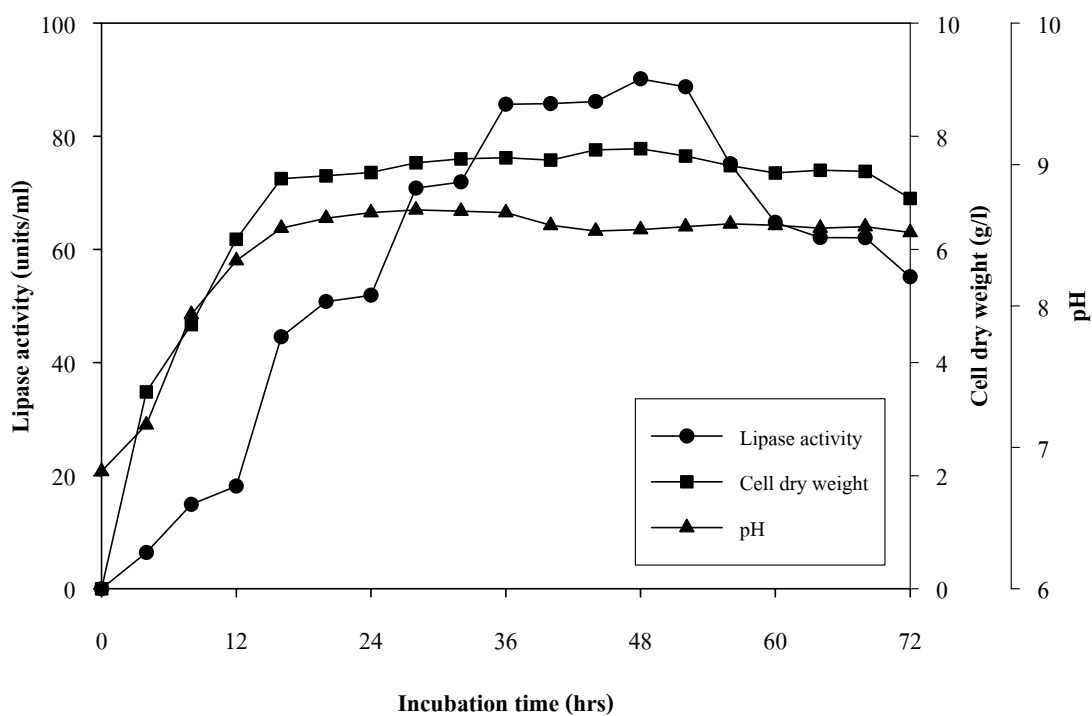
การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Sehgal and Gibbons Complex (SGC) ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และมีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ (18.0 เปอร์เซ็นต์) บ่มในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm ทำการเพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ฟิโชนของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง และกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ดังผลการทดลองในภาพที่ 16

จากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 16 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น และค่อนข้างคงที่จนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ฟิโชนของน้ำหมักจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจาก 7.0 จนเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงฟิโชนของน้ำหมักเท่ากับ 8.5 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นและสูงสุดเมื่อการเพาะเลี้ยงเข้าสู่ชั่วโมงที่ 48 จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์จะค่อย ๆ ลดต่ำลงจนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง เท่ากับ 90.12 หน่วยต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วและผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดโดยใช้ระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์สั้นกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงในระดับเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ทั้งนี้เนื่องจากการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักสามารถควบคุมสภาพต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงให้คงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง และสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ได้ง่ายและดีกว่าในระดับเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ เชื้อแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 มีรูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสในการเพาะเลี้ยงระดับถังหมักเหมือนกับการเพาะเลี้ยงในระดับเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ คือมีลักษณะการเจริญควบคู่ไปกับการผลิตเอนไซม์ หรือมีลักษณะเป็น growth link associate product formation โดยในขณะที่มีการเจริญจะมีการผลิตเอนไซม์ออกมาด้วยและมีการผลิตเอนไซม์สูงสุดเมื่อการเจริญอยู่ในระยะคงที่หรืออยู่ในระยะ stationary phase (เบญจพร, 2542; Lee *et al.*, 1999)



ภาพที่ 15 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ในอาหารเหลว SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และมีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที



ภาพที่ 16 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ในอาหารเหลว SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และมีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm

5. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไลเปส

ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร โดยนำเอนไซม์ที่ผลิตได้มาทำให้เข้มข้นและนำมาทดสอบสมบัติของเอนไซม์

5.1 การทดสอบพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

การทดสอบพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส โดยทำการทดสอบในช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-12.0 ดังผลการทดลองในภาพที่ 17(A) จากการทดลองพบว่า เอนไซม์ไลเปสสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0 เอนไซม์ไลเปสจะสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่ค่อนข้างกว้าง โดยจะทำงานได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสูงสุดในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-10.0 และพบว่าความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จะลดลงในช่วงพีเอชที่มีความเป็นกรดและด่างสูง ๆ

5.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส โดยทำการทดสอบในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-80 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 7.0 ดังผลการทดลองในภาพที่ 17(B) จากการทดลองพบว่า เอนไซม์ไลเปสสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์สามารถทำงานได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสูงสุดในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส

5.3 การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสที่พีเอชต่าง ๆ

การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสที่พีเอชต่าง ๆ โดยทำการทดสอบในช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-12.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังผลการทดลองในภาพที่ 18(A) จากการทดลองพบว่า เอนไซม์ไลเปสมีความเสถียรสูงสุดที่พีเอช 7.0 โดยในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-9.0 เอนไซม์ไลเปสจะมีความเสถียรได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสูงสุด และเอนไซม์ไลเปสจะมีความเสถียรต่ำในช่วงพีเอชที่มีความเป็นกรดหรือด่างสูงขึ้น

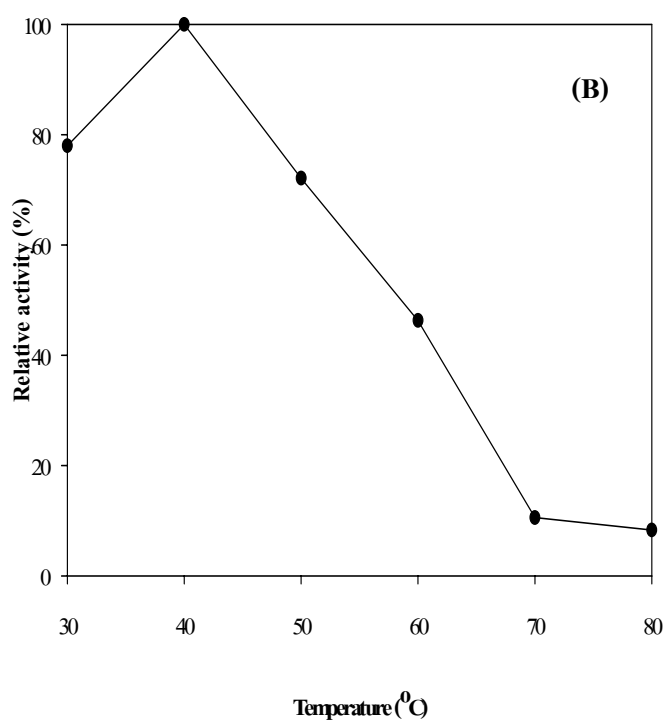
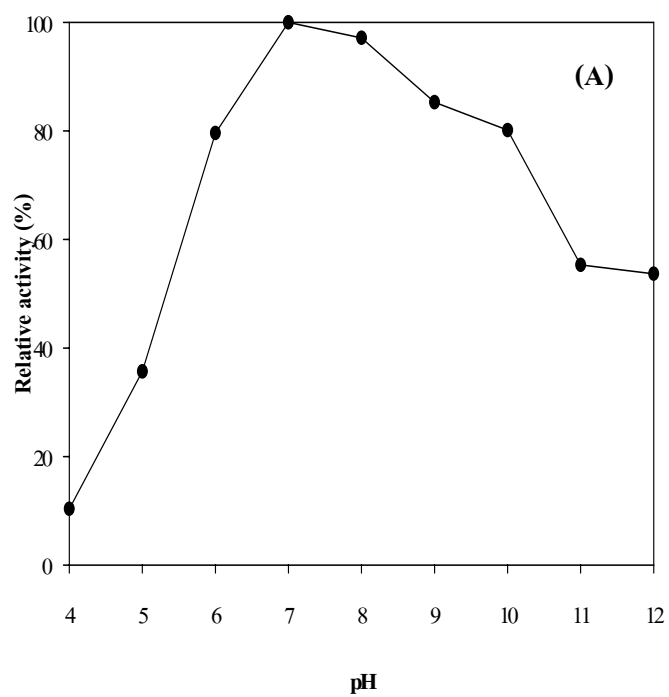
5.4 การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิต่าง ๆ

การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยทำการทดสอบในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดังผลการทดลองในภาพที่ 18(B) จากการทดลองพบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความเสถียรสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส เอนไซม์ไลเปสจะมีความเสถียรมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสูงสุด และความเสถียรจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

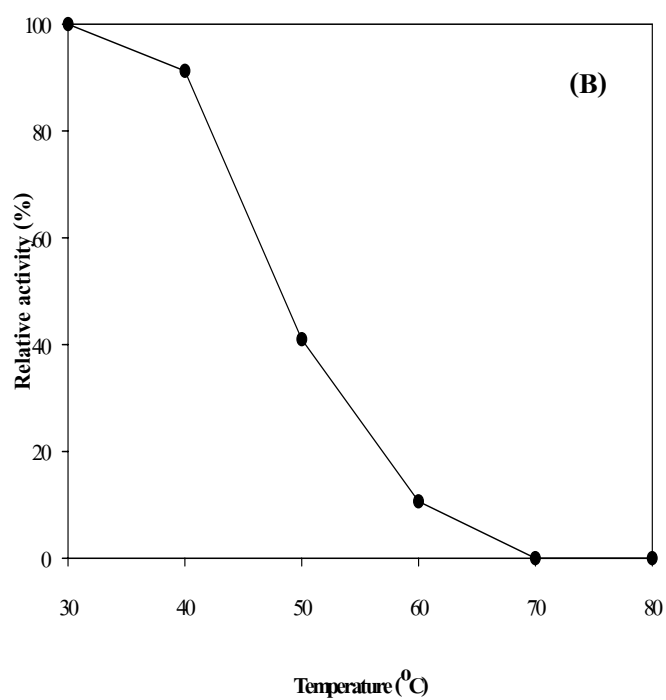
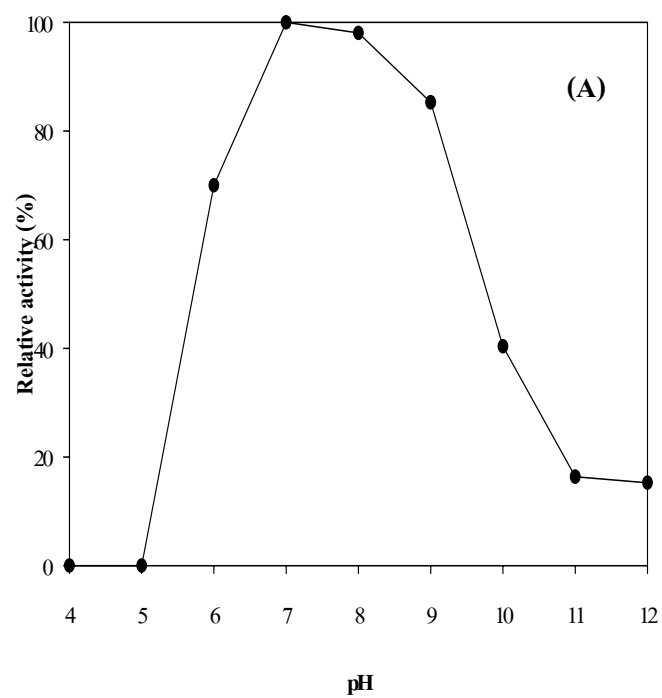
5.5 การทดสอบความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

การทดสอบความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส โดยทำการทดสอบในสภาพที่มีเกลือ NaCl ระดับความเข้มข้น 0-4.0 โมลาร์ (0-24.0 เปอร์เซ็นต์) ดังผลการทดลองในภาพที่ 19 จากการทดลองพบว่า เอนไซม์ไลเปสสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้นของเกลือ NaCl 2.5 โมลาร์ (15.0 เปอร์เซ็นต์) และเอนไซม์จะสามารถทำงานได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสูงสุดในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl ระหว่าง 1.0-4.0 โมลาร์ (6.0-24.0 เปอร์เซ็นต์) ส่วนในสภาพที่ไม่มีเกลือเอนไซม์ก็ยังสามารถทำงานได้เช่นกันแต่การทำงานจะต่ำกว่าในสภาพที่มีเกลือ จากผลการทดลองนี้แสดงว่าในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 จะต้องการเกลือ NaCl เพื่อให้การทำงานมีประสิทธิภาพสูงขึ้นหรือมีสมบัติเป็นเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ (halophilic lipase)

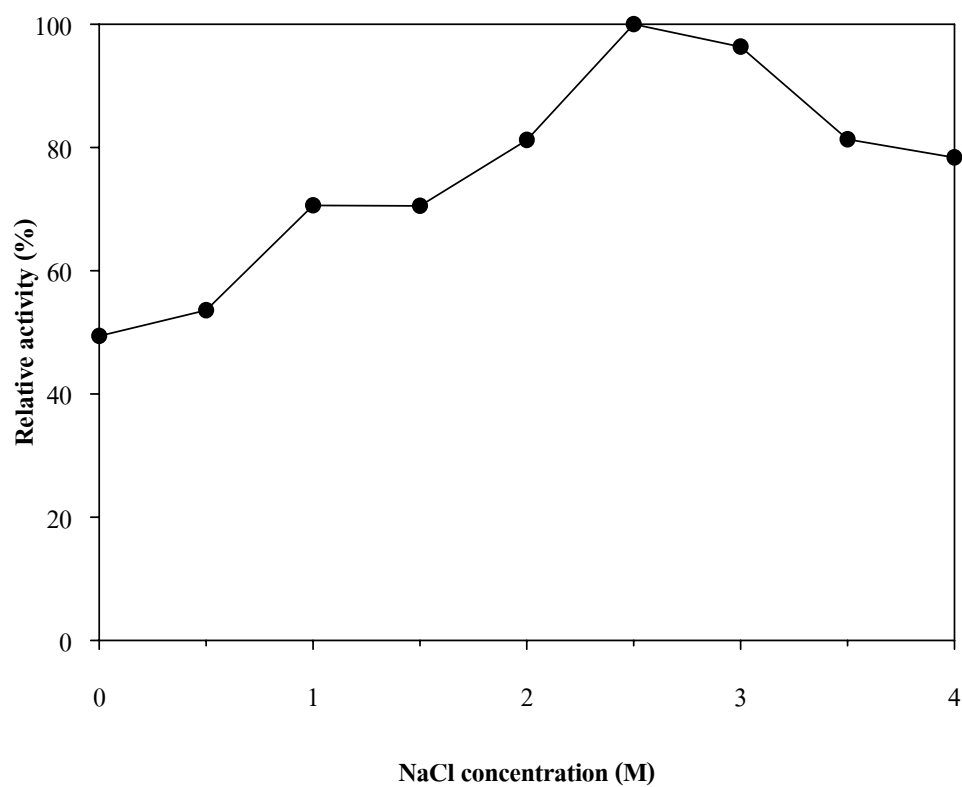
เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-9.0 และมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส เอนไซม์ไลเปสมีสมบัติเป็นเอนไซม์ที่ชอบเกลือ (halophilic lipase) โดยสามารถทำงานได้ดีที่สุดในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl เท่ากับ 2.5 โมลาร์ (15.0 เปอร์เซ็นต์) สมบัติการเป็นเอนไซม์ที่ชอบเกลือของเอนไซม์ไลเปสจะคล้ายกับเอนไซม์นิวคลีเอส H (nuclease H) จากเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นปานกลาง *Micrococcus varians* var. *halophilus* ซึ่งเป็นเอนไซม์นิวคลีเอสที่ชอบเกลือ (halophilic nuclease) ที่สามารถทำงานได้ดีในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl หรือ KCl ความเข้มข้น 1.0-4.0 โมลาร์ (Kamekura and Onishi, 1974; Kamekura and Onishi, 1978) เอนไซม์นิวคลีเอสที่ชอบเกลือจากเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นปานกลาง *Bacillus* sp. N 23-2 ที่สามารถทำงานได้ดีในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl 1.4-3.2 โมลาร์ หรือเกลือ KCl 2.3-3.2 โมลาร์ (Onishi *et al.*, 1983; Ventosa, 1991) และเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่ชอบเกลือ (halophilic ribonuclease) จากเชื้อแบคทีเรียทนเกลือ *Pseudomonas* sp. No. 3241 ที่สามารถทำงานได้ดีในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl 3.0 โมลาร์ (อนันต์, 2545; Ikeda, 2000; Kanlayakrit *et al.*, 2001) จากคุณสมบัติดังกล่าวเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 จึงมีความเป็นไปได้สำหรับการนำไปใช้ร่วมกับการหมักน้ำปลาซึ่งมีสภาพความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 10-30 เปอร์เซ็นต์ มีพีเอช 5.0-7.0 และอุณหภูมิประมาณ 30-40 องศาเซลเซียสในระหว่างการหมัก (Saisithi *et al.*, 1966) โดยจะเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือลงไปร่วมกับการหมักแล้วปล่อยให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันในตัวปลาให้กลายเป็นกรดไขมันชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะพวกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและระเหยได้ เช่น acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid เป็นต้น ซึ่งกรดไขมันชนิดต่าง ๆ เหล่านี้จะมีกลิ่นเฉพาะตัวและจะช่วยทำให้น้ำปลามีกลิ่นที่ดีขึ้นได้ (Saisithi, 1967; Dougan and Howard, 1975; McIver *et al.*, 1982; Sanceda *et al.*, 2003).



ภาพที่ 17 อิทธิพลของพีเอช (A) และอุณหภูมิ (B) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย
ทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233



ภาพที่ 18 ความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ที่พีเอช (A) และอุณหภูมิ (B) ต่าง ๆ



ภาพที่ 19 อิทธิพลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233

6. การทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์

นำเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 มาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยการทำเอนไซม์ให้เข้มข้น นำเอนไซม์มาผ่านเจลฟิลเตรชัน คอลัมน์ (gel filtration column) ซึ่งบรรจุ Sephadex G-100 และผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบ แลกเปลี่ยนประจุ (anion exchange column) ซึ่งบรรจุ DEAE Toyopearl 650M ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE

จากภาพที่ 20 หลังจากการนำเอนไซม์ไลเปสผ่านเจลฟิลเตรชันคอลัมน์ พบว่าโปรตีนใน สารละลายเอนไซม์จะออกมาจากคอลัมน์ในช่วงหลอดที่ 5-95 โดยกราฟที่ปรากฏออกมาจะมี ลักษณะเป็น 3 ส่วน เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะพบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ในช่วงหลอดที่ 34-50 ซึ่งลักษณะกราฟของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจะอยู่บริเวณกราฟโปรตีนส่วน ที่ 2 สำหรับกราฟโปรตีนส่วนที่ 1 และ 3 จะไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส แสดงว่าการผ่าน เจลฟิลเตรชันคอลัมน์สามารถแยกโปรตีนที่ไม่ต้องการได้ดีพอสมควร โดยโปรตีนที่ไม่ต้องการจะ ถูกแยกออกไปในส่วนของกราฟโปรตีนส่วนที่ 1 และ 3

จากภาพที่ 21 นำเอนไซม์ที่ออกจากเจลฟิลเตรชันคอลัมน์มาทำแห้งแบบเยือกแข็ง แล้วผ่านลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ พบว่าหลังจากผ่านสารละลายเอนไซม์ลง ในคอลัมน์แล้วทำการชะคอลัมน์โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์พบว่ามีโปรตีนหลุดออกมาจากคอลัมน์ ในช่วงหลอดที่ 24-43 แต่เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ ในส่วนนี้ จากนั้นทำการชะไล่ (elute) เอนไซม์โดยการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแบบเส้นตรง (linear gradient) สามารถแยกโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ออกจากคอลัมน์ในช่วงหลอดที่ 70-90 และพบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในช่วงหลอดที่ 75-87 แสดงว่าเอนไซม์ไลเปสสามารถเกาะได้ดี กับตัวแลกเปลี่ยนประจุจึงถูกชะออกมาจากคอลัมน์อยู่ในกราฟโปรตีนส่วนที่ 2

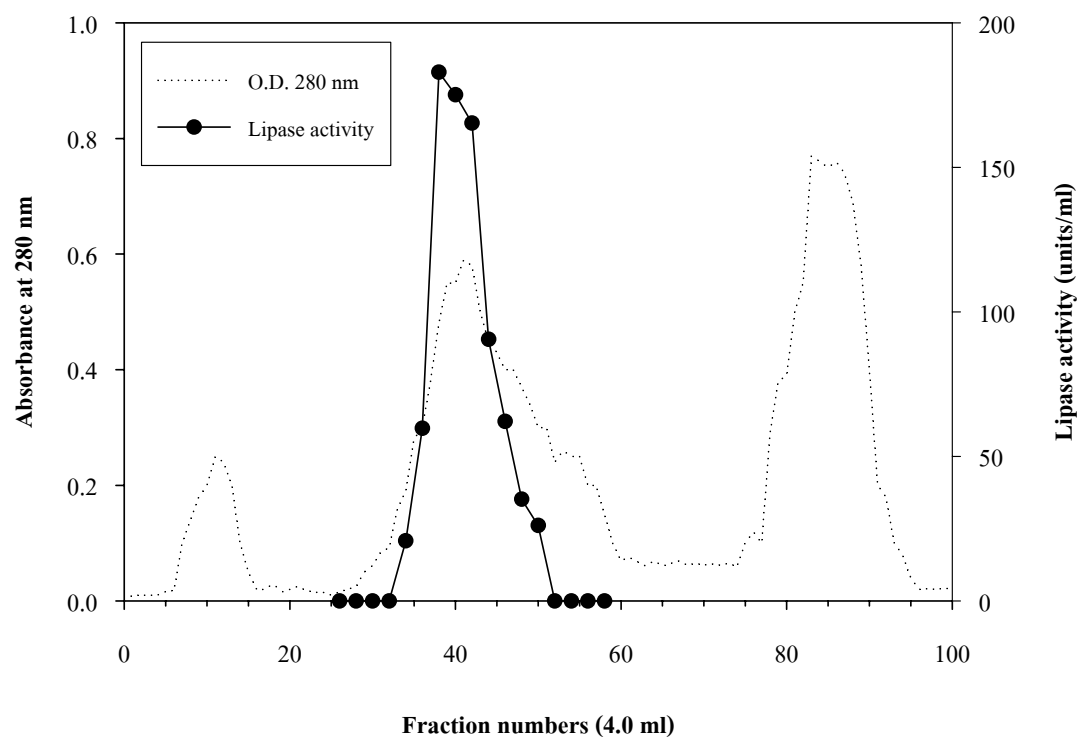
นำเอนไซม์ไลเปสที่แยกได้ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE ดังภาพที่ 22 และ 23 จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ แยกได้ปรากฏแถบโปรตีนเพียงหนึ่งแถบซึ่งมีค่าการเคลื่อนที่ (mobility, R_f) เท่ากับ 0.46 และมี น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45,000 ดาลตัน เมื่อเทียบจากกราฟโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนัก โมเลกุล จากการศึกษากของ Talon *et al.* (1995) พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรีย

Staphylococcus warneri มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45,000 ดาลตัน และน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Staphylococcus* sp. ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 43,000-45,000 ดาลตัน (Kotting *et al.*, 1983; Talon *et al.*, 1995; Oh *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2001; Saxena *et al.*, 2003; Mosbah *et al.*, 2005) ดังนั้นขนาดโมเลกุลของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* PB233 จึงมีขนาดใกล้เคียงเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Staphylococcus* sp. ที่ได้มีการศึกษาไว้แล้ว

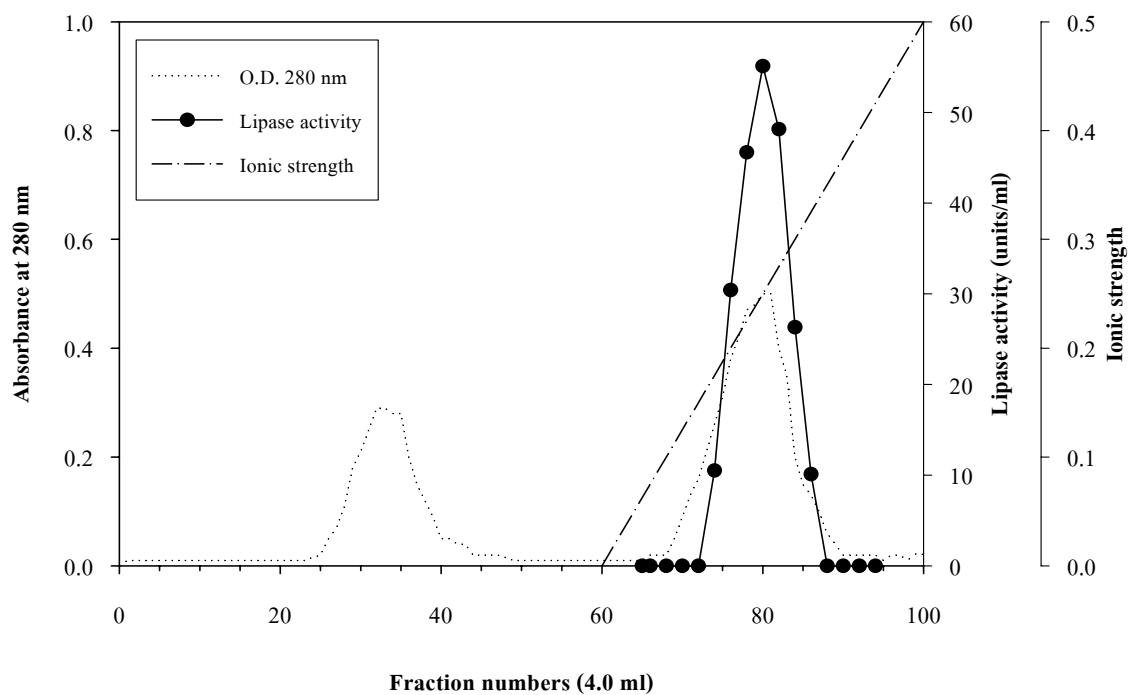
ผลการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์แสดงดังตารางที่ 8 นำเอนไซม์มาทำให้เข้มข้นโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 45.51 เท่าของเอนไซม์เริ่มต้น และมีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดคงเหลือ 69.77 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเมื่อนำสารละลายเอนไซม์ไปทำไดอะไลซิส (dialysis) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.0 และทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่าเอนไซม์จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 47.60 เท่าของเอนไซม์เริ่มต้น และมีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดคงเหลือ 65.55 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเอนไซม์มาผ่านเจลฟิลเตรชัน พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 65.97 เท่าของเอนไซม์เริ่มต้น และมีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดคงเหลือ 33.10 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการผ่านเอนไซม์ลงไปในคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนประจุ พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 137.34 เท่าของเอนไซม์เริ่มต้น และมีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดคงเหลือ 10.45 เปอร์เซ็นต์

จากขั้นตอนการทำเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* PB233 ให้บริสุทธิ์ เมื่อพิจารณาถึงปริมาณเอนไซม์ที่ได้ในขั้นตอนสุดท้าย พบว่า เอนไซม์ไลเปสมีการสูญเสียกิจกรรม 89.55 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น ส่วนความบริสุทธิ์ (purification fold) ของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น 137.34 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองของ Talon *et al.* (1995) ซึ่งศึกษาการทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ผ่านคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนประจุ คือ DEAE-Sepharose และผ่าน phenyl-Sepharose พบว่าเอนไซม์ที่บริสุทธิ์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 229 เท่า และมีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดคงเหลือ 7.4 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจะเห็นว่าการทำเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* PB233 ให้บริสุทธิ์ครั้งนี้จะได้เอนไซม์ไลเปสที่มีความบริสุทธิ์ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* ที่ได้มีการศึกษาไว้แล้ว ซึ่งสาเหตุอาจเนื่องมาจากวิธีการและ

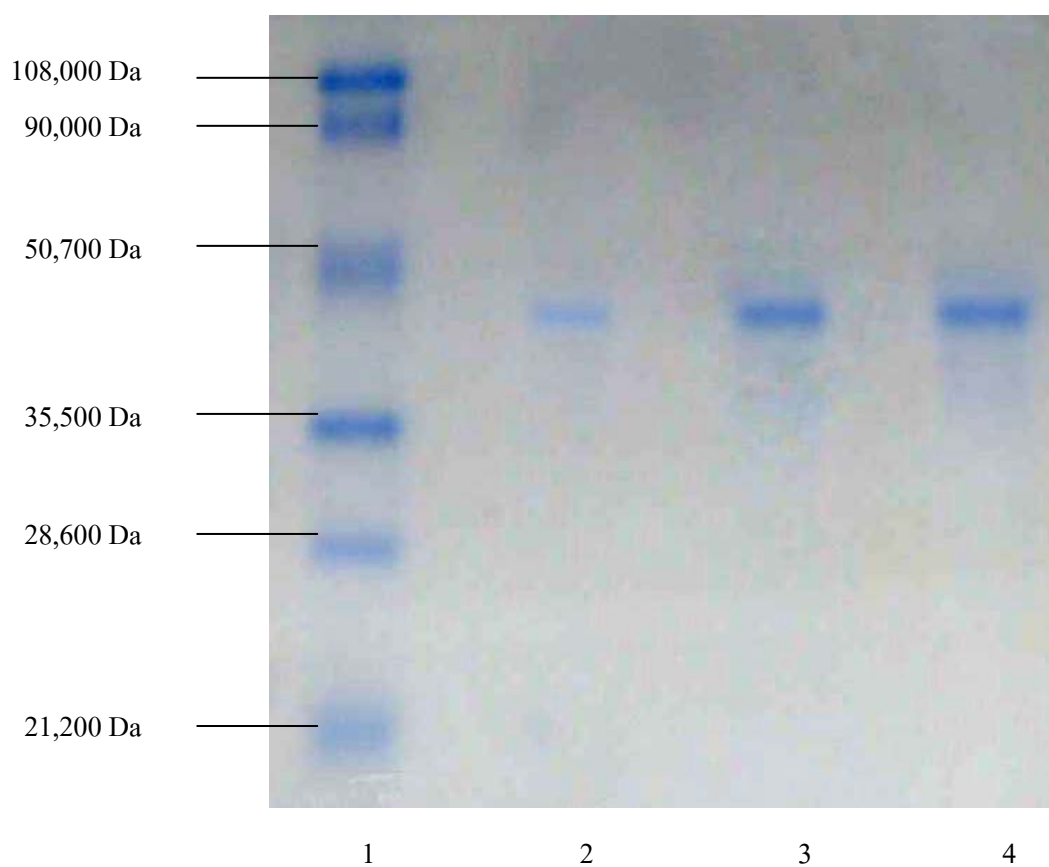
ขั้นตอนในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์มีความแตกต่างกัน สำหรับปริมาณเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ที่มีการสูญเสียกิจกรรมสูงถึง 89.55 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น สาเหตุอาจเนื่องมาจากวิธีการและขั้นตอนในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์อาจยังไม่เหมาะสมทำให้เอนไซม์อาจเกิดการสูญเสียไปในระหว่างขั้นตอนต่าง ๆ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการปรับเปลี่ยนวิธีการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ให้เหมาะสมและมีประสิทธิภาพมากขึ้นเพื่อทำให้เกิดการสูญเสียเอนไซม์ในระหว่างขั้นตอนต่าง ๆ น้อยลงและได้เอนไซม์ในปริมาณที่สูงขึ้น



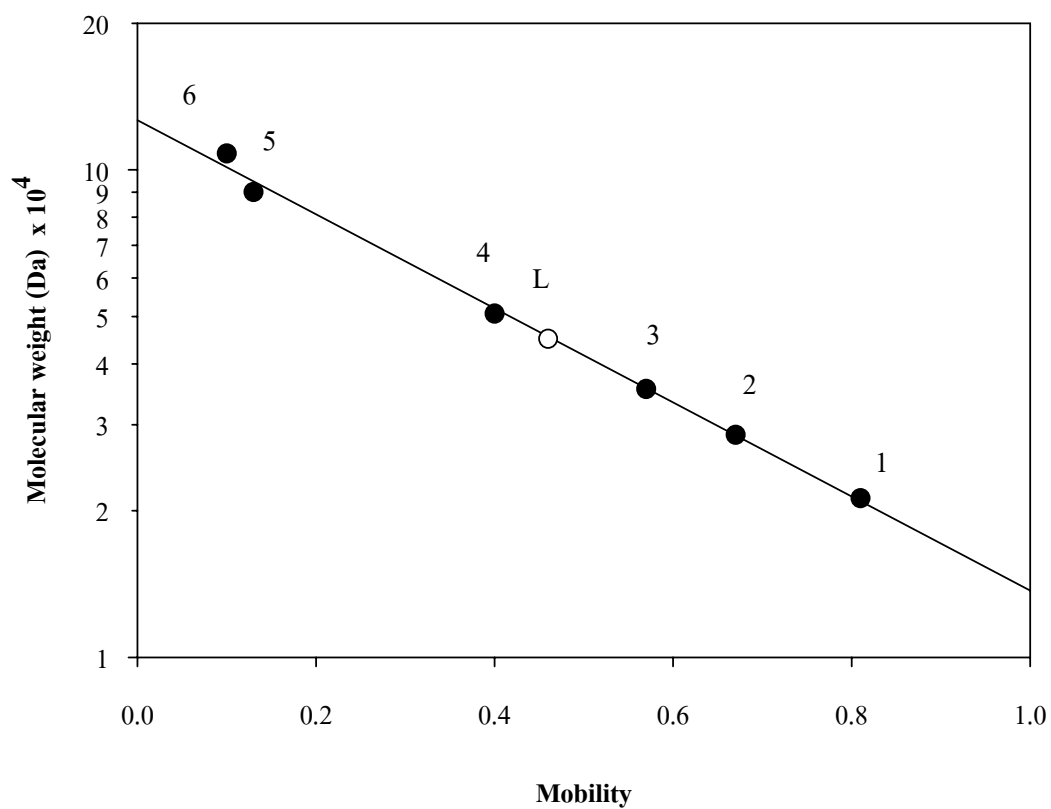
ภาพที่ 20 Sephadex G-100 เจลฟิเตรชันคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเอนไซม์ไลเปสจาก
แบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233



ภาพที่ 21 DEAE Toyopearl 650M คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ
ของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233



ภาพที่ 22 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE ของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 7.0 เปอร์เซ็นต์
 ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน
 ช่องที่ 2-4 เอนไซม์ไลเปส



ภาพที่ 23 การหาค่าน้ำหนักโมเลกุลจากของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ

Staphylococcus warneri PB233 ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE

สัญลักษณ์

1. Lysozyme (21,200)
2. Soybean trypsin inhibitor (28,600)
3. Carbonic anhydrase (35,500)
4. Ovalbumin (50,700)
5. Bovine serum albumin (90,000)
6. Phosphorylase B (108,000)
- L. Lipase

ตารางที่ 8 ลำดับขั้นตอนการทำเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียทนเกลือ
Staphylococcus warneri PB233 ให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนการทำ เอนไซม์ให้ บริสุทธิ์	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาณ โปรตีน ทั้งหมด (มิลลิกรัม)	กิจกรรม เอนไซม์ ทั้งหมด (หน่วย)	กิจกรรม เอนไซม์ จำเพาะ (หน่วยต่อ มิลลิกรัม โปรตีน)	ความบริสุทธิ์ เอนไซม์ (เท่า)	เปอร์เซ็นต์ ผลผลิต
Culture filtrate	1,500	11,037.80	45,255	4.10	1	100
50% ethanol precipitation	150	169.22	31,575	186.59	45.51	69.77
Dialysis	160	152.00	29,662.80	195.15	47.60	65.55
Sephadex G-100	80	55.38	14,979.18	270.48	65.97	33.10
DEAE Toyopearl 650M	50	8.4	4,730	563.10	137.34	10.45

หมายเหตุ กิจกรรมจำเพาะ หมายถึง กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด (หน่วย)/ปริมาณโปรตีนทั้งหมด
(มิลลิกรัม)

เปอร์เซ็นต์ผลผลิต หมายถึง กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด (หน่วย)/กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด
จาก culture filtrate (หน่วย)

ความบริสุทธิ์ หมายถึง กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์บริสุทธิ์ (หน่วย/มก. โปรตีน)/
กิจกรรมจำเพาะ ของเอนไซม์เริ่มต้น (หน่วย/มก. โปรตีน)

7. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์

จากการทดลองทำเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ให้บริสุทธิ์ สามารถแยกเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์ได้ ทำการทดสอบสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ ดังต่อไปนี้

7.1 การทดสอบพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์

การทดสอบพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ โดยทำการทดสอบในช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-12.0 ดังผลการทดลองในภาพที่ 24(A) จากการทดลองพบว่า เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0 เช่นเดียวกับเอนไซม์ที่ยังไม่บริสุทธิ์ เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จะสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-10.0 เช่นเดียวกับเอนไซม์ที่ยังไม่บริสุทธิ์ โดยจะทำงานได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสูงสุด และพบว่าความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จะลดลงในช่วงพีเอชที่มีความเป็นกรดและด่างสูง ๆ

7.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์

การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ โดยทำการทดสอบในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-80 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 7.0 ดังผลการทดลองในภาพที่ 24(B) จากการทดลองพบว่า เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับเอนไซม์ที่ยังไม่บริสุทธิ์ เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์สามารถทำงานได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสูงสุดในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-50 องศาเซลเซียส ซึ่งจะสามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่กว้างกว่าเอนไซม์ที่ยังไม่บริสุทธิ์ และความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

7.3 การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ที่พีเอชต่าง ๆ

การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ที่พีเอชต่าง ๆ โดยทำการทดสอบในช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-12.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังผลการทดลองในภาพที่ 25(A) จากการทดลองพบว่า เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์มีความเสถียรสูงสุดที่พีเอช 7.0 เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์มีความเสถียรในช่วงพีเอชเดียวกับเอนไซม์ไลเปสที่ยังไม่บริสุทธิ์คือระหว่าง 6.0-9.0 โดยเอนไซม์จะมีความเสถียรมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสูงสุด และเอนไซม์ไลเปสจะมีความเสถียรต่ำในช่วงพีเอชที่มีความเป็นกรดหรือด่างสูงขึ้น

7.4 การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

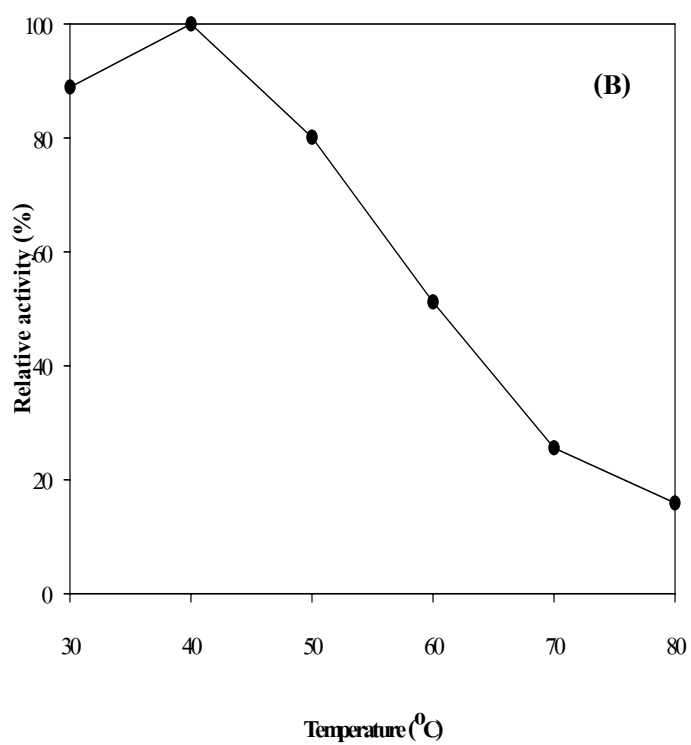
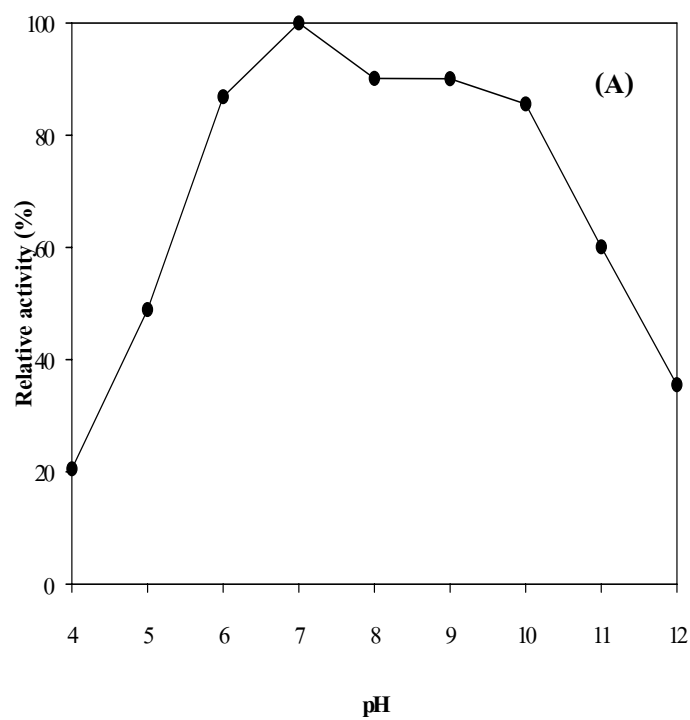
การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยทำการทดสอบในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นจึงวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ ดังผลการทดลองในภาพที่ 25(B) จากการทดลองพบว่าเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์มีความเสถียรสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับเอนไซม์ไลเปสที่ยังไม่บริสุทธิ์ โดยในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จะมีความเสถียรมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสูงสุด และความเสถียรของเอนไซม์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

7.5 การทดสอบความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์

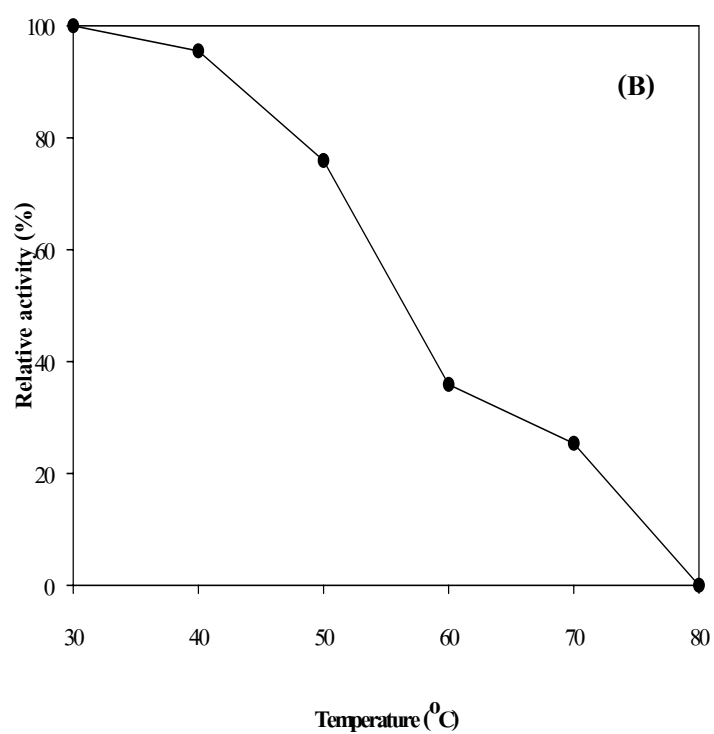
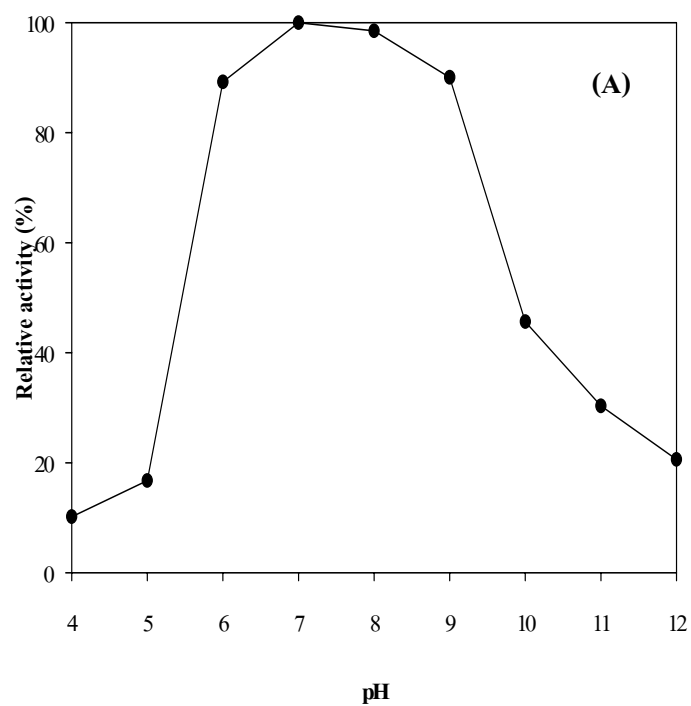
การทดสอบความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ โดยทำการทดสอบในสภาพที่มีเกลือ NaCl ระดับความเข้มข้น 0-4.0 โมลาร์ (0-24.0 เปอร์เซ็นต์) ดังผลการทดลองในภาพที่ 26 จากการทดลองพบว่าเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้นของเกลือ NaCl 2.5 โมลาร์ (15.0 เปอร์เซ็นต์) เช่นเดียวกับเอนไซม์ไลเปสที่ยังไม่บริสุทธิ์ และเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จะสามารถทำงานได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสูงสุดในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl ระหว่าง 1.0-4.0 โมลาร์ (6.0-24.0 เปอร์เซ็นต์) ส่วนในสภาวะที่ไม่มีเกลือเอนไซม์ก็ยังสามารถทำงานได้เช่นกันแต่การทำงานจะต่ำกว่าในสภาวะที่มีเกลือ จากผลการทดลองนี้แสดงว่าในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 จะต้องการเกลือ NaCl เพื่อให้การ

ทำงานมีประสิทธิภาพสูงขึ้นหรือมีสมบัติเป็นเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ (halophilic lipase) เช่นเดียวกับเอนไซม์ไลเปสที่ยังไม่บริสุทธิ์

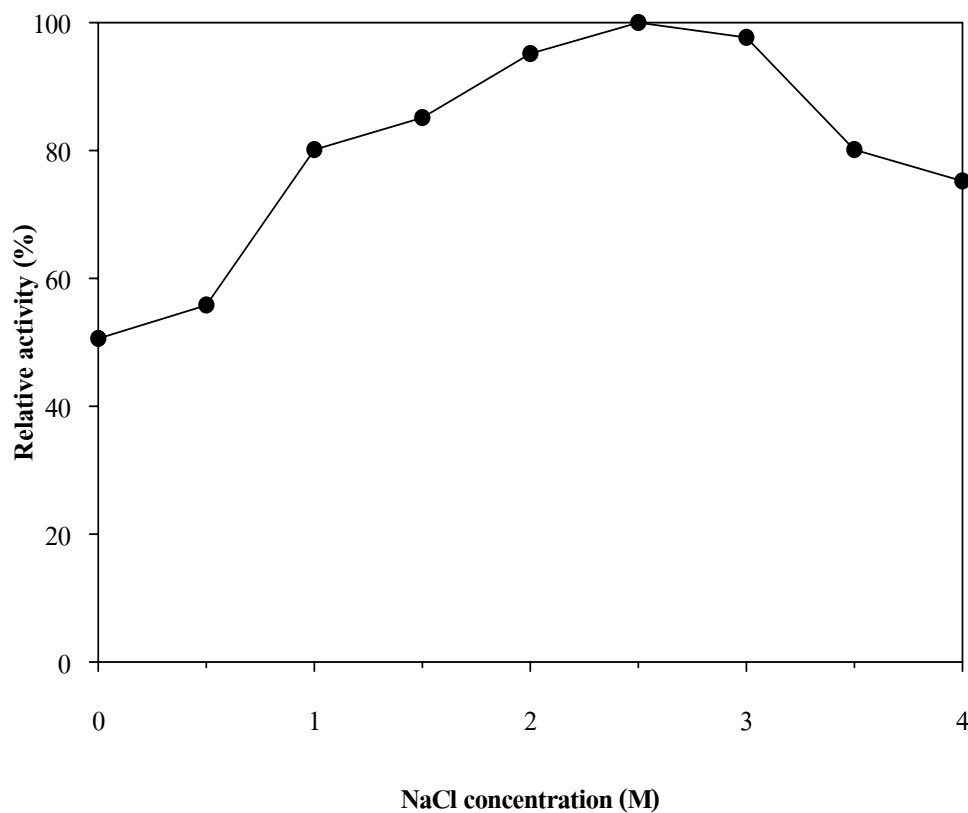
เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-9.0 และมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์มีสมบัติเป็นเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ (halophilic lipase) เช่นเดียวกับเอนไซม์ไลเปสที่ยังไม่บริสุทธิ์โดยสามารถทำงานได้ดีในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือ NaCl 2.5 โมลาร์ (15.0 เปอร์เซ็นต์) จากผลการทดลองในการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่บริสุทธิ์เปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ยังไม่บริสุทธิ์ พบว่าจะมีสมบัติบางอย่างแตกต่างกันบ้างเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในระหว่างกระบวนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์อาจมีการกำจัดสารปนเปื้อนบางอย่างที่เกาะติดกับเอนไซม์ออกไปทำให้เอนไซม์มีสมบัติบางอย่างแตกต่างออกไป เช่น สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่กว้างขึ้น โดยจะการทำงานที่พีเอชและอุณหภูมิต่าง ๆ ได้สูงกว่าเอนไซม์ที่ยังไม่บริสุทธิ์ เป็นต้น



ภาพที่ 24 อิทธิพลของพีเอช (A) และอุณหภูมิ (B) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์
จากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233



ภาพที่ 25 ความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ที่พีเอช (A) และอุณหภูมิ (B) ต่าง ๆ



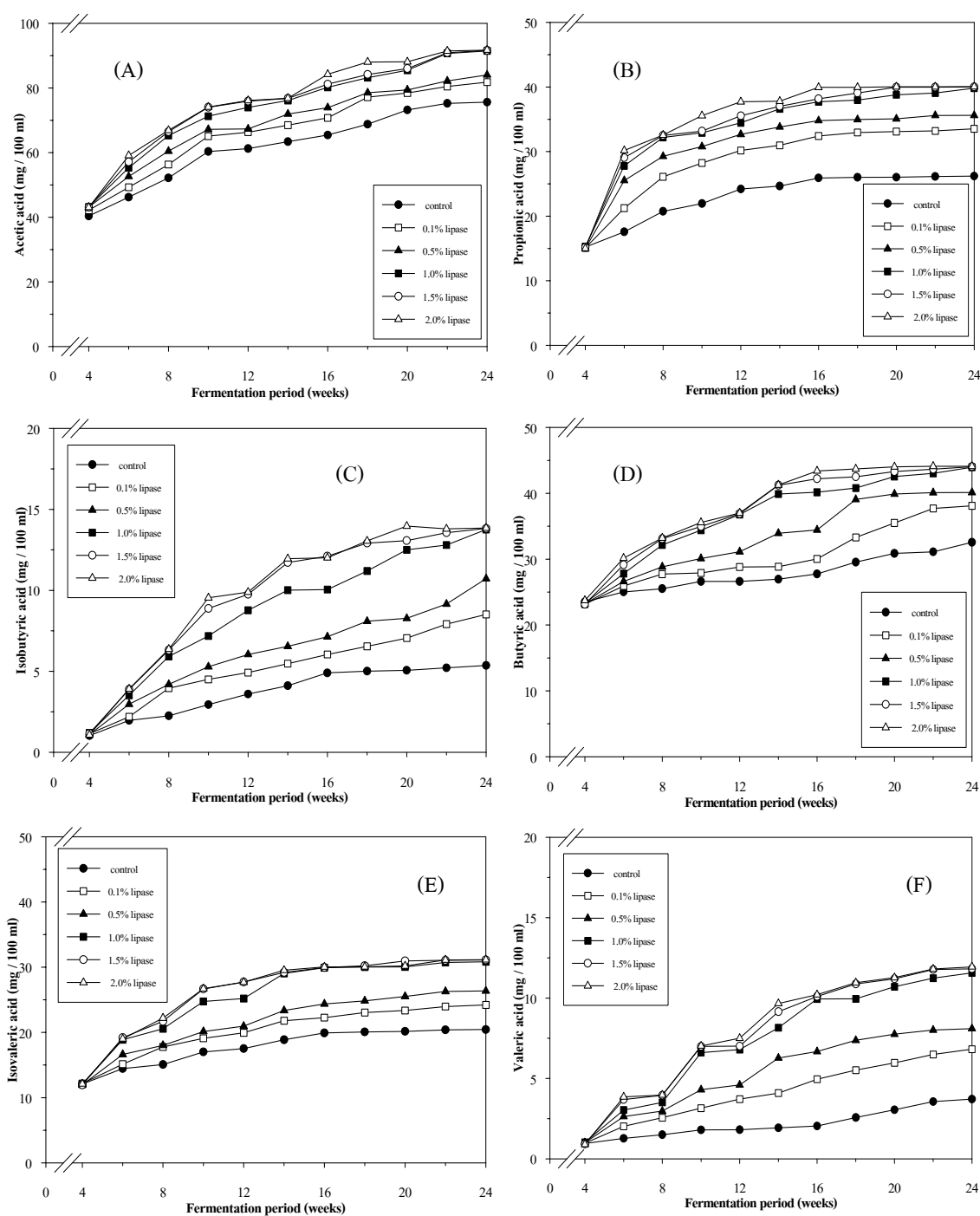
ภาพที่ 26 อิทธิพลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส
บริสุทธิ์จากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233

8. การหมักน้ำปลา

8.1 ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ (volatile fatty acid) ในน้ำปลา

ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ (volatile fatty acid) ได้แก่ acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid ซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีบทบาทต่อกลิ่นของน้ำปลา (Saisithi, 1967; Dougan and Howard, 1975; McIver *et al.*, 1982; Sanceda *et al.*, 2003) ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC) ในน้ำปลาที่ทดลองเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากหมักเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลการทดลองแสดงดัง ภาพที่ 27 A, B, C, D, E และ F จากการทดลองพบว่าปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ ได้แก่ acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid ที่เกิดขึ้นในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ (0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์) ร่วมกับการหมักจะสูงกว่าในน้ำปลาที่ไม่เติมเอนไซม์ การเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือที่ความเข้มข้นสูงขึ้นจะทำให้ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้ง 6 ชนิด ในน้ำปลามีปริมาณสูงขึ้นตามไปด้วย แสดงว่าเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 น่าที่จะมีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันในตัวอย่างไปเป็นกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ

ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้ง 6 ชนิด ในน้ำปลาจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้น ในช่วงระยะเวลาการหมัก 6-18 สัปดาห์ ซึ่งเป็นช่วงแรกที่เอนไซม์ลงไป ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้ง 6 ชนิด จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จากนั้นในช่วงระยะเวลาการหมัก 18-24 สัปดาห์ ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้ง 6 ชนิด จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น การเพิ่มปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ในช่วงท้ายของการหมักจะต่ำกว่าในช่วงแรก ทั้งนี้อาจเนื่องจากเมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้นเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือบางส่วนอาจถูกทำลายจากเอนไซม์โปรติเอสที่มีในตัวปลา หรือสภาวะบางอย่าง เช่น อุณหภูมิ พีเอช ในระหว่างการหมักเกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง



ภาพที่ 27 ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ acetic acid (A), propionic acid (B), isobutyric acid (C), butyric acid (D), isovaleric acid (E) และ valeric acid (F) ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก น้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการหมัก

8.2 ผลของการเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือต่อการเกิดกรดไขมันที่ระเหยได้ในน้ำปลา

ทำการวิเคราะห์ผลของการเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ต่อการเกิดกรดไขมันที่ระเหยได้ 6 ชนิด ได้แก่ acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid ในน้ำปลาที่ทำการหมักเป็นเวลา 24 สัปดาห์ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomize Design, CRD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกรดไขมันที่ระเหยได้ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ในการทดลองหน่วยทดลองคือน้ำปลาที่หมักในแต่ละขวด แบ่งการทดลองเป็น 6 การทดลอง (treatment) การทดลองละ 3 ขั้ว คือ เมื่อหมักปลากับเกลือทั้งไว้ 4 สัปดาห์แล้ว การทดลองที่ 1 ตัวอย่างควบคุม (control) ไม่เติมเอนไซม์ การทดลองที่ 2 เติมเอนไซม์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ การทดลองที่ 3 เติมเอนไซม์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ การทดลองที่ 4 เติมเอนไซม์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ การทดลองที่ 5 เติมเอนไซม์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และการทดลองที่ 6 เติมเอนไซม์ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 9 จากการทดลองพบว่า การเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือร่วมกับการหมักน้ำปลาจะทำให้ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ในน้ำปลาเพิ่มสูงขึ้น ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้ง 6 ชนิด ที่เกิดขึ้นในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก แตกต่างจากน้ำปลาที่ไม่มีการเติมเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) น้ำปลาที่เติมเอนไซม์ 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้ง 6 ชนิดที่เกิดขึ้นในน้ำปลาแตกต่างจากน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เกิดไขมันที่ระเหยได้ทั้ง 6 ชนิด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

จากผลการทดลองแสดงว่าการเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปร่วมกับการหมักน้ำปลาจะทำให้ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ 6 ชนิด ได้แก่ acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid ในน้ำปลาสูงกว่าการไม่เติมเอนไซม์ การเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือร่วมกับการหมักน้ำปลาที่ระดับความเข้มข้นสูงจะทำให้เกิดปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ในน้ำปลาสูงขึ้นไปด้วย การเติมเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการหมักน้ำปลาจะทำให้เกิดกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้ง 6 ชนิด ในน้ำปลาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจากเชื้อแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 สำหรับเติมลงไปร่วมกับการหมักน้ำปลาเพื่อเพิ่มปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ในน้ำปลาคือการใช้เอนไซม์ 1.0 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 9 ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ (มิลลิกรัม / 100 มิลลิลิตร) ในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการหมักเป็นเวลา 24 สัปดาห์

ความเข้มข้น เอนไซม์ (เปอร์เซ็นต์)	Acetic ^{1/} acid	Propionic ^{1/} acid	Isobutyric ^{1/} acid	Butyric ^{1/} acid	Isovaleric ^{1/} acid	Valeric ^{1/} acid
0	75.60 ^d	26.20 ^d	5.36 ^d	32.55 ^d	20.43 ^d	3.71 ^d
0.1	81.80 ^c	33.52 ^c	8.51 ^c	38.10 ^c	24.21 ^c	6.82 ^c
0.5	84.02 ^b	35.61 ^b	10.72 ^b	40.12 ^b	26.35 ^b	8.10 ^b
1.0	91.45 ^a	39.81 ^a	13.75 ^a	43.95 ^a	30.11 ^a	11.56 ^a
1.5	91.61 ^a	40.01 ^a	13.82 ^a	44.03 ^a	31.11 ^a	11.82 ^a
2.0	91.70 ^a	40.05 ^a	13.85 ^a	44.10 ^a	31.13 ^a	11.94 ^a
C.V.(ร้อยละ)	0.36	1.16	2.09	0.68	2.25	3.79

หมายเหตุ ^{1/} = ตัวอักษรที่แตกต่างกันเหนือตัวเลขในแนวดิ่ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$)

8.3 ผลของการเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือต่อองค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของน้ำปลา

ทำการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและกายภาพได้แก่ ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ปริมาณเกลือ ฟอสเฟต และสีของน้ำปลาที่ผลิตโดยไม่ได้เติมเอนไซม์ (control) และเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการหมักเป็นเวลา 24 สัปดาห์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 28 และ 29

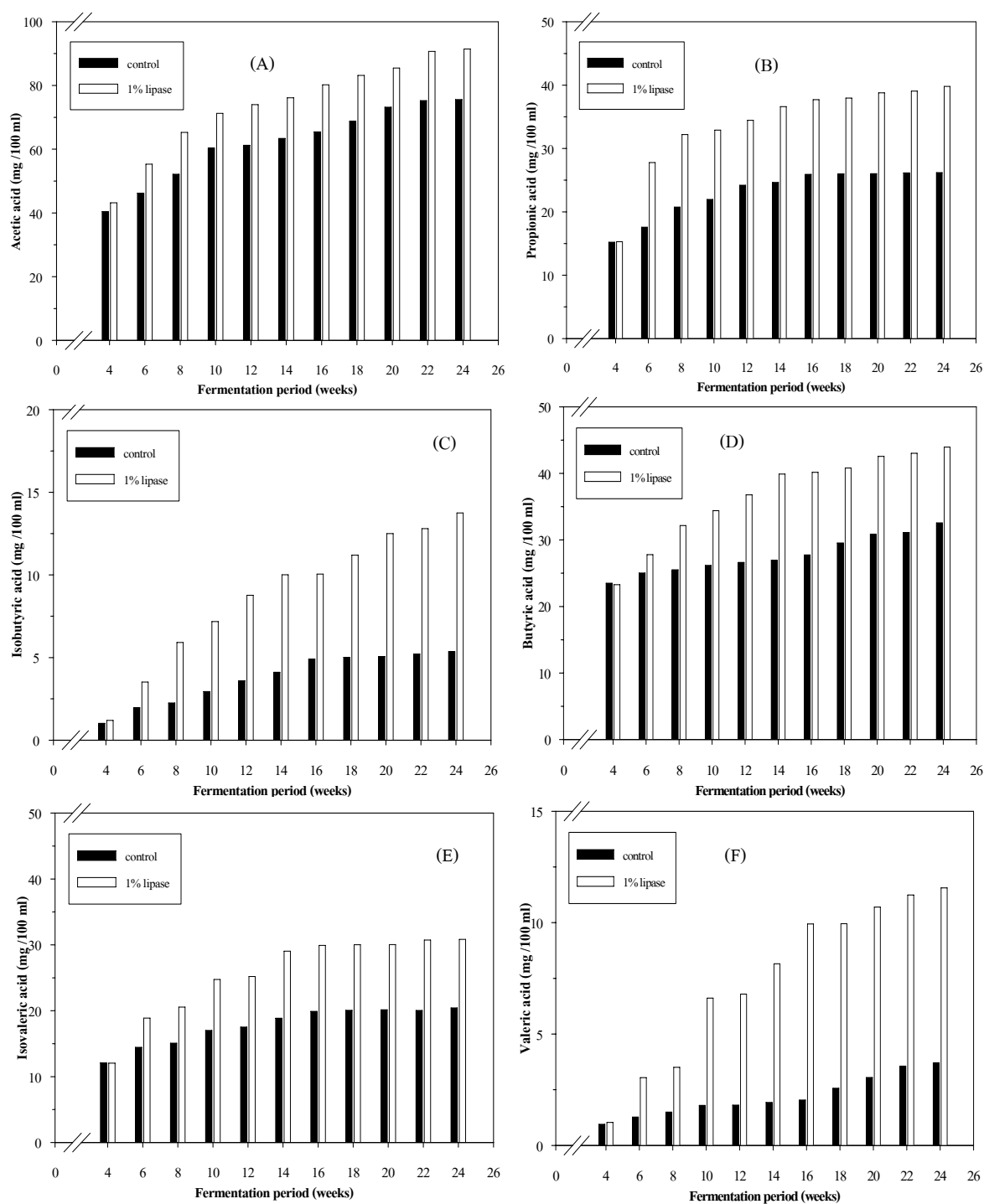
จากการทดลองพบว่าปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ ได้แก่ acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid ที่เกิดขึ้นในน้ำปลาที่ไม่ได้เติมเอนไซม์และที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ 1.0 เปอร์เซ็นต์ จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้น แต่ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้ง 6 ชนิด ในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ 1.0 เปอร์เซ็นต์ จะสูงกว่าในน้ำปลาที่ไม่เติมเอนไซม์ที่ทุกระยะเวลาของการหมัก โดยจะมีปริมาณของ acetic acid สูงที่สุด รองลงมาได้แก่ butyric acid, propionic acid, isovaleric acid, isobutyric acid และ valeric acid ตามลำดับ (ภาพที่ 28 A, B, C, D, E และ F) จากผลการทดลองแสดงว่าเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 นำที่จะมีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันในตัวปลาไปเป็นกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ นอกเหนือไปจากปฏิกิริยา oxidative deamination ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดอะมิโนไปเป็นกรดไขมันในระหว่างการหมักน้ำปลา (ประเสริฐ, 2511; สายสมร, 2518; Sanceda *et al.*, 2003)

ปริมาณเกลือของน้ำปลาที่เติมและไม่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือระหว่างการหมักจะมีปริมาณใกล้เคียงกันและค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก โดยปริมาณเกลือจะอยู่ในช่วง 23.80-26.50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 29 A) ซึ่งความเข้มข้นของเกลือระดับนี้เอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ยังคงสามารถทำงานได้ดี เมื่อพิจารณาถึงปริมาณเกลือในน้ำปลาตามมาตรฐานของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก. 3-2526) โดยน้ำปลาคุณภาพดีต้องมีปริมาณเกลือไม่ต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะช่วยป้องกันการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์ได้ แสดงว่าน้ำปลาที่ได้จากการทดลองมีปริมาณเกลือที่เหมาะสมสอดคล้องกับน้ำปลาตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

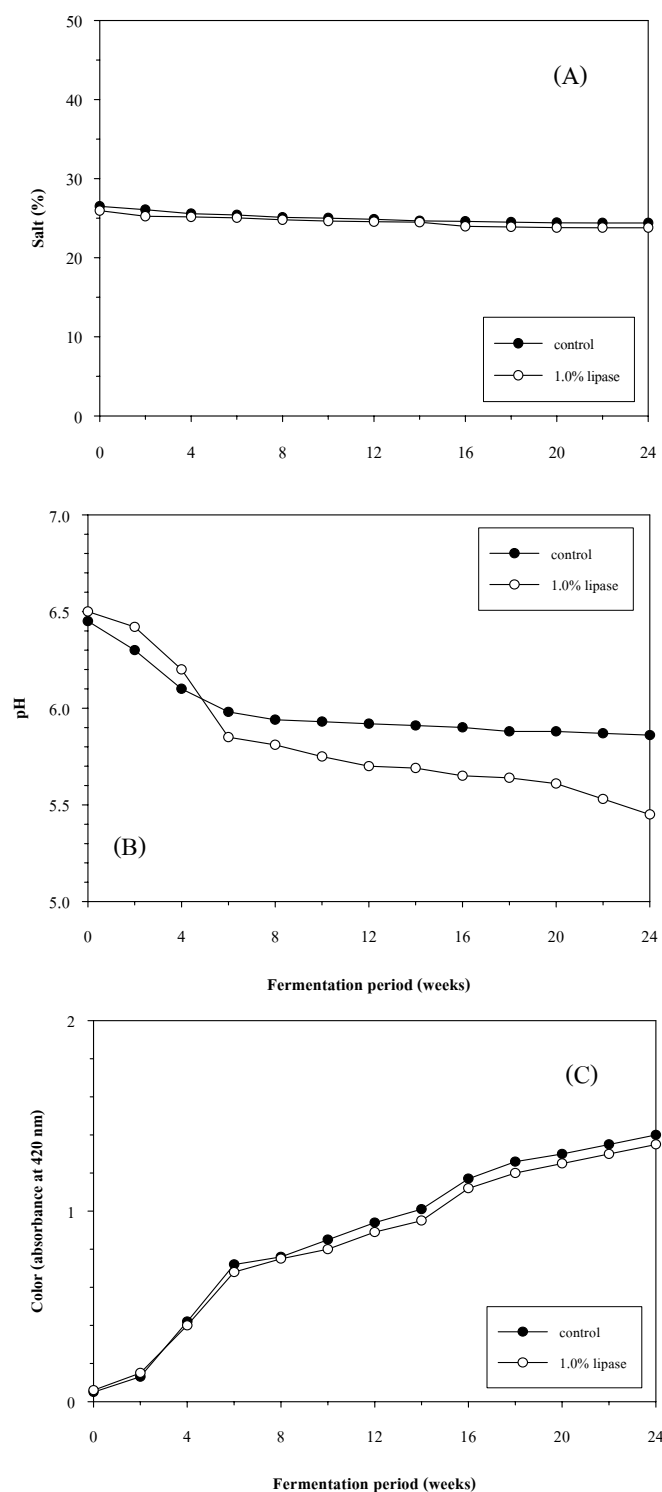
ฟิเอชของน้ำปลาที่เค็มและไม่เค็มเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือระหว่างการหมักจะค่อย ๆ ลดต่ำลงเรื่อย ๆ เมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้น (ภาพที่ 29 B) การที่ฟิเอชในระหว่างการหมักน้ำปลาลดต่ำลงเนื่องมาจากระหว่างการหมักน้ำปลานั้นจะมีการสะสมของกรดชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีน กรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ และกรดอินทรีย์ที่ระเหยไม่ได้ (Saisithi, 1967; Dougan and Howard, 1975; McIver *et al.*, 1982;) กรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในน้ำปลา ได้แก่ acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, 4-hydroxyvaleric acid lactone, n-butyric acid, isovaleric acid, levulinic acid และ phenylacetic acid (McIver *et al.*, 1982) ส่วนกรดอินทรีย์ที่ระเหยไม่ได้ที่พบในน้ำปลา คือ lactic acid (Saisithi, 1967) กรดต่าง ๆ ที่สะสมในน้ำปลาเกิดจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลา ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของกรดอะมิโนด้วยปฏิกิริยา deamination และ carboxylation การเปลี่ยนแปลงของไกลโคเจนที่มีอยู่มากในกล้ามเนื้อปลาผ่านเข้ากระบวนการไกลโคไลซิสซึ่งอาจเกิดจากการกระทำของแบคทีเรีย และการเกิดกรดไขมันชนิดต่าง ๆ จากปฏิกิริยา oxidative deamination หรือจากการทำงานของเอนไซม์จากแบคทีเรียและเอนไซม์ที่อยู่ในตัวปลา (ประเสริฐ, 2511; สายสมร, 2518; กฤษดา, 2529; Saisithi, 1967; Dougan and Howard, 1975; McIver *et al.*, 1982; Sanceda *et al.*, 2003) เมื่อพิจารณาฟิเอชของน้ำปลาที่เค็มและไม่เค็มเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือระหว่างการหมัก พบว่าน้ำปลาที่เค็มเอนไซม์จะมีการลดลงของฟิเอชมากกว่าน้ำปลาที่ไม่เค็มเอนไซม์ โดยฟิเอชของน้ำปลาที่เค็มและไม่เค็มเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือที่หมักเป็นเวลา 24 สัปดาห์ เท่ากับ 5.45 และ 5.86 ตามลำดับ น้ำปลาที่เค็มเอนไซม์จะมีระดับฟิเอชต่ำกว่าน้ำปลาที่ไม่เค็มเอนไซม์ ทั้งนี้เพราะการหมักน้ำปลาที่เค็มเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจะมีการสะสมของกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ สูงกว่าน้ำปลาที่ไม่เค็มเอนไซม์ (ภาพที่ 28 A, B, C, D, E และ F) แสดงว่าการเค็มเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือร่วมกับการหมักน้ำปลาน่าที่จะช่วยส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงของไขมันในตัวปลาไปเป็นกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ในน้ำปลา

ความเข้มสีของน้ำปลาที่เค็มและไม่เค็มเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือระหว่างการหมักจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้น (ภาพที่ 29 C) เนื่องมาจากสีของน้ำปลาเป็นผลมาจากปฏิกิริยา non-enzymatic browning reaction หรือ maillard reaction ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนกับสารประกอบคาร์บอนิลที่มาจากน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาล หรือสารประกอบที่เกิดจากการเติมออกซิเจนของไขมัน (Jones, 1962; Saisithi, 1967) สารที่ทำปฏิกิริยากันนี้เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการย่อยสลายของการหมักน้ำปลา ซึ่งจะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการหมัก เมื่อพิจารณาความเข้มสีของน้ำปลาที่เค็มและไม่เค็มเอนไซม์ไลเปสที่ชอบ

เกลือระหว่างการหมัก พบว่าน้ำปลาที่เติมเอนไซม์จะมีอัตราการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสีในระดับที่ต่ำกว่าน้ำปลาที่ไม่เติมเอนไซม์เล็กน้อย โดยความเข้มข้นของน้ำปลาที่เติมและไม่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือที่หมักเป็นเวลา 24 สัปดาห์ เท่ากับ 1.35 และ 1.40 ตามลำดับ สาเหตุอาจเนื่องมาจากน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือระหว่างการหมักจะมีพีเอชต่ำกว่าน้ำปลาที่ไม่เติมเอนไซม์ซึ่งจะส่งผลให้ปฏิกิริยา non-enzymatic browning reaction หรือ maillard reaction เกิดได้ช้า (วรรณ, 2534; Jones, 1962; Reynolds, 1965) ทำให้น้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสมีความเข้มข้นของสีต่ำกว่าน้ำปลาที่ไม่เติมเอนไซม์



ภาพที่ 28 ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ acetic acid (A), propionic acid (B), isobutyric acid (C), butyric acid (D), isovaleric acid (E) และ valeric acid (F) ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำตาลที่ไม่เค็มและเค็มเอนไซม์ไลเปสที่ขบเกลือจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับการหมัก



ภาพที่ 29 ปริมาณเกลือ (A) พีเอช (B) และความเข้มสี (C) ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่ไม่เติมและเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับการหมัก

8.4 องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดกับน้ำปลาที่ได้จากการเติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือร่วมกับการหมัก

ทำการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีและกายภาพได้แก่ ปริมาณฟอสฟอรัสในโตรเจน (formal nitrogen) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์กัวโนซีน 5'-โมโนฟอสเฟต (guanosine 5'-monophosphate, 5'-GMP) ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ ได้แก่ acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid ปริมาณเกลือ พิเอช และความเข้มข้นของน้ำปลาชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติเป็นเวลา 24 สัปดาห์ (FS) น้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ 1.0 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับการหมัก (HLFS) น้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์โปรติเอสไรโบนิวคลีเอส และไลเปสที่ชอบเกลือ 1.5, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ร่วมกับการหมัก (HPRHLFS) และน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาด (commercial fish sauce, C) ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 10

การเปรียบเทียบปริมาณฟอสฟอรัสในโตรเจนและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ซึ่งเป็นองค์ประกอบทางเคมีที่ใช้บอกระดับของการย่อยสลายโปรตีน (degree of protein hydrolysis) และแสดงถึงปริมาณโปรตีนในน้ำปลา (Beddow *et al.*, 1976) พบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสในโตรเจนและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของน้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติ น้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือชนิดเดียว น้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์โปรติเอส ไรโบนิวคลีเอส และไลเปสที่ชอบเกลือ และน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยน้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดจะมีปริมาณฟอสฟอรัสในโตรเจนและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูงกว่าน้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติและน้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือชนิดเดียว นั่นแสดงว่าการเติมเอนไซม์โปรติเอสที่ชอบเกลือร่วมกับการหมักน้ำปลาน่าที่จะสามารถเร่งกระบวนการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลาได้ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงปริมาณฟอสฟอรัสในโตรเจนและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของน้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์โปรติเอส ไรโบนิวคลีเอส และไลเปสที่ชอบเกลือกับน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดพบว่าน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดจะมีปริมาณฟอสฟอรัสในโตรเจนและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูงกว่าน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากน้ำปลามีระยะเวลาในการหมักแตกต่างกัน โดยน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดใช้ระยะเวลาในการหมักนานกว่าโดยมักจะใช้ระยะเวลาในการหมักนานถึง 12-18 เดือน ทำให้การย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลาเกิดได้มากและสมบูรณ์กว่า

การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP ซึ่งเป็นสารเสริมรสชาติ (flavor enhancer) ในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ ซึ่งมีส่วนช่วยทำให้น้ำปลามีรสชาติดีขึ้น (อนันต์, 2545; Kuninaka *et al.*, 1961) พบว่า น้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดและน้ำปลาที่หมักโดยมีการเติม เอนไซม์โปรติเอส ไรโบนิวคลีโอเอส และไลเปสที่ชอบเกลือมีปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่จะมีปริมาณสูงกว่าในน้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติและน้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือชนิดเดียว นั้นแสดงว่าการเติมเอนไซม์ไรโบนิวคลีโอเอสที่ชอบเกลือร่วมกับการหมักน้ำปลาจะสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย RNA ในตัวปลาไปเป็นสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP ได้

การเปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ (volatile fatty acid) ได้แก่ acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid ซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีบทบาทต่อกลิ่นของน้ำปลา (Saisithi, 1967; Dougan and Howard, 1975; McIver *et al.*, 1982; Sanceda *et al.*, 2003) พบว่า ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้ง 6 ชนิดของน้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือชนิดเดียวและน้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์โปรติเอส ไรโบนิวคลีโอเอส และไลเปสที่ชอบเกลือไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่จะมีปริมาณสูงกว่าน้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติ แสดงว่าเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือนำที่จะมีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันในตัวปลาไปเป็นกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้ง 6 ชนิดของน้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือกับน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาด พบว่าน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดจะมีปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้ง 6 ชนิดสูงกว่าน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ ซึ่งอาจเนื่องมาจากน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดใช้ระยะเวลาในการหมักนานกว่า โดยน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดมักจะใช้ระยะเวลาในการหมักนาน 12-18 เดือน ทำให้มีการสะสมของกรดชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีน กรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ และกรดอินทรีย์ที่ระเหยไม่ได้ (Dougan and Howard, 1975; McIver *et al.*, 1982; Saisithi, 1967) มากกว่าในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือซึ่งใช้เวลาในการหมักเพียงแค่ 24 สัปดาห์ (6 เดือน)

การเปรียบเทียบปริมาณเกลือในน้ำปลาทั้ง 4 ชนิด พบว่าปริมาณเกลือของน้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติกับน้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือชนิดเดียวและน้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์โปรติเอส ไรโบนิวคลีเอส และไลเปสที่ชอบเกลือไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่จะแตกต่างจากน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อพิจารณาถึงปริมาณเกลือในน้ำปลาทั้ง 4 ชนิดซึ่งมีปริมาณเกลืออยู่ในช่วง 23.06-24.40 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับในน้ำปลาตามมาตรฐานของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก. 3-2526) โดยน้ำปลาคุณภาพดีต้องมีปริมาณเกลือไม่ต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าน้ำปลาทั้ง 4 ชนิด มีปริมาณเกลือที่สอดคล้องกับน้ำปลาตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

การเปรียบเทียบพีเอชในน้ำปลาทั้ง 4 ชนิด พบว่าพีเอชของน้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติ น้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือชนิดเดียว น้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์โปรติเอส ไรโบนิวคลีเอส และไลเปสที่ชอบเกลือ และน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยพีเอชของน้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติจะสูงกว่าน้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือชนิดเดียวและน้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์โปรติเอส ไรโบนิวคลีเอส และไลเปสที่ชอบเกลือ ซึ่งอาจเนื่องมาจากน้ำปลาที่มีการเติมเอนไซม์ร่วมกับการหมักจะมีปริมาณกรดชนิดต่าง ๆ คือ กรดอะมิโน และกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ สูงกว่าในน้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติ สำหรับน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดพบว่ามีพีเอชต่ำที่สุดซึ่งอาจเนื่องมาจากน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดใช้ระยะเวลาในการหมักนานกว่าทำให้ให้มีการสะสมของกรดชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีน กรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ และกรดอินทรีย์ที่ระเหยไม่ได้มากกว่าในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือ

การเปรียบเทียบระดับความเข้มสีในน้ำปลาทั้ง 4 ชนิด พบว่าระดับความเข้มสีของน้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติ น้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือชนิดเดียว น้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์โปรติเอส ไรโบนิวคลีเอส และไลเปสที่ชอบเกลือ และน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยระดับความเข้มสีของน้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์โปรติเอส ไรโบนิวคลีเอส และไลเปสที่ชอบเกลือจะสูงกว่าน้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติและน้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือชนิดเดียว ซึ่งอาจเนื่องมาจากน้ำปลาที่หมักโดยเติมเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมีปริมาณกรดอะมิโนสูง ทำให้เกิดปฏิกิริยา non-enzymatic browning reaction หรือ maillard reaction ได้มาก ส่งผลให้น้ำปลามี

ระดับความเข้มสีสูง สำหรับน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดพบว่ามีความเข้มสีสูงที่สุด ซึ่งอาจเนื่องมาจากน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดใช้ระยะเวลาในการหมักนานทำให้เกิดสารประกอบต่างๆ ที่มีบทบาทในปฏิกิริยา non-enzymatic browning reaction หรือ maillard reaction เพิ่มขึ้น ทำให้ปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดได้มากขึ้น จึงทำให้น้ำปลามีระดับความเข้มสีสูง หรืออาจเนื่องมาจากน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดมีการแต่งสีโดยใช้น้ำตาลเคี้ยวไหม้ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ระดับความเข้มสีของน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดสูงได้

การทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสเบื้องต้นของน้ำปลาทั้ง 4 ชนิด ในด้าน สี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม โดยใช้ผู้ทดสอบที่บริโภคน้ำปลาเป็นประจำจำนวน 5 คน ซึ่งมีอายุในช่วง 35-45 ปี พบว่า ผู้ทดสอบทั้ง 5 คนให้การยอมรับน้ำปลาที่มีการเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือและน้ำปลาที่มีการเติมเอนไซม์โปรติเอส โรโบนิวคลีเอส และไลเปสที่ชอบเกลือรวมกับการหมัก ทางด้าน กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวมมากกว่าน้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติ โดยผู้ทดสอบได้อธิบายลักษณะกลิ่นของน้ำปลาที่ได้จากการเติมเอนไซม์ชนิดต่างๆ ว่ามีกลิ่นหอมของน้ำปลาที่หมักได้ที่แล้ว ส่วนน้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติจะไม่มีกลิ่นหอมของน้ำปลาแต่มีกลิ่นคาวและมีกลิ่นคล้ายน้ำคาวปลา สำหรับรสชาติผู้ทดสอบได้อธิบายรสชาติของน้ำปลาที่มีการเติมเอนไซม์ชนิดต่างๆ ว่ามีรสเค็มจัดและมีรสหวานเล็กน้อย ส่วนน้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติจะมีรสเค็มและเผื่อน สำหรับสีของน้ำปลาผู้ทดสอบชิมจะให้การยอมรับค่อนข้างต่ำ โดยให้เหตุผลว่าสีของน้ำปลาดังกล่าวมีความเข้มน้อยกว่าน้ำปลาที่วางขายทั่วไปในท้องตลาด จึงเป็นสาเหตุทำให้ผู้ทดสอบให้การยอมรับด้านสีต่ำ สำหรับน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดนั้น ผู้ทดสอบทั้ง 5 คนจะให้การยอมรับด้าน สี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวมมากที่สุด ซึ่งอาจเนื่องมาจากน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดจะใช้ระยะเวลาในการหมักนาน ทำให้องค์ประกอบต่างๆ ในน้ำปลาที่มีบทบาทต่อสี กลิ่น และรสชาติมีปริมาณสูงกว่าน้ำปลาที่มีการเติมเอนไซม์ชนิดต่างๆ ร่วมกับการหมัก จึงทำให้ผู้บริโภคให้การยอมรับน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดสูงกว่า

จากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์โปรติเอส โรโบนิวคลีเอส และไลเปสที่ชอบเกลือรวมกับการหมักน้ำปลา เพื่อลดระยะเวลาในการหมักและปรับปรุงกลิ่นและรสชาติของน้ำปลาจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์น้ำปลาที่มีคุณภาพซึ่งผู้บริโภคให้การยอมรับ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์โปรติเอส โรโบนิวคลีเอส และไลเปสที่ชอบเกลือไปใช้ร่วมกับการหมักน้ำปลาในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ตารางที่ 10 องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดกับน้ำปลาที่ได้จากการเติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือร่วมกับการหมัก

Fish sauce	Formal ^{1/}	Total ^{1/}	5'-GMP ^{1/}	Salt ^{1/}	pH ^{1/}	Color ^{1/}	Volatile fatty acid (mg/100ml)					
	nitrogen	nitrogen										
	(mg/ml)	(g/ml)	(mg/L)	(%)			Acetic ^{1/}	Propionic ^{1/}	Isobutyric ^{1/}	Butyric ^{1/}	Isovaleric ^{1/}	Valeric ^{1/}
							acid	acid	acid	acid	acid	acid
FS	8.52 ^c	12.60 ^c	40.09 ^b	24.40 ^a	5.86 ^a	1.40 ^c	75.60 ^c	26.20 ^c	5.34 ^c	75.60 ^c	20.43 ^c	3.71 ^c
HLFS	8.60 ^c	13.01 ^c	40.76 ^b	23.80 ^{ab}	5.45 ^b	1.35 ^c	91.45 ^b	39.81 ^b	13.75 ^b	91.45 ^b	30.82 ^b	11.56 ^b
HPHRHLFS	10.71 ^b	15.91 ^b	43.60 ^a	23.42 ^{ab}	5.40 ^b	1.75 ^b	91.60 ^b	40.03 ^b	13.90 ^b	91.60 ^b	31.05 ^b	11.76 ^b
C	14.54 ^a	17.50 ^a	44.04 ^a	23.06 ^b	5.30 ^c	2.20 ^a	96.46 ^a	50.16 ^a	17.26 ^a	96.46 ^a	42.57 ^a	14.25 ^a
C.V.(ร้อยละ)	2.05	1.98	1.91	2.11	0.81	1.15	0.52	0.38	3.96	1.56	2.11	5.34

หมายเหตุ ^{1/} = ตัวอักษรที่แตกต่างกันเหนือตัวเลขในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05)

FS คือ น้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติ

HLFS คือ น้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ 1.0 เปอร์เซ็นต์

HPHRHLFS คือ น้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์โปรติเอส ไรโบนิวคลีเอส และไลเปสที่ชอบเกลือ 1.5, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

C คือ น้ำปลาที่วางขายในท้องตลาด (commercial fish sauce)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการคัดเลือกแบคทีเรีย 20 ไอโซเลทที่แยกมาจากน้ำปลาดิบ เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารแข็ง Sehgal and Gibbons Complex (SGC) ที่มี Tween 80 2.0 เปอร์เซ็นต์ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-4.0 โมลาร์ (0-24.0 เปอร์เซ็นต์) และในอาหารเหลว SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ (18.0 เปอร์เซ็นต์) พบว่า แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด คือ แบคทีเรียไอโซเลท PB233 เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไปทำการจัดจำแนกโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมโดยเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rRNA กับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท PB233 คือ *Staphylococcus warneri* แบคทีเรียดังกล่าวสามารถเจริญได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีและไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ โดยแบคทีเรียจะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ ดังนั้นแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* PB233 จึงจัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียทนเกลือ (halotolerant bacteria)

แบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลว SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 3.0 โมลาร์ (18.0 เปอร์เซ็นต์) การผลิตเอนไซม์จะเกิดขึ้นไปพร้อมกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และมีการผลิตเอนไซม์สูงสุดเมื่อการเจริญอยู่ในระยะคงที่หรืออยู่ในระยะ stationary phase

ภายหลังการทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนโดยใช้เอทานอล เจลฟิเดรชัน (Sephadex G-100) และโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (DEAE Toyopearl 650M) นำเอนไซม์ที่แยกได้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE พบว่า เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45,000 ดาลตัน ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์บริสุทธิ์มีขนาดใกล้เคียงเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Staphylococcus* sp. ที่ได้มีการศึกษาไว้แล้ว

เอนไซม์ไลเปสที่ยังไม่บริสุทธิ์และที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 จะมีคุณสมบัติต่าง ๆ คล้ายกัน โดยสามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-9.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และ มีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เอนไซม์ไลเปสที่ยังไม่บริสุทธิ์และที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมีสมบัติเป็นเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ (halophilic lipase) โดยสามารถทำงานได้ดีที่สุดในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 2.5 โมลาร์ (15.0 เปอร์เซ็นต์)

การทดลองหมักน้ำปลาโดยเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือที่ผลิตจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ลงไปร่วมกับการหมัก พบว่าการเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือร่วมกับการหมักน้ำปลาจะทำให้ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ (volatile fatty acid) ซึ่งมีบทบาทต่อกลิ่นของน้ำปลาได้แก่ acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid เพิ่มขึ้น ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้ง 6 ชนิด ที่เกิดขึ้นในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์จะแตกต่างจากน้ำปลาที่ไม่มีการเติมเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เกิดไขมันที่ระเหยได้ทั้ง 6 ชนิด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือจากเชื้อแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 สำหรับเติมลงไปร่วมกับการหมักน้ำปลาเพื่อเพิ่มปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ในน้ำปลา คือการใช้เอนไซม์ 1.0 เปอร์เซ็นต์

การทดลองหมักน้ำปลาโดยเติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือ 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์โปรติเอส (1.5 เปอร์เซ็นต์) ที่ผลิตจากแบคทีเรียชอบเกลือ *Halobacterium salinarum* PB407 เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (0.5 เปอร์เซ็นต์) ที่ผลิตจากแบคทีเรียทนเกลือ *Pseudomonas* sp. No. 3241 และเอนไซม์ไลเปส (1.0 เปอร์เซ็นต์) ที่ผลิตจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ลงไปร่วมกับการหมัก พบว่า องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพต่าง ๆ ของน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือทั้ง 3 ชนิดและน้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยปริมาณฟอสฟอรัสในไตรเจน (formal nitrogen) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์กัวโนซีน 5'-โมโนฟอสเฟต (guanosine 5'-monophosphate, 5'-GMP) และปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ ได้แก่ acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid ของน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ที่

ชอบเกลือทั้ง 3 ชนิดจะมีปริมาณสูงกว่าน้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติ แสดงว่าเอนไซม์ที่ชอบเกลือทั้ง 3 ชนิด (เอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส และเอนไซม์ไลเปส) น่าที่จะมีบทบาทในกระบวนการย่อยสลายสารประกอบต่าง ๆ ในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา

จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า สามารถใช้เอนไซม์ที่ชอบเกลือ 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียชอบเกลือ *Halobacterium salinarum* PB407 เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียทนเกลือ *Pseudomonas* sp. No. 3241 และเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ร่วมกับการหมักน้ำปลาได้ โดยเอนไซม์โปรติเอสจะช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลาซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาในการหมักน้ำปลาลงได้ เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจะช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย RNA ในตัวปลาไปเป็นสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP ซึ่งจะทำให้น้ำปลามีกลิ่นและรสชาติดีขึ้น ส่วนเอนไซม์ไลเปสจะช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันในตัวปลาไปเป็นกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีบทบาทต่อกลิ่นของน้ำปลา

ข้อเสนอแนะ

1. เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้มากมาย ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์เพิ่มเติมเพื่อให้เหมาะต่อการนำไปใช้ประโยชน์ เช่น ความจำเพาะต่อสับสเตรท ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ เช่น interesterification หรือ tranesterification เป็นต้น
2. ควรมีการศึกษาการยอมรับทางประสาทสัมผัสของน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือชนิดต่าง ๆ เพื่อนำข้อมูลไปใช้สำหรับการปรับปรุงคุณภาพของน้ำปลาต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กฤษดา สมิตะสิริ. 2529. **แบคทีเรียชอบเกลือในการหมักน้ำปลา**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย. 2532. **การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสและศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชนานันท์ มิตรานนท์ และ ช่อฟ้า ทองไทย. 2527. Experimental fish sauce fermentation using enzyme and halophilic bacteria culture, น. 15. ใน การประชุมวิชาการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 3-4 พฤษภาคม 2527. มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.
- ณกัญภัทร จินดา. 2547. เอนไซม์ไลเปส I: แหล่งและประโยชน์ระดับอุตสาหกรรม. **วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย** 24 (3): 20-34.
- นงนุช รักสกุลไทย. 2538. **กรรมวิธีแปรรูปสัตว์น้ำ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นวลพรรณ ณ ระนอง. 2540. **ปฏิบัติการเอนไซม์วิทยา**. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.
- เบญจพร บัวบาน. 2542. **การผลิตและสมบัติของเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งดิบจากเชื้อยีสต์ *Saccharomycopsis* sp.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- บุญศรี จงเสรีจิตต์. 2533. **การผลิตโคจิเพื่อใช้ในการหมักน้ำปลา**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 203. 2543. **มาตรฐานน้ำปลาเพื่อการบริโภค**.

ประเสริฐ สายสิทธิ์. 2511. กลิ่นและรสของน้ำปลา. วารสารประมง 21 (3): 467-474.

ปราโมทย์ สุวรรณศาสตร์. 2507. เปรียบเทียบผลการใช้เอนไซม์เทียมและเอนไซม์จากยางมะละกอ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มัทนา แสงจินดาวงษ์ และ สมศักดิ์ วินิจนันท์. 2527. การศึกษาชนิดและปริมาณแบคทีเรียในระยะต้นของการทำน้ำปลา. วารสารประมง 33 (1): 69-72.

เรืองลักษณ์ จามิกรณ์. 2539. ชีวเคมี 2. พิมพ์ครั้งที่ 7. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ.

วรรณฯ พรเศรษฐคุณ. 2534. การคัดเลือกสายพันธุ์และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดต้องการเกลือเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิเชียร กิจปรีชาวิช. 2539. สรีรวิทยาของจุลินทรีย์. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิไลลักษณ์ กลมกลาง. 2538. การศึกษาการหมักน้ำปลาโดยใช้เชื้อแบคทีเรียชอบเกลือร่วมกับโคจิ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สายพิณ ไชยนันท์ และ สิทธิพันธุ์ ไชยนันท์. 2526. การศึกษาแบคทีเรียที่มีบทบาททำให้เกิดกลิ่นในน้ำปลาไทย. วารสารครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ธนบุรี 2 (2): 1-13.

สายสมร ลิปะตะสิริ. 2518. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำปลาไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2526. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำปลาพื้นเมือง. มอก. 3-2526.

อนันต์ บุญปาน. 2545. การศึกษาการผลิตและสมบัติของเอนไซม์ไลโซนิวคลีเอสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียทนเกลือ *Pseudomonas* sp. เพื่อใช้ในการหมักน้ำปลา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Alm, F. 1965. Scandinavian anchovies and herring tidbits, pp. 195-217. *In* G. Bergstrom, ed. **Fish as Food. Vol. III.** Academic Press, New York.

Amano, K. 1962. The influence of fermentation on the nutritive value of fish with special reference to fermented fish products of Southeast Asia, pp. 180-200. *In* E. Heen and R. Kreuzer, eds. **Inter. Sym. of Fish and Nutrition.** Fishing News (Books) Ltd., London.

Arahal, D.R., F.E. Dewhirst, J.J. Paster, B.E. Volcani and A. Ventosa. 1996. Phylogenetic analyses of some extremely halophilic archaea isolated from dead sea water, determined on the basis of their 16S rRNA sequences. **Appl. Environ. Microbiol.** 62 (10): 3779-3786.

Arnold, R.G., R.M. Shahani and B.K. Dwivedi. 1975. Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy products. **J. Dairy Sci.** 58 (8): 1127-1143.

Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). 1965. **Official Method of Analysis.** 8th ed. Arlington, Verginia.

_____. 1975. **Official Method of Analysis.** 12th ed. Georage Banto Co. Inc., Washington, D.C.

Baron, E.J. and S.M. Finegold. 1990. **Biley & Scott's Diagnostic Microbiology.** 8th ed. The C.V. Mosby Company, St. Louis.

- Beddows, C.G. and A.G. Ardeshir. 1979a. The production of soluble fish protein solution for use in fish sauce manufacture, I. The use of added enzymes. **J. Food Technol.** 14 : 603-612.
- Beddows, C.G. and A.G. Ardeshir. 1979b. The production of soluble fish protein solution for use in fish sauce manufacture, II. The use of acids at ambient temperature. **J. Food Technol.** 14 : 613-623.
- Beddows, C.G., M. Ismail and K.H. Steinkraus. 1976. The use of bromelain in the hydrolysis of mackerel and the investigation of fermented fish aroma. **J. Food Technol.** 11: 379-388.
- Black, J.C. 1993. **Microbiology : Principle and Application.** 2nd ed. Prentice Hall, New Jersey.
- Bovornreungroj, P. 2005. **Selection of extremely halophilic bacteria producing halophilic proteolytic enzyme for fish sauce production.** Ph.D. Thesis, Kasetsart University.
- Cowan, S. T. 1974. **Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria.** Cambridge University Press, Cambridge.
- Crisan, E.V. and A. Sands. 1975. Microflora of four fermented fish sauce. **Appl. Microbiol.** 29: 106-108.
- Delost, M. D. 1997. **Introduction to Diagnostic Microbiology: A Text and Workbook.** Mosby, Missouri. .
- Dougan, J. and G.E. Howard. 1975. Some flavouring constituents of fermented fish sauces. **J. Sci. Food Agric.** 26: 887-894.

- Frazier, W.C. 1958. **Food Microbiology**. 2nd ed. McGraw-Hill Publishing Company Ltd., New Delhi.
- Garabito, M.J., M.C. Maquez and A. Ventosa. 1998. Halotolerant *Bacillus* diversity in hypersaline environments. **Can. J. Microbiol.** 44: 95-102.
- Hayashi, M., J. Okumura and E. Ichishima. 1996. Enzymatic production of 5'-deoxyribonucleotides from salmon milt. **Food Research Inter.** 29 (8): 751-755.
- Horani, H. 1996. Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipase. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 12: 399-401.
- Ikeda, T. 2000. **Characterization of extracellular halophilic ribonuclease from halotolerant *Pseudomonas* sp..** M.S. Thesis, Kasetsart University.
- Ingram, M. and A.G. Kitchell. 1967. Salt as preservative for foods. **J. Food Technol.** 2: 1-15.
- Jaeger, K.E. and T.M. Reetz. 1998. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnol.** 16: 396-403.
- Jaeger, K.E., S. Ransac, B.W. Dijkstra, C. Colson, M. van Heuvel and O. Misset. 1994. Bacterial lipases. **FEMS Microbiol. Rev.** 15: 29-63.
- Jame, C.S. 1995. Determination of nitrogen and protein by the Kjeldahl method using the Kjeltex instrument, pp. 88-89. In C.S. Jame, ed. **Analytical Chemistry of Food**. The Alden Press, Oxford.
- Jensen, R.G. 1983. Detection and determination of lipase (acyl glycerol hydrolase) activity from various sources. **Lipids.** 18 (9): 650-657.

- Jones, N.R. 1962. Browning reaction in dried fish products. **Res. Adv. Food Sci.** 2: 74-80.
- Kamekura, M. and H. Onishi. 1974. Halophilic nuclease from a moderately halophilic *Micrococcus varians*. **J. Bacteriol.** 119 (2): 339-344.
- Kamekura, M. and H. Onishi . 1978. Properties of the halophilic nuclease of a moderately halophile, *Micrococcus varians* subsp. *halophilus*. **J. Bacteriol.** 133 (1): 59-65.
- Kamekura, M., T. Hamakawa and H. Onishi. 1982. Application of halophilic nuclease H of *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* to commercial production of flavoring agent 5'-GMP. **Appl. Environ. Microbiol.** 44: 994-995.
- Kanlayakrit, W. and P. Bavornreungroj. 2002. Isolation of extremely halophilic bacteria producing salt-loving protease for fish sauce fermentation. pp. 366-373. **In Proceeding of 40th Kasetsart University Annual Conference.** 4-7 February, 2002. Bangkok.
- Kanlayakrit, W., T. Ikeda, S. Tojai, P. Bavornreungroj and A. Boonpan. 2001. Production and characterization of extracellular halophilic ribonuclease from halotolerant *Pseudomonas* sp. **Bulletin of National Pintung University of Science and Technology.** 10 (4): 281-289.
- Kotting, J., D. Jurgens and H. Huser. 1983. Separation and characterization of two isolated lipases from *Staphylococcus aureus* (TEN5). **J. Chromatogr.** 281: 253-261.
- Krieg, N. R. and J.G. Holt. 1984. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1.** Williams & Wilkins, Baltimore.
- Kuninaka, A. 1996. Nucleotides and related compounds, pp. 563-606. **In** H.J. Rehm and G. Reed, eds. **Biotechnology, Vol. VI, Product of Primary Metabolism.** VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

- Kuninaka, A., M. Kibi, H. Yoshino and K. Sahaguchi. 1961. Studies on 5'-phosphodiesterases in microorganisms. Part 2. Properties and application of *Penicillium citrinum* 5'-phosphodiesterase. **Agric. Biol. Chem.** 25: 693-701.
- Kushner, D.J. . 1978. Life in high salt and solute concentrations : Halophilic bacteria, pp. 317-368. In D.J. Kushner, ed. **Microbial Life in Extreme Environments**. Academic Press, London.
- Kushner, D.J. and M. Kamekura. 1988. Physiology of halophilic eubacteria, pp. 109-138. In F.R. Valera, ed. **Halophilic Bacteria, Vol. 1**. CRC Press Inc., Florida.
- Lafont, R. 1950. The "Nuoc-mam" industry in Cambodia. *cited by* Van Veen. 1965. Fermented and dried sea food products in Southeast Asia, pp. 227-250. In G. Borgstrom, ed. **Fish as Food. Vol III**. Academic Press, New York.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature (London)**. 227: 680-685.
- Lee, D., Y. Kok, K. Kim, B. Kim, H. Choi, D. Kim, M.T. Suhartono and Y. Pyun. 1999. Isolation and characterization of a thermophilic lipase form *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **FEMS Microbiol. Lett.** 179: 393-400.
- Lerke, P., L. Farber and R. Adams. 1967. Bacteriology of spoilage of fish muscle IV. Role of protein. **Appl. Microbiol.** 15 (4): 770-776.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and N.J. Randall. 1951. Protein measurment with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- Macrae, A.R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. **J. Amer. Oil Chem. Soc.** 60 (2): 243A-246A.

- McIver, R.C., R.J. Brodes and G.A. Reineccus. 1982. Flavor of fermented fish sauce. **J. Agr. Food Chem.** 30: 1017-1020.
- Mosbah, H., A. Sayari, H. Mejdoub, H. Dhouib and Y. Gargouri. 2005. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase. **Biochim. Biophys. Acta.** 1723: 282-291.
- Murayama, S., D.L. Calvez and P. Nitayachin. 1962. Study on the production of fish sauce I-effect of commercial proteolytic enzymes on the production of fish sauce. **Bull. Tokai. Reg. Fish Lab.** 32: 155-162.
- Nakano, T., H. Watanabe, H. Hata, D.V. Qua and T. Miura. 1986. An application of protease produced by a moderately halophilic marine bacterium to fish sauce processing. **Bull. Jap. Soc. Fish.** 52 (9): 1581-1587.
- Oh, B.C., H.K. Kim, J.K. Lee, S.C. Kang and T.K. Oh. 1999. *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. **FEMS Microbiol. Lett.** 179: 385-392.
- Ok, T., T. Matsukura, Z. Ooshiro, S. Hayashi and T. Itakura. 1982a. Protease formation by two moderately halophilic *Bacillus* strains from fish sauce. **J. Jap. Soc. Food Sci. Technol.** 29 (10): 618-622.
- Ok, T., T. Matsukura, Z. Ooshiro, S. Hayashi and T. Itakura. 1982b. Study on the use of halophilic bacteria in production of fish sauce. **J. Jap. Soc. Food Sci. Technol.** 29 (10): 623-627.
- Onishi, H., T. Mori, S. Takeushi, K. Tani, T. Kobayashi and K. Kamekura. 1983. Halophilic nuclease of a moderately halophilic *Bacillus* sp. : Production, Purification and Characterization. **Appl. Environ. Microbiol.** 45 (1): 24-30.

- Ooshiro, Z., T. Ok, H. Une, S. Hayashi and T. Itakura. 1981. Study on use of commercial proteolytic enzymes in production of fish sauce. **Mem. Fac. Fish. Kagoshima University.** 30: 383-394.
- Poosaran, N. 1986a. fish sauce I: Acid hydrolysis at ambient temperature. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 8 (1): 43-46.
- Poosaran, N. 1986b. fish sauce II: Enzyme hydrolysis. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 8 (2): 205-207.
- Raksakulthai, N. 1986. **Effect of enzyme supplements on the production of fish sauce from male capelin (*Mallotus villosus*).** Ph.D. Thesis, University of Newfoundland.
- Reynolds, T.M. 1965. Chemistry of non-enzymic browning II. **Adv. Food Res.** 13: 167-283.
- Saisithi, P. 1967. **Studies on the origins and aroma of Thai fish sauce.** Ph.D. Thesis, University of Washington.
- Saisithi, P., B. Kasemsarn, J. Liston and A.M. Doller. 1966. Microbiology and chemistry of fermented fish. **J. Food Sci.** 31: 105-110.
- Sanceda, N., E. Suzuki and T. Kurata. 2003. Branched chain amino acids as source of specific branched chain volatile fatty acids during the fermentation process of fish sauce. **Amino Acids.** 24: 81-87.
- Sanceda, N., T. Kurata and N. Arakawa. 1996. Accelerated fermentation process for the manufacture of fish sauce using histidine. **J. Food Sci.** 61: 220-222, 225.
- Sehgal, S.N. and N.E. Gibbons. 1960. Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*. **Can. J. Microbiol.** 6: 165-169.

- Seitz, E.W. 1974. Industrial application of microbial lipase: a review. **J. Amer. Oil Chem. Soc.** 51 (2): 12-16.
- Saxena, R.K., A. Sheoran, B. Giri and W.S. Davidson. 2003. Purification strategies for microbial lipases. **J. of Microbiol. methods.** 52: 1-18.
- Shahani, E.W. 1975. Lipase and esterase, pp. 181-217. *In* G. Reed, ed. **Enzymes in Food Processing**. 2nd ed. Academic Press, New York.
- Sharma, R., Y. Chisti and U.C. Banerjee. 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnol. Adv.** 19: 627-662.
- Shewan, J.M. 1961. The microbiology of sea water fish, pp. 487-560. *In* G. Bergstrom, ed. **Fish as Food. Vol. I.** Academic Press, New York.
- Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt. 1986. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2.** Williams & Wilkins, Baltimore.
- Speelmans, G., B. Poolman and W.N. Konings. 1995. Na⁺ as coupling ion in energy transduction in extremophilic bacteria and archaea. **World J. of Microbiol. and Biotechnol.** 11: 58-70.
- Spinelli, J. 1971. Biochemical basis of fish freshness. **Process Biochem.** May: 36.
- Stanby, M.E. 1962. Prominate composition of fish. **Fish in Nutrition.** Fishing News (Books) Ltd., London.
- Suntinanalert, P. 1979. **Role of microorganisms in the fermentation of Nam Pla in Thailand : Relationship of the bacteria isolated from Nam Pla produced from different geographical localities in Thailand.** M.S. Thesis, Mahidol University.

- Talon, R., N. Dublet, M.C. Montel and M. Cantonnet. 1995. Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase. **Curr. Microbiol.** 30: 11-16.
- Thongthai, C. and M. Siriwongpairat. 1978. Changes in the viable bacterial population, pH and chloride concentration during the first month of Nam Pla (fish sauce) fermentation. **J. Sci. Soc. Thailand.** 4: 73-78.
- Tortora, J.G., B.R. Funke and C.L. Case. 2004. **Microbiology, An Introduction.** 8th ed. Benjamin/Cummings, San Francisco.
- Valera, F.R. 1988. Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments, pp. 3-30. In F.R. Valera, ed. **Halophilic Bacteria, Vol. 1.** CRC Press, Inc., Florida.
- Ventosa, A. 1991. Taxonomy of new species of moderately halophilic eubacteria, pp. 45-51. In F. Rodriguez-Valera, ed. **General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms.** Plenum Press, New York.
- Ventosa, A. and J.J. Nieto. 1995. Biotechnological application and potentialities of halophilic microorganisms. **World J. of Microbiol. and Biotechnol.** 11: 85-94.
- Visco, S. and A. Fratoni. 1960. Microbiological process and the preparation of fish sauce, pp. 505-525. Cited by P. Saisithi, B. Kasemsarn, J. Liston and A.M. Doller. Microbiology and chemistry of fermented fish. **J. Food Sci.** 31: 105-110.
- Voskresensky, N.A. 1965. Salting of herring, pp. 107-131. In G. Bergstrom, ed. **Fish as Food. Vol. III.** Academic Press, New York.
- Washington, J.A. 1985. **Laboratory Procedures in Clinical Microbiology.** Springer-Verlag, New York.

Weete, J.D. 1998. Microbial lipases, pp. 641-664. *In* C.C. Akoh and D.B. Min, eds.

Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology. Marcel Dekker, Inc.,
New York.

Wong, D.W.S. 1995. **Food Enzyme: Structure and Mechanism.** Chapman & Hall, New York.

Yamada, K., Y. Ota and H. Machida. 1962. A modified method for lipase activity assay with emulsified olive oil as substrate. **Nippon Nogeikagaku Kaishi.** 36: 860.

Yamane, T. 1987. Enzyme technology for the lipids industry: an engineering overview.
J. Amer. Oil Chem. Soc. 64 (2): 1657-1661.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Sehgal and Gibbons Complex (SGC) medium

Casamino acids	7.5	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม
KCl	2.0	กรัม
Sodium citrate	3.0	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20.0	กรัม
FeCl ₂ ·nH ₂ O	0.01	กรัม
Agar	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Christensen's urea medium

Basal medium ประกอบด้วย		
Bacto Peptone	1.0	กรัม
Bacto Dextrose (glucose)	1.0	กรัม
KH ₂ PO ₄	2.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
Bacto-phenol red 0.04%	20.0	มิลลิลิตร

อุ่นส่วนผสมทั้งหมดให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.8-7.0 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 121 องศาเซลเซียส 15 นาที หลังจากนั้นอุ่นไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 ถึง 52 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลายยูเรียเข้มข้น 20% ที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วย Millipore filter paper ลงไป 100 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นใช้ไปเปิดที่ปราศจากเชื้อดูดใส่หลอดทดสอบที่ปราศจากเชื้อ 3-5 มิลลิลิตรจากนั้นเอียงหลอดเพื่อทำอาหารเอียง

3. Nitrate broth medium

Bacto-tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Potassium nitrate	1.0	กรัม
pH	7.0	

4. Oxidative-fermentative medium (O-F medium)

Yeast extract	10.	กรัม
Bacto-tryptone	2.5	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.3	กรัม
Agar	3.0	กรัม
Bromcresol purple	0.04	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับพีเอช 7.0 เติม bromthymol blue เพื่อเป็นดัชนี เติมกลูโคส 10.0 กรัม ละลายให้เข้ากัน บรรจุใส่หลอดทดสอบ 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 10 นาที จากนั้นรีบนำออกมาแช่น้ำเย็นทันที

5. Gelatin medium

Bacto-tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Gelatin	120.0	กรัม
pH	7.0	

6. Thioglycollate agar (Reagenzien merck)

Peptone from casein	15.0	กรัม
L(+)-Cystine	0.5	กรัม
D(+)-Glucose	5.5	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
NaCl	2.5	กรัม
Sodium thioglycollate	0.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม

7. Phenol red broth base (Difco)

Bacto-beef extract	1.0	กรัม
Proteose peptone No.3,Difco	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Bacto-phenol red	0.018	กรัม

อุณหภูมิส่วนผสมทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับพีเอช 7.4 เติม phenol red เพื่อเป็นดัชนี
 เติมคาร์โบไฮเดรตที่ต้องการทดสอบลงไป 10 กรัม ละลายให้เท่ากัน บรรจุอาหารลงในหลอด
 ทดสอบหลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 10 นาที
 เมื่อครบเวลารับนำออกมาแช่เย็นทันทีเพื่อป้องกันน้ำตาลแตกตัว สำหรับหลอดทดสอบควรรอบด้วย
 ความร้อน 180 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้

ภาคผนวก ข
สารเคมีและวิธีที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ

1. สีที่ใช้ย้อมแกรมและวิธีย้อมแกรม

1.1 สีย้อมแกรม

1.1.1 Ammonium oxalate crystal violet

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethanol 95%	20.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งสองให้เข้ากัน แล้วเติม ammonium oxalate aqueous solution เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 80 มิลลิลิตร

1.1.2 Gram's iodine

Crystal's iodine	1.0	กรัม
Potassium iodine	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล เพื่อป้องกันแสง ถ้าเก็บไว้นานจนสารละลายเป็นสีเหลืองไม่ควรนำไปทดสอบ

1.1.3 Ethanol 95%

1.1.4 Safranin water solution

สารละลาย safranin	10	มิลลิลิตร
(2.5% ของ safranin ละลายใน ethanol 95%)		
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย safranin กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองก่อนนำมาใช้

1.2 วิธีย้อมสีแกรม

ทำการ smear เชื้อแบคทีเรียที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ลงบนสไลด์ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสไลด์มาลงไฟให้เปลวไฟผ่านได้สไลด์ตรงรอย smear อย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง หยดสี crystal violet ให้ท่วมบริเวณ smear เป็นเวลา 1 นาที เทสีล้างด้วยน้ำเล็กน้อย หยด gram's iodine ให้ท่วม smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทไอโอดีนทิ้ง ล้างด้วยน้ำแล้วจึงหยดด้วย 95% ethanol ประมาณ 15-20 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำทันที ซับด้วยกระดาษซับ แล้วจึงหยดสี safranin water solution ลงบริเวณ smear นาน 1 นาที เทสีทิ้ง ซับด้วยกระดาษซับให้แห้ง แล้วจึงนำไปตรวจดูลักษณะรูปร่าง การติดสี แกรม และการเรียงตัวของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. Tetramethyl-p-phenyl diamine dihydrochloride solution

Tetramethyl-p-phenyl diamine

dihydrochloride	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 15 นาที ก่อนใช้ เก็บรักษาไว้ในขวดหุ้ม foil ปราศจากแสง เก็บไว้ในตู้เย็น หรือเตรียมใหม่ ๆ ก่อนใช้ทุกครั้ง

3. 3% Hydrogen peroxide solution

Hydrogen peroxide	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน บรรจุในขวดแก้วสีน้ำตาล แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

4. Nitrate test solution

Solution A:

Sulfanilic acid	0.8	กรัม
5N Acetic acid	100	มิลลิลิตร

Solution B:

Alpha naphthylamine	0.5	กรัม
5N Acetic acid	100	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค
การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

1. สารละลาย Citrate buffer

เตรียมได้โดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A: 0.2 M citric acid (ละลาย $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 42.02 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M sodium citrate (ละลาย trisodium citrate, $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ 58.82 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

2. สารละลาย Phosphate buffer

เตรียมได้โดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A: 0.2 M monobasic sodium phosphate (ละลาย $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 31.2 กรัมในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M dibasic sodium phosphate (ละลาย $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 53.63 กรัมหรือ $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 71.7 กรัมในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

3. สารละลาย Tris-HCl buffer

เตรียมได้โดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A: 0.2 M hydrochloric acid (ผสม HCl ปริมาตร 17.25 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M Tris-(hydroxymethyl)aminomethane (ละลาย $C_4H_{11}NO_3$ 24.2 กรัมในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

4. สารละลาย Glycine-NaOH buffer

เตรียมได้โดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A: 0.2 M glycine (ละลาย $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 15 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M sodium hydroxide (ละลาย NaOH 8 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

ภาคผนวก ง

วิธีวิเคราะห์ทางเคมีและวิธีการทดลอง

1. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจะทำได้โดยการวัดปริมาณกรดไขมันที่เพิ่มขึ้นตามวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Yamada *et al.* (1962) และ Horani (1996)

1.1 สารเคมี

1.1.1 การเตรียมสับสเตรท สับสเตรทประกอบไปด้วย

2% polyvinyl alcohol (PVA)	45	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	45	มิลลิลิตร
น้ำมันมะกอก	10	มิลลิลิตร

เตรียม 2% PVA ได้โดยชั่ง PVA 20 กรัม ในน้ำอุ่น 75–85 องศาเซลเซียส 1 ลิตร ผสมกันด้วยแท่งกวนแม่เหล็กที่ความเร็วรอบสูง พร้อม ๆ กับการอุ่นสารละลายให้ร้อนตลอดเวลาจนกว่า PVA จะละลายหมด

สำหรับสับสเตรทนั้น เตรียมโดยการแช่สารละลายทั้งหมดที่ 0 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำมาผสมกัน จากนั้นนำมาผสมกันด้วยเครื่องผสม (blender) เป็นเวลา 10 นาที สับสเตรทที่เตรียมได้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นต้องเตรียมใหม่

1.1.2 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.05 นอร์มัล

เตรียม stock solution ของ NaOH ความเข้มข้น 5.0 นอร์มัล ก่อน ทำโดยชั่ง NaOH มา 120 กรัม จากนั้น เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บในขวดพลาสติกที่ทนด่าง เมื่อจะนำมาใช้จะทำการเจือจาง stock solution โดยนำ stock solution 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดปริมาตร และนำ NaOH ความเข้มข้น 0.05 นอร์มัล ที่ได้มาหาความเข้มข้นมาตรฐานก่อน

การหาความเข้มข้นมาตรฐานของ NaOH ทำได้โดยชั่ง acid potassium phthalate (potassium hydrogen phthalate, $\text{COOHC}_6\text{H}_4\text{COOK}$, analytical reagent) ๐.๒ กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรเติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ (เตรียมโดยต้มน้ำกลั่นให้เดือด 20 นาที) ปริมาณ 90–100 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.05 นอร์มัล ความเข้มข้นมาตรฐานของ NaOH คำนวณได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นมาตรฐาน (N)} = \frac{\text{กรัมของ } \text{COOHC}_6\text{H}_4\text{COOK} \times 1,000}{\text{มิลลิลิตรของ NaOH} \times 204.22}$$

1.2 วิธีการทดสอบ

นำสารละลายสับสเตรทปริมาตร 5 มิลลิลิตร บัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสม ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์ไลเปส ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกันในฟลasks รูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเริ่มเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้ยับยั้งปฏิกิริยาโดยใช้สารละลายผสมระหว่างอะซิโตนและแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมฟีนอล์ฟทาลีนปริมาณ 4-5 หยด แล้วจึงนำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน NaOH ความเข้มข้น 0.05 นอร์มัล จนสารละลายเป็นสีชมพูอ่อนจึงหยุดการไตเตรท หั่งสารละลายไว้หากภายใน 30 วินาที สีชมพูไม่เปลี่ยนถือว่าเป็นจุดยุติ การทำแบลнк (blank) ทำเหมือนกับการทดสอบเอนไซม์ แต่ต่างกันที่เติมสารยับยั้งปฏิกิริยาก่อนการเติมเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันมะกอกให้ได้กรดไขมันที่อยู่ในรูปกรดโอเลอิก 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 ชั่วโมง

1.3 การคำนวณปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นหน่วยของเอนไซม์

1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายน้ำมันมะกอกให้ได้กรดไขมันที่อยู่ในกรดโอเลอิก 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 ชั่วโมง

$$\text{หน่วยเอนไซม์ไลเปสต่อมิลลิลิตร} = (M - Mo) / \text{slope}$$

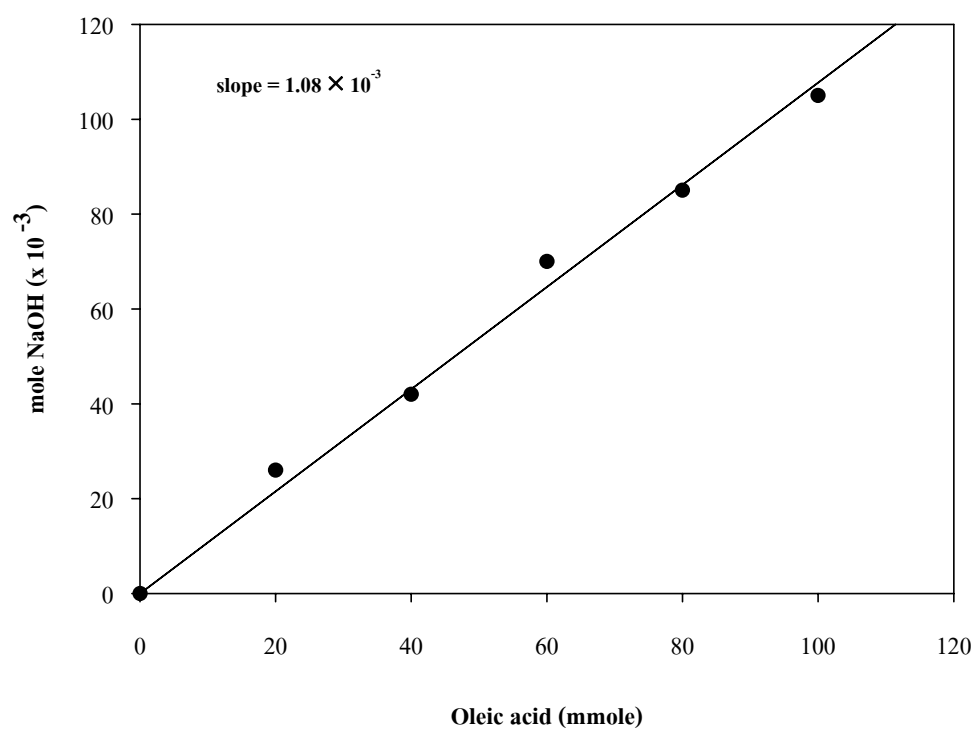
โดยที่ M = mole ของ NaOH ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งคำนวณได้จากปริมาณ
NaOH x molar NaOH

Mo = mole ของ NaOH ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับ blank ซึ่งคำนวณได้จาก
ปริมาณ NaOH x molar NaOH

Slope = ความชันของกราฟมาตรฐานกรดโอเลอิก

1.4 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดโอเลอิก (oleic acid)

ซึ่งกรดโอเลอิกที่มีความบริสุทธิ์สูง (extra pure) มา 1 ไมโครโมล (0.28247 กรัม) ละลายด้วยสารละลายผสมระหว่าง 95% ethanol กับ diethyl ether อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ที่ปรับสภาพให้เป็นกลางแล้ว ปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 มิลลิลิตรด้วยขวดปรับปริมาตร ดังนั้นสารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้น 20 ไมโครโมล/มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาปริมาณ 1, 2, 3 และ 4 มิลลิลิตร (20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครโมล) ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรจากนั้นเติมสารละลายชนิดเดิม 50 มิลลิลิตร เติมฟีนอล์ฟทาลีน 1 หยด ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05 นอร์มัล จนสารละลายเป็นสีชมพูอ่อนจึงหยุดการไตเตรท ทั้งสารละลายไว้หากภายใน 30 วินาที สีชมพูไม่เปลี่ยนถือว่าเป็นจุดยุติ



ภาพผนวกที่ ๑1 กราฟมาตรฐานกรดโอเลอิก

2. การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

ดัดแปลงมาจากวิธีการของ AOAC (1965) โดยมีวิธีการดังนี้

2.1 นำหลอดทดสอบบottle ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

2.2 นำตัวอย่างปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดสอบ เหยียงแยกส่วนใส่ออก

2.3 นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น

2.4 นำไปชั่งน้ำหนัก แล้วหักค่าน้ำหนักของหลอดทดสอบที่อบแห้งออก ผลที่ได้จะเป็นน้ำหนักแห้งของน้ำหนักเซลล์แห้ง

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Lowry *et al.* (1951)

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.1.1 สารละลาย ก : ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.5 กรัม และโซเดียมซีเตรท ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$) 1.0 กรัม ในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.1.2 สารละลาย ข : ละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 20 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 4.0 กรัม ในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร

3.1.3 สารละลาย ค : ผสมสารละลาย ข ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับ สารละลาย ก ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เตรียมแล้วใช้ทันที

3.1.4 สารละลาย ง : ผสมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับ น้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เตรียมแล้วใช้ทันที

3.1.5 สารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร

3.2 การเตรียม standard protein curve

3.2.1 นำสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย ค ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที

3.2.2 เติมสารละลาย ง ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ประมาณ 20-30 นาที

3.2.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ชุบน้ำจุ่มใช้น้ำกลั่นแทน

3.2.4 เขียนกราฟ standard protein curve ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร กับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin

3.3 การหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง

3.3.1 เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นโปรตีนไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร

3.3.2 ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับการเตรียม standard protein curve

3.3.3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ไปเทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟ standard protein curve

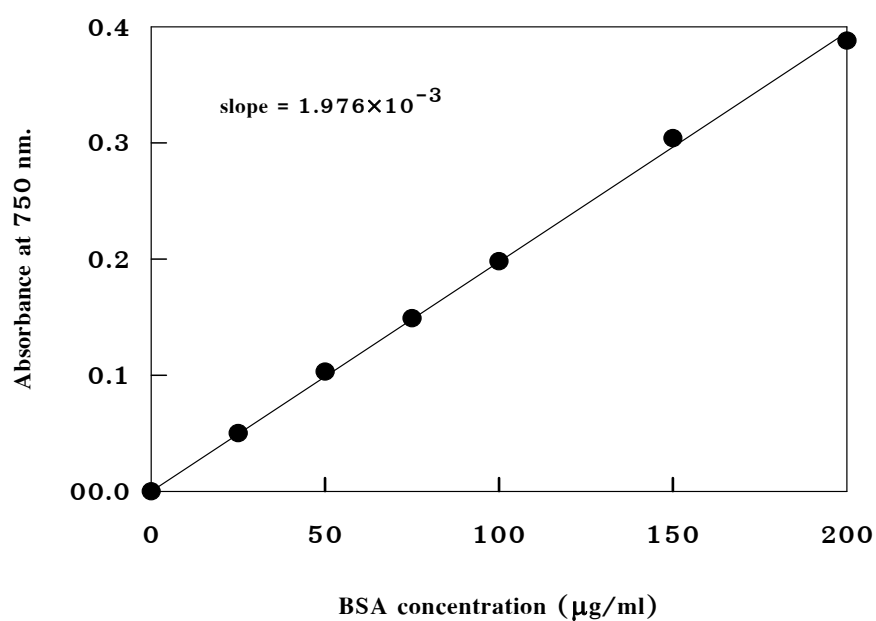
3.4 การคำนวณ

ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัม/ลิตร)

$$= \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน})}$$

ตารางผนวกที่ ง1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโปรตีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นโปรตีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	สารละลายมาตรฐานโปรตีน (ไมโครลิตร)
0	500	0
25	437.5	62.5
50	375	125
75	312.5	187.5
100	250	250
150	125	375
200	0	500



ภาพผนวกที่ ง2 กราฟมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

4. การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ (volatile fatty acid)

ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ (volatile fatty acid) ได้แก่ acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid วิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Sanceda *et al.* (2003)

4.1 อุปกรณ์

4.1.1 Gas Chromatography HP 6890 series II

4.1.2 column HP-5

4.1.3 Flame Ionization Detector : FID

4.1.4 recorder

4.2 สารเคมี

สารละลายมาตรฐาน acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid เจือจางให้มีความเข้มข้น 0-4,000 พีพีเอ็ม ด้วยน้ำกำจัดอออน

4.3 วิธีการ

4.3.1 สภาพะในการวิเคราะห์ของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

4.3.1.1 carrier gas: N₂ (3 มิลลิลิตร / นาที) H₂ (30 มิลลิลิตร / นาที) (air 300 มิลลิลิตร / นาที)

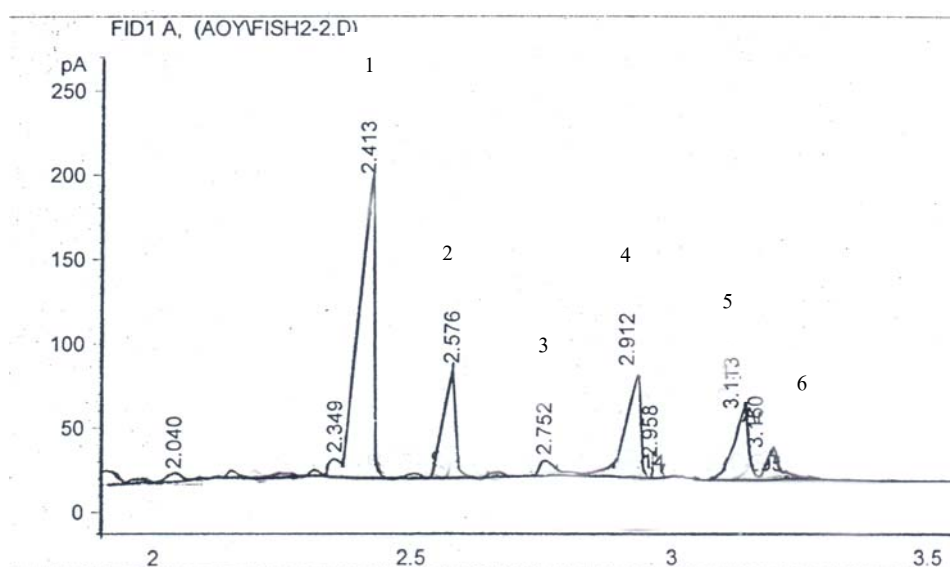
4.3.1.2 column temperature 60 องศาเซลเซียส 2 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 250 องศาเซลเซียส 20 องศาเซลเซียส / นาที

4.3.1.3 injection temperature 250 องศาเซลเซียส

4.3.1.4 detector temperature 250 องศาเซลเซียส

4.3.2 ทำการกรองตัวอย่างน้ำปลาและฉีดตัวอย่างเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ปริมาณ 2 ไมโครลิตร จะได้โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ

4.3.3 นำค่าพื้นที่ใต้โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้แต่ละชนิดไปเทียบกับ โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานของกรดไขมันที่ระเหยได้ แล้วคำนวณออกมาเป็นปริมาณ กรดไขมันที่ระเหยได้ที่อยู่ในตัวอย่างน้ำปลา



ภาพผนวกที่ 3 โครมาโทแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ในน้ำปลาที่เดิมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือร่วมกับการหมัก

หมายเหตุ 1 = acetic acid, 2 = propionic acid, 3 = isobutyric acid, 4 = butyric acid,
5 = isovaleric acid, 6 = valeric acid

5. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี HPLC

5.1 อุปกรณ์

5.1.1 เครื่องควบคุมระบบ (system controller) Shimadzu LC-3A

5.1.2 คอลัมน์ Lichrospher 100 NH₂ (E. Merck) ขนาด 25×0.4 เซนติเมตร

5.1.3 Shimadzu LC-3A High Performance Liquid Chromatography

5.1.4 LDC 4100 spectrophotometer monitor

5.1.5 Shimadzu GR 1A integrator

5.2 สารเคมี

5.2.1 สารละลายมาตรฐานกัวโนซีน 5'-โมโนฟอสเฟต (guanosine 5'-monophosphate, 5'-GMP) (G8377, Sigma) เตรียมให้มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ใน น้ำกลั่น กรองด้วยกระดาษกรอง (membrane filter) ขนาดรู 0.45 ไมครอน

5.2.2 วัฏภาคเคลื่อนที่ เตรียมโดยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Na₂HPO₄-NaH₂PO₄) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 5.0 และเมทานอล (methanol) อัตราส่วน 90 ต่อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) กรองด้วยกระดาษกรองขนาดรู 0.45 ไมครอน ทำการไล่อากาศออกจากด้วยเครื่อง อุลตราโซนิกเป็นเวลา 15 นาที

5.3 วิธีการ

5.3.1 ตั้งค่าตัวแปรต่าง ๆ ของเครื่องควบคุมระบบ(system controller) Shimadzu LC

3A

5.3.1.1 อัตราการไหล (flow rate) 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

5.3.1.2 อุณหภูมิ oven 30 องศาเซลเซียส

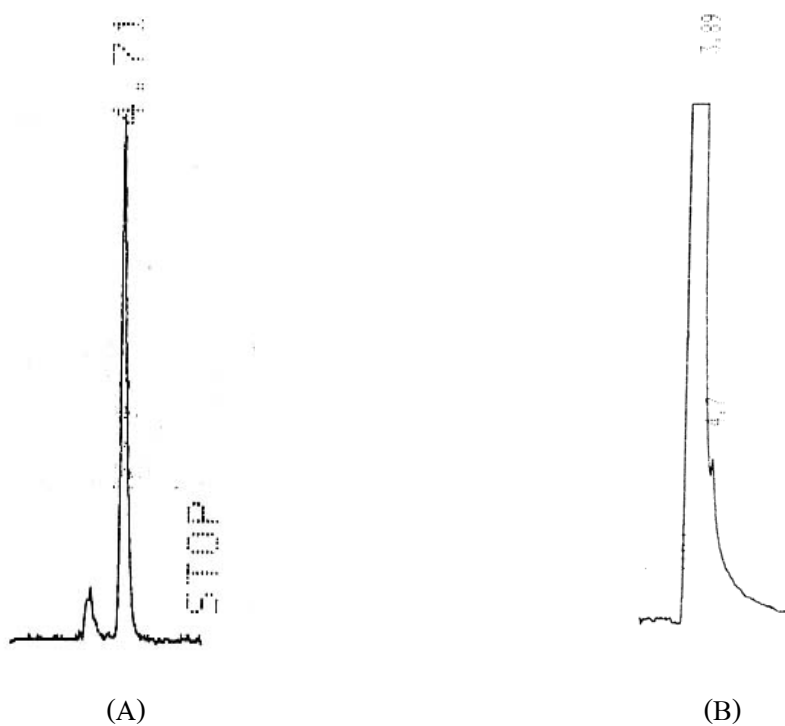
5.3.2 ตั้งค่าความยาวคลื่นของ LDC 4100 spectrophotometer monitor ให้เท่ากับ 254 นาโนเมตร

5.3.3 ฉีดสารละลายมาตรฐานปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ ด้วยแรงดันสูงจากปั๊ม เมื่อสารตัวอย่างเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์จะเกิดการดูดกลืนแสงของสารที่เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์และส่งสัญญาณไปที่เครื่องรวบรวมสัญญาณ (integrator) แสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม ซึ่งแสดงเวลาที่ตัวอย่างสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP ถูกหน่วงอยู่ในคอลัมน์ (retention time) และพื้นที่ใต้กราฟโครมาโทแกรมของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP โดยเวลาที่ถูกละหน่วงในคอลัมน์ของสารชนิดเดียวกันจะเท่ากัน ดังนั้นจึงใช้เวลาที่ถูกละหน่วงในคอลัมน์เป็นตัวบ่งบอกสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP ในตัวอย่างเปรียบเทียบกับเวลาของสารประกอบนิวคลีโอไทด์มาตรฐาน นำพื้นที่ใต้โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานที่ทำการฉีดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาเขียนกราฟมาตรฐานเพื่อใช้หาความเข้มข้นของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP ในตัวอย่าง

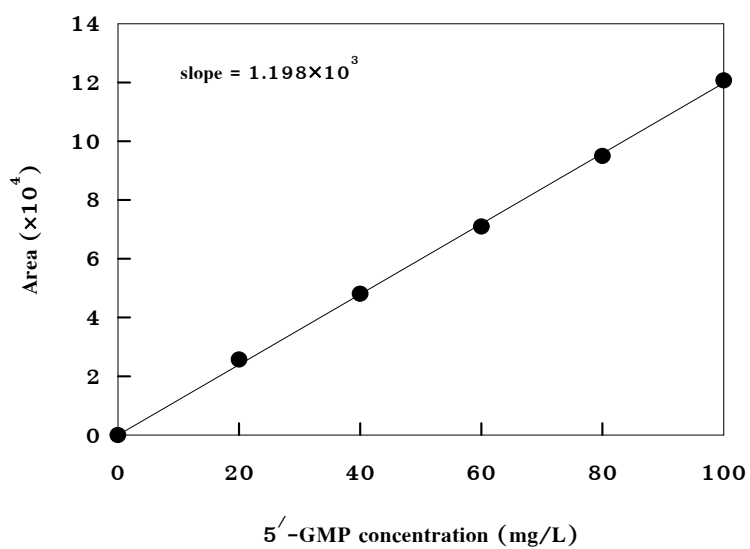
5.3.4 ฉีดสารตัวอย่างที่ได้เจือจางให้เหมาะสมที่ให้พื้นที่ใต้กราฟอยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน เปรียบเทียบระยะเวลาที่ถูกละหน่วง (retention time) เพื่อหาชนิดสารประกอบนิวคลีโอไทด์กับเวลาที่ถูกละหน่วงของสารประกอบนิวคลีโอไทด์มาตรฐาน และนำพื้นที่ใต้โครมาโทแกรมที่ได้มาทำการคำนวณความเข้มข้นของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP ในตัวอย่าง

5.4 การคำนวณ

$$\text{ความเข้มข้น 5'-GMP (มก./มล.)} = \frac{(\text{พื้นที่ใต้โครมาโทแกรม}) \times (\text{การเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน})}$$



ภาพผนวกที่ ๓4 โครมาโทแกรมของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP มาตรฐาน (A) และ น้ำปลาที่เติมเอนไซม์โปรติเอส โรโบนิวคลีเอส และไลเปสที่ชอบเกลือร่วมกับการหมัก (B) โดย Retention time 4.71 (A) และ 4.70 (B) คือ 5'-GMP



ภาพผนวกที่ ๓5 กราฟมาตรฐานสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP

6. การวิเคราะห์ปริมาณฟอรั่มอลไนโตรเจน (formal nitrogen)

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณฟอรั่มอลไนโตรเจน จะวิเคราะห์ตามวิธีการของ Beddows *et al.* (1976)

นำตัวอย่างน้ำปลา 1 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร และไทเตรทจนมีพีเอช 7 ด้วย 0.1 M NaOH ต่อมาเติมสารละลาย formalin 38 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงไป แล้วไทเตรทต่อจนพีเอชเป็น 8.5 ด้วย 0.1 M NaOH

$$\text{Mg. formal nitrogen} = \text{ml NaOH (pH 7-8.5)} \times \text{Molarity NaOH} \times 14$$

7. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen)

การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) จะใช้วิธีเจดดาห์ (Kjeldahl method) ตามวิธีของ James (1995)

7.1 สารเคมี

7.1.1 กรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4)

7.1.2 สารเร่งปฏิกิริยา ประกอบด้วย โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) และคอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ในอัตราส่วน 1:9

7.1.3 สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์

7.1.4 สารละลายบอริก (H_3BO_3) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์

7.1.5 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

7.1.6 อินดิเคเตอร์: เติร์ยมเมธิลเรด (methyl red) และโบรโมครีซอลกรีน (bromocresol green) ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในเอทานอล แล้วจึงนำมาผสมกันในอัตราส่วน (1:5)

7.1.7 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

7.2 การวิเคราะห์

7.2.1 ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม (หรือ 5-6 กรัม ในกรณีของอาหารที่มีความชื้นสูง เช่น นม) ใส่ลงในหลอดย่อย จดน้ำหนักที่แน่นอน

7.2.2 เติมสารเร่งปฏิกิริยา 5 กรัม

7.2.3 เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาณ 15 มิลลิลิตร

7.3.4 นำไปให้ความร้อนบนเตาย่อย อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส จนได้สารละลายใส (ประมาณ 1 ชั่วโมง) ในตู้ดูดควัน

7.3.5 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เจือจางด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

7.3.6 นำหลอดย่อยเข้าเครื่องกลั่น ปลายสายของเครื่องสายหนึ่งจุ่มลงในถังน้ำกลั่นอีกสายหนึ่งจุ่มลงในถังโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยา

7.3.7 วางขวดชมพูขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีสารละลายกรดบอริก 25 มิลลิลิตรและอินดิเคเตอร์ ไว้ตรงปลายสายส่วนควบแน่น (condenser) โดยให้ปลายท่อจุ่มลงในสารละลายเพื่อเก็บก๊าซแอมโมเนียม ใช้เวลากลั่น 4 นาที

7.3.8 นำขวดชมพูไปไตเตรทกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู บันทึกปริมาณที่ใช้

7.3 การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของกรดไฮโดรคลอริก

7.3.1 ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 0.1300 กรัม (W_1) ใส่ในขวดรูปชมพู่ จดน้ำหนักที่แน่นอน เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน

7.3.2 หยดอินดิเคเตอร์ลงไป 5 หยด ไตเตรตด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนสารละลายเปลี่ยนสี บันทึกปริมาณที่ใช้ (A_1)

7.3.3 นำไปต้มให้เดือดประมาณ 2-3 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง สารละลายจะกลับมาเป็นสีเดิม

7.3.4 ไตเตรตด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกอีกครั้ง จนสารละลายเปลี่ยนสี บันทึกปริมาตรที่ใช้ (A_2)

$$\frac{\text{ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มัล)}}{= \frac{2000 \times W_1}{(A_1 + A_2) \times 106}}$$

7.4 การคำนวณ

$$\frac{\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์)}}{= \frac{1.401 \times N \times V}{W}}$$

N คือ ความเข้มข้นที่แน่นอนของกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มัล)

V คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มัล)

W คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

8. ปริมาตรเกลือ

ความเข้มข้นของเกลือจะวิเคราะห์ตามวิธีการของ AOAC (1975)

8.1 สารเคมี

8.1.1 ซิลเวอร์ไนเตรท (AgNO_3) มาตรฐาน ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล: อบ AgNO_3 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่ง AgNO_3 16.9870 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา

8.1.2 กรดไนตริก (HNO_3) ความเข้มข้น 6 นอร์มัล

8.1.3 โพแทสเซียมไทโอไซยาเนต (KSCN) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล: ชั่ง KSCN 9.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา นำไปเทียบมาตรฐานกับ AgNO_3 ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัลเพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอนของ KSCN

8.1.4 สารละลายอินดิเคเตอร์ (ferric alum): ละลายแอมโมเนียมเฟอร์ริกซัลเฟต ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$) 40 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วหยดไนตริกความเข้มข้น 2 นอร์มัล ลงไป 2-3 หยด

8.2 วิธีการวิเคราะห์

8.2.1 เจือจางตัวอย่างน้ำปลาด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า ดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

8.2.2 เติม AgNO_3 ลงไป 10 มิลลิลิตร (ให้ปริมาณมากเกินไปในการทำปฏิกิริยากับ NaCl เกิดเป็นตะกอนของ AgCl ได้หมด) เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม HNO_3 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เพื่อป้องกัน AgNO_3 ไปทำปฏิกิริยากับ anion ชนิดอื่นที่มีอยู่ในน้ำปลา

8.2.3 นำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนเดือดประมาณ 15 นาที เพื่อให้ตะกอนที่ไม่ใช่ AgCl ละลายได้หมด

8.2.4 ใส่สารละลายอินดิเคเตอร์ลงไป 2-3 มิลลิลิตร แล้วไตเตรทกับ KSCN ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ AgNO₃ ส่วนที่เหลือ เมื่อถึงจุดยุติจะมีสีแดงอิฐเกิดขึ้น บันทึกปริมาตร KSCN ที่ใช้

8.3 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเกลือ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{0.0058443(Y-X) \times 100}{W}$$

Y คือ ปริมาตรของ AgNO₃ (มิลลิลิตร)

X คือ ปริมาตรของ KSCN (มิลลิลิตร)

W คือ ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

9. อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE

ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Laemmli (1970)

9.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

9.1.1 สารละลาย 30% acrylamide, 0.8% BIS (N,N'-bis-methylene-acrylamide): ละลาย acrylamide 30 กรัม และ BIS 0.8 กรัม ในน้ำก่้างจัดอออน (deionized water) ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรแล้วกรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 เก็บสารละลายในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการเก็บรักษานาน 30 วัน

9.1.2 สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8: ละลาย Tris-base 27.23 กรัม ในน้ำก่้างจัดอออนปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 8.8 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 6.0 โมลาร์ ปรับปริมาตรเป็น 150 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9.1.3 สารละลาย Tris- HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 6.8: ละลาย Tris-base 6.0 กรัม ในน้ำก่้างจัดอออนปริมาตร 60 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 6.8 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 6.0 โมลาร์ ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9.1.4 สารละลาย 10% SDS (sodium dodecylsulfate) : ละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำก่้างจัดอออนปริมาตร 90 มิลลิลิตร กวนเบา ๆ จนสารละลายใส ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

9.1.5 สารละลาย running buffer: ละลาย Tris-base 3.0 กรัม ไกลซีน((NH₂)₂CH₂COOH) 14.4 กรัม ในน้ำก่้างจัดอออน แล้วเติมสารละลาย 10% SDS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9.1.6 สารละลายย้อม Coomassie blue : ละลาย Coomassie Brilliant blue R-250 2.5 กรัม ในเมทานอล (methanol) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และกรดอะซิติก (CH_3COOH) เพิ่มขึ้น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปรับปริมาตรด้วยน้ำก้ำจัดอออนเป็น 1.0 ลิตร เก็บไว้ในขวด สีชาที่อุณหภูมิห้อง

9.1.7 สารละลาย destain : ผสมเมทานอล (methanol) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และ กรดอะซิติก (CH_3COOH) เพิ่มขึ้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปรับปริมาตรด้วย น้ำก้ำจัดอออนเป็น 1.0 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9.1.8 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อ มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้งาน)

9.1.9 TEMED (N,N,N',N'-tetra ethylene diamine)

9.1.10 2-mercaptoethanol

9.1.11 กลีเซอรอล (glycerol)

9.1.12 สารละลายบรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue) ความเข้มข้น 0.005 เปอร์เซ็นต์

9.1.13 ชุดโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (SDS-6H ของบริษัท Sigma)

9.2 วิธีการเตรียมตัวอย่าง

9.2.1 เตรียมสารละลายโปรตีนตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 670 ไมโครลิตร

9.2.2 เตรียมสารละลาย 10% SDS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร 2-mercaptoethanol ปริมาตร 10 ไมโครลิตร สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

กลีเซอรอลปริมาตร 200 ไมโครลิตร และสารละลายบล็อมฟินอลบลูความเข้มข้น 0.005 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5.0 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

9.2.3 นำสารละลายโปรตีนตัวอย่างไปต้มน้ำให้เดือดนาน 1-2 นาที แล้วทำให้เย็น

9.2.4 สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล มีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกัน

9.3 วิธีการเตรียมเจล (slab gel)

9.3.1 ทำความสะอาดแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจล

9.3.2 ประกอบแผ่นกระจกเข้ากับอุปกรณ์ชิ้นอื่น ๆ โดยใช้ spacers เป็นตัวปรับความหนาของแผ่นเจล 0.75-1.0 มิลลิเมตร กำหนดให้ stacking gel มีความสูงประมาณ 2.0 เซนติเมตร เหนือ separating gel

9.3.3 เตรียมสารละลายของ separating gel ดังนี้ ผสมสารละลาย 30% acrylamide, 0.8% BIS ปริมาตร 8.0 มิลลิตร สารละลาย Tris- HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8 ปริมาตร 5.0 มิลลิตร สารละลาย 10% SDS ปริมาตร 0.2 มิลลิตร และน้ำกำจัดอออนปริมาตร 6.7 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน

9.3.4 นำสารละลายทั้งหมดไปดูดอากาศออก (degas) นาน 5 นาที แล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิตร และ TEMED ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยไม่ให้มีฟองอากาศ

9.3.5 เทสารละลายของเจลลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ให้เหลือระยะห่างจากขอบบนประมาณ 2.0 เซนติเมตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ นำแผ่นกระจกวางในแนวตั้ง

9.3.6 เติมน้ำกลั่นเพียงเล็กน้อยที่มุมทั้งสองด้านของกระจกเพื่อให้ผิวหน้าเจลเรียบ ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว เมื่อเห็นรอยต่อระหว่างเจลกับน้ำให้ดูดน้ำทิ้งไปแล้วใช้กระดาษกรองชิ้นเล็ก ๆ ดูดซับน้ำออกไปอีกที

9.3.7 เตรียมสารละลายของ stacking gel ดังนี้ ผสมสารละลาย 30% acrylamide, 0.8% BIS ปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8 ปริมาตร 3.75 มิลลิลิตร สารละลาย 10% SDS ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร และน้ำกำจัดไอออน ปริมาตร 3.75 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

9.3.8 นำสารละลายทั้งหมดไปดูดอากาศออก (degas) นาน 5 นาที แล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร และ TEMED ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยไม่ให้มีฟองอากาศ

9.3.9 เทสารละลายเจลลงบน separating gel ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ทำช่อง (well) สำหรับใส่ตัวอย่างโดยใส่หัว (template comb) ลงใน stacking gel แล้วทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว นำเจลออก จะเกิดช่องสำหรับใส่ตัวอย่าง

9.4 วิธีการทดลอง

9.4.1 ต่ออุปกรณ์อิเล็กโทรฟอรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม running buffer ลงในภาชนะทั้งด้านในและด้านนอกจนเกือบเต็ม

9.4.2 ใส่สารละลายโปรตีนตัวอย่าง และ สารละลายโปรตีนมาตรฐาน ลงในแต่ละช่อง โดยใช้ปริมาตร 20-25 ไมโครลิตร

9.4.3 ต่อขั้วบวก (anode) และขั้วลบ (cathode) เข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 40 มิลลิแอมแปร์ ความต่างศักย์คงที่ที่ 100 โวลต์

9.4.4 หยุดกระแสไฟฟ้าเมื่อสีของบรอมฟินอลบลูเคลื่อนที่เกือบถึงปลายของ separating gel

9.4.5 นำแผ่นเจลออกจากชุดอุปกรณ์ แล้วไปย้อมด้วยสารละลายสีย้อม Coomassie blue นาน 30 นาที

9.4.6 ล้างสีย้อมออกโดยใช้สารละลาย destain จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน วัดระยะทางของแถบโปรตีนแต่ละชนิดและระยะทางที่สีของบรอมฟินอลบลูเคลื่อนที่

9.4.7 นำผลที่ได้คำนวณเป็นค่า mobility เพื่อใช้ในการหาค่า molecular weight ของโปรตีนตัวอย่างจากกราฟ standard molecular weight ต่อไป

9.5 วิธีการคำนวณ

$$\text{mobility} = \frac{\text{ระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงจุดที่โปรตีนตัวอย่างเคลื่อนที่ถึง}}{\text{ระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงจุดที่บรอมฟินอลบลูเคลื่อนที่ถึง}}$$

เขียนกราฟ standard molecular weight ระหว่างค่า mobility กับค่า log molecular weight ของแถบโปรตีนมาตรฐาน

ภาคผนวก จ
ผลการทดลอง

ตารางผนวกที่ จ1 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสใน
อาหารเหลว SGC ที่เติมน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเกลือ NaCl
ความเข้มข้น 2.0-3.0 โมลาร์

Bacterial isolates	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (หน่วย/มิลลิลิตร)
PB213	63.10
PB221	36.92
PB233	80.25
PB262	35.90
PB314	40.71
PB372	65.50
PB373	42.64
PB374	60.21
PB376	36.51

ตารางผนวกที่ จ2 ผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อการเจริญของแบคทีเรีย
Staphylococcus warneri PB233

เวลา (วัน)	การเจริญของเซลล์ (OD 600 nm)				
	0 M NaCl	1 M NaCl	2 M NaCl	3 M NaCl	4 M NaCl
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	1.79	1.70	1.71	1.72	1.41
2	1.86	1.75	1.72	1.73	1.65
3	2.04	1.91	1.69	1.71	1.71
4	2.26	1.98	1.83	1.75	1.70
5	2.71	2.25	2.21	1.99	1.74
6	2.80	2.30	2.24	2.16	1.76
7	2.86	2.50	2.32	2.13	1.67
8	2.95	2.55	2.33	2.23	1.66
9	2.89	2.42	2.25	2.31	1.69
10	2.70	2.36	2.19	2.18	1.47

ตารางผนวกที่ จ3 ผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส
ของแบคทีเรีย *Staphylococcus warneri* PB233

เวลา(วัน)	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (หน่วย/มิลลิลิตร)				
	0 M NaCl	1 M NaCl	2 M NaCl	3 M NaCl	4 M NaCl
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	23.10	28.20	29.95	25.59	25.01
2	29.50	28.90	35.50	50.50	30.35
3	36.67	40.81	38.20	68.72	35.36
4	44.25	43.29	70.45	85.91	72.31
5	45.12	48.59	71.12	85.99	70.01
6	56.52	69.40	70.68	84.07	65.10
7	56.10	65.20	68.23	84.60	64.80
8	40.92	65.09	66.42	69.50	64.50
9	38.46	64.34	66.55	70.20	59.24
10	25.50	50.11	60.12	62.40	50.15

ตารางผนวกที่ จ4 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ

เวลา(วัน)	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (หน่วย/มิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมเซลล์/ลิตร)	พีเอช
0	0.00	0.00	6.77
1	55.70	4.50	6.90
2	68.95	6.10	7.50
3	69.95	6.00	7.88
4	85.34	6.50	8.28
5	82.10	7.10	8.40
6	80.25	7.00	8.50
7	71.45	6.60	8.63
8	62.15	6.50	8.67
9	61.84	6.70	8.72
10	60.32	6.60	8.79

ตารางผนวกที่ ๖5 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ในถึงหมักขนาด 2.5 ลิตร

เวลา(ชั่วโมง)	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (หน่วย/มิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมเซลล์/ลิตร)	พีเอช
0	0.00	0.00	6.83
4	6.38	3.48	7.16
8	14.90	4.67	7.94
12	18.12	6.18	8.32
16	44.54	7.25	8.55
20	50.75	7.30	8.62
24	51.87	7.36	8.66
28	70.81	7.53	8.68
32	71.89	7.60	8.67
36	85.64	7.62	8.66
40	85.76	7.58	8.57
44	86.12	77.76	8.53
48	90.12	7.78	8.54
52	88.74	7.65	8.56
56	75.09	7.48	8.58
60	64.75	7.35	8.57
64	62.08	7.40	8.55
68	62.05	7.38	8.56
72	55.12	6.90	8.52

ตารางผนวกที่ จ6 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ

Staphylococcus warneri PB233

พีเอช	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
4.0	10.35
5.0	35.67
6.0	79.59
7.0	100.00
8.0	97.12
9.0	85.26
10.0	80.12
11.0	55.31
12.0	53.66

ตารางผนวกที่ จ7 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ

Staphylococcus warneri PB233

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
30	78.00
40	100.00
50	72.10
60	46.31
70	10.56
80	8.31

ตารางผนวกที่ ๖8 ความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ที่พีเอชต่าง ๆ

พีเอช	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
4.0	0.00
5.0	0.00
6.0	70.00
7.0	100.00
8.0	98.03
9.0	85.27
10.0	40.36
11.0	16.35
12.0	15.23

ตารางผนวกที่ ๖9 ความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
30	100.00
40	91.23
50	41.00
60	10.63
70	0.00
80	0.00

ตารางผนวกที่ จ10 ผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์
ไลเปสจากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233

ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (โมลาร์)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
0.0	49.36
0.5	53.55
1.0	70.58
1.5	70.51
2.0	81.20
2.5	100.00
3.0	96.32
3.5	81.30
4.0	78.35

ตารางผนวกที่ จ11 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียทนเกลือ
Staphylococcus warneri PB233

พีเอช	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
4.0	20.50
5.0	48.90
6.0	86.85
7.0	100.00
8.0	90.10
9.0	90.05
10.0	85.55
11.0	60.07
12.0	35.50

ตารางผนวกที่ จ12 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียทนเกลือ
Staphylococcus warneri PB233

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมสัมพันธ์ (เปอร์เซ็นต์)
30	88.90
40	100.00
50	80.10
60	51.20
70	25.60
80	15.90

ตารางผนวกที่ จ13 ความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ที่พีเอชต่าง ๆ

พีเอช	กิจกรรมสัมพันธ์ (เปอร์เซ็นต์)
4.0	10.20
5.0	16.75
6.0	89.21
7.0	100.00
8.0	98.50
9.0	90.05
10.0	45.65
11.0	30.32
12.0	20.60

ตารางผนวกที่ จ14 ความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
30	100.00
40	95.50
50	755.90
60	35.90
70	25.35
80	0.00

ตารางผนวกที่ จ15 ผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียทนเกลือ *Staphylococcus warneri* PB233

ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (โมลาร์)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
0.0	50.55
0.5	55.80
1.0	80.10
1.5	85.10
2.0	95.12
2.5	100.00
3.0	97.65
3.5	80.10
4.0	75.20

ตารางผนวกที่ ๑16 ปริมาณ acetic acid ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการหมัก

เวลา (สัปดาห์)	acetic acid (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)					
	control	0.1% lipase	0.5% lipase	1.0% lipase	1.5% lipase	2.0% lipase
4	40.38	42.15	43.10	43.15	43.10	43.05
6	46.20	49.27	52.61	55.30	57.10	59.11
8	52.15	56.30	60.44	65.27	66.45	66.87
10	60.34	65.08	67.20	71.24	74.02	74.10
12	61.23	66.29	67.31	73.95	75.90	76.09
14	63.40	68.46	71.94	76.10	76.77	76.82
16	65.41	70.74	73.90	80.20	81.15	84.22
18	68.76	77.14	78.51	83.16	84.15	88.01
20	73.20	78.42	79.40	85.46	85.98	88.07
22	75.21	80.43	82.16	90.66	90.87	91.42
24	75.60	81.80	84.02	91.45	91.61	91.70

ตารางผนวกที่ ๑17 ปริมาณ propionic acid ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปส
ที่ชอบเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการหมัก

เวลา (สัปดาห์)	propionic acid (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)					
	control	0.1% lipase	0.5% lipase	1.0% lipase	1.5% lipase	2.0% lipase
4	15.20	15.07	14.98	15.30	15.17	15.01
6	17.56	21.24	25.52	27.78	29.05	30.16
8	20.75	26.10	29.27	32.19	32.50	32.55
10	21.95	28.22	30.77	32.0	33.16	35.57
12	24.20	30.17	32.67	34.44	35.54	37.71
14	24.65	30.97	33.81	36.61	36.99	37.80
16	25.91	32.41	34.80	37.71	38.16	39.94
18	26.01	32.95	34.97	37.97	39.06	39.95
20	26.02	33.09	35.07	38.80	39.96	40.02
22	26.13	33.19	35.59	39.06	39.97	40.02
24	26.20	33.52	35.61	39.81	40.01	40.05

ตารางผนวกที่ ๑18 ปริมาณ isobutyric acid ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปส
ที่ชอบเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการหมัก

เวลา (สัปดาห์)	isobutyric acid (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)					
	control	0.1% lipase	0.5% lipase	1.0% lipase	1.5% lipase	2.0% lipase
4	1.02	1.14	1.09	1.20	1.16	1.07
6	1.97	2.19	2.97	3.52	3.89	3.91
8	2.25	3.96	4.19	5.91	6.31	6.37
10	2.94	4.50	5.28	7.18	8.88	9.54
12	3.59	4.92	6.04	8.77	9.75	9.89
14	4.11	5.47	6.54	10.01	11.71	11.95
16	4.90	6.04	7.13	10.05	12.11	12.01
18	5.01	6.54	8.09	11.19	12.91	13.05
20	5.06	7.05	8.27	12.50	13.07	13.97
22	5.21	7.91	9.15	12.80	13.56	13.80
24	5.36	8.51	10.72	13.75	13.82	13.85

ตารางผนวกที่ ๑19 ปริมาณ butyric acid ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปส
ที่ชอบเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการหมัก

เวลา (สัปดาห์)	butyric acid (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)					
	control	0.1% lipase	0.5% lipase	1.0% lipase	1.5% lipase	2.0% lipase
4	23.50	23.16	23.20	23.28	23.15	23.74
6	25.02	25.92	26.61	27.79	29.14	30.15
8	25.51	27.72	28.83	32.17	33.10	33.21
10	26.61	27.90	30.09	34.40	34.95	35.57
12	26.61	28.81	31.12	36.78	36.90	36.99
14	26.95	28.85	33.92	39.90	41.22	41.27
16	27.75	30.02	34.44	40.15	42.21	43.40
18	29.54	33.30	39.07	40.79	42.51	43.70
20	30.86	35.50	39.90	42.55	43.30	44.01
22	31.11	37.70	40.10	43.02	43.65	44.09
24	32.55	38.10	40.12	43.95	44.03	44.10

ตารางผนวกที่ ๑20 ปริมาณ isovaleric acid ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปส
ที่ชอบเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการหมัก

เวลา (สัปดาห์)	isovaleric acid (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)					
	control	0.1%lipase	0.5% lipase	1.0% lipase	1.5% lipase	2.0% lipase
4	12.10	12.15	11.97	12.05	11.95	12.11
6	14.45	15.13	16.62	18.88	19.20	19.01
8	15.07	17.77	18.01	20.55	21.70	22.20
10	17.01	19.09	20.13	24.37	26.67	26.69
12	17.52	19.94	20.95	25.20	27.72	27.70
14	18.87	21.80	23.35	29.04	29.19	29.52
16	19.91	22.26	24.36	29.91	29.95	30.03
18	20.06	23.03	24.83	30.02	30.21	30.07
20	20.15	23.35	25.51	30.03	30.95	30.19
22	20.40	23.97	26.28	30.72	31.05	31.11
24	20.43	24.21	26.35	30.82	31.11	31.13

ตารางผนวกที่ จ21 ปริมาณ valeric acid ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการหมัก

เวลา (สัปดาห์)	valeric acid (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)					
	control	0.1% lipase	0.5% lipase	1.0% lipase	1.5% lipase	2.0% lipase
4	0.95	0.97	1.01	1.03	0.92	0.90
6	1.27	2.02	2.63	3.04	3.69	3.85
8	1.50	2.56	2.97	3.51	3.95	3.97
10	1.80	3.15	4.30	6.61	6.99	7.02
12	1.81	3.71	4.60	6.79	7.01	7.50
14	1.93	4.09	6.27	8.15	9.15	9.66
16	2.04	4.95	6.67	9.94	10.10	10.21
18	2.57	5.52	7.37	9.95	10.88	10.95
20	3.05	5.97	7.75	10.70	1.20	11.20
22	3.56	6.49	8.01	11.24	11.77	11.80
24	3.71	6.82	8.10	11.56	11.82	11.94

ตารางผนวกที่ จ22 ปริมาณเกลือที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่ไม่เติมและเติมเอนไซม์ไลเปส
ที่ชอบเกลือความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับการหมัก

เวลา (สัปดาห์)	ปริมาณเกลือ (เปอร์เซ็นต์)	
	control	1.0% lipase
0	26.50	25.95
2	26.06	25.23
4	25.56	25.16
6	25.41	25.05
8	25.10	24.80
10	25.01	24.64
12	24.85	24.55
14	24.65	24.50
16	24.60	23.96
18	24.50	23.90
20	24.42	23.81
22	24.40	23.80
24	24.40	23.80

ตารางผนวกที่ จ23 พีเอชที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่ไม่เติมและเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบ
เกลือความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับการหมัก

เวลา (สัปดาห์)	พีเอช	
	control	1.0% lipase
0	6.45	6.50
2	6.30	6.42
4	6.10	6.20
6	5.98	5.85
8	5.94	5.8
10	5.93	5.75
12	5.92	5.70
14	5.91	5.69
16	5.90	5.65
18	5.88	5.64
20	5.88	5.61
22	5.87	5.53
24	5.86	5.45

ตารางผนวกที่ จ24 ระดับความเข้มสีที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักน้ำปลาที่ไม่เติมและเติมเอนไซม์
ไลเปสที่ชอบเกลือความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับการหมัก

เวลา (สัปดาห์)	ความเข้มสี (OD 420 nm)	
	control	1.0% lipase
0	0.05	0.06
2	0.13	0.15
4	0.42	0.40
6	0.72	0.68
8	0.76	0.75
10	0.85	0.80
12	0.94	0.89
14	1.01	0.95
16	1.17	1.12
18	1.26	1.20
20	1.30	1.25
22	1.35	1.30
24	1.40	1.35

ภาคผนวก จ
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางผนวกที่ ๑1 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ acetic acid ในน้ำปลาที่เติม เอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	df	Sum of Square	Mean Square	F
Treatment	5	670.139	134.028	1410.821 *
Error	12	1.140	0.095	
Total	17	671.297		

ตารางผนวกที่ ๑2 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ propionic acid ในน้ำปลาที่เติม เอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	df	Sum of Square	Mean Square	F
Treatment	5	449.961	89.992	523.209 *
Error	12	2.061	0.172	
Total	17	452.022		

ตารางผนวกที่ ๑3 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ isobutyric acid ในน้ำปลาที่เติม เอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	df	Sum of Square	Mean Square	F
Treatment	5	185.176	37.035	698.773 *
Error	12	0.631	0.053	
Total	17	185.080		

ตารางผนวกที่ ๓4 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ butyric acid ในน้ำปลาที่เติม เอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	df	Sum of Square	Mean Square	F
Treatment	5	319.280	63.856	851.413 [*]
Error	12	0.900	0.075	
Total	17	320.180		

ตารางผนวกที่ ๓5 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ isovaleric acid ในน้ำปลาที่เติม เอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	df	Sum of Square	Mean Square	F
Treatment	5	297.637	59.527	157.896 [*]
Error	12	4.521	0.377	
Total	17	302.159		

ตารางผนวกที่ ๓6 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ valeric acid ในน้ำปลาที่เติม เอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	df	Sum of Square	Mean Square	F
Treatment	5	170.087	34.017	293.250 [*]
Error	12	1.392	0.116	
Total	17	171.479		

ตารางผนวกที่ ๗ การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณฟอรั่มอลในโตรเจนใน
น้ำปลาที่เติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือนชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance
(ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	df	Sum of Square	Mean Square	F
Treatment	3	71.586	23.862	507.702*
Error	8	0.373	0.047	
Total	11	71.959		

ตารางผนวกที่ ๘ การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดใน
น้ำปลาที่เติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือนชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance
(ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	df	Sum of Square	Mean Square	F
Treatment	3	49.674	16.558	194.800*
Error	8	0.677	0.085	
Total	11	50.351		

ตารางผนวกที่ ๙ การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณ 5'-GMP ในน้ำปลาที่เติม
เอนไซม์ที่ชอบเกลือนชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และ
ใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	df	Sum of Square	Mean Square	F
Treatment	3	35.542	11.847	18.254*
Error	8	5.191	0.649	
Total	11	40.733		

ตารางผนวกที่ ๑๑๐ การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณเกลือในน้ำปลาที่เดิม เอนไซม์ที่ชอบเกลือชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	df	Sum of Square	Mean Square	F
Treatment	3	2.953	0.984	3.936 *
Error	8	1.998	0.250	
Total	11	4.951		

ตารางผนวกที่ ๑๑๑ การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของพีเอชในน้ำปลาที่เดิมเอนไซม์ที่ชอบเกลือชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	df	Sum of Square	Mean Square	F
Treatment	3	0.546	0.182	91 *
Error	8	0.014	0.002	
Total	11	0.560		

ตารางผนวกที่ ๑๑๒ การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของระดับความเข้มข้นในน้ำปลาที่เดิมเอนไซม์ที่ชอบเกลือชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	df	Sum of Square	Mean Square	F
Treatment	3	1.388	0.463	1251.35 *
Error	8	0.003	0.00037	
Total	11	1.391		

ตารางผนวกที่ ๑13 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณ acetic acid ในน้ำปลา
 เติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือนชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA)
 และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	df	Sum of Square	Mean Square	F
Treatment	3	743.636	247.879	1180.376*
Error	8	1.682	0.210	
Total	11	745.317		

ตารางผนวกที่ ๑14 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณ propionic acid ใน
 น้ำปลาที่เติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือนชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance
 (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	df	Sum of Square	Mean Square	F
Treatment	3	870.056	290.019	13810.428*
Error	8	0.169	0.021	
Total	11	870.225		

ตารางผนวกที่ ๑15 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณ isobutyric acid ใน
 น้ำปลาที่เติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือนชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance
 (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	df	Sum of Square	Mean Square	F
Treatment	3	232.797	77.430	312.217*
Error	8	1.982	0.248	
Total	11	234.272		

ตารางผนวกที่ ๑16 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณ butyric acid ในน้ำปลา
ที่เติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือนชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance
(ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	df	Sum of Square	Mean Square	F
Treatment	3	580.516	193.505	427.163*
Error	8	3.627	0.453	
Total	11	584.143		

ตารางผนวกที่ ๑17 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณ isovaleric acid ใน
น้ำปลาที่เติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือนชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance
(ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	df	Sum of Square	Mean Square	F
Treatment	3	736.306	245.435	566.824*
Error	8	3.463	0.433	
Total	11	739.769		

ตารางผนวกที่ ๑18 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณ valeric acid ในน้ำปลา
ที่เติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือนชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี Analysis of Variance
(ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	df	Sum of Square	Mean Square	F
Treatment	3	188.323	62.774	206.493*
Error	8	2.432	0.304	
Total	11	190.755		

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายอนันต์ บุญปาน
วัน เดือน ปี ที่เกิด	15 สิงหาคม 2519
สถานที่เกิด	อำเภอตากฟ้า จังหวัดนครสวรรค์
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (อุตสาหกรรมเกษตร) มหาวิทยาลัยนเรศวร ศศ.บ. (รัฐศาสตร์) เกียรตินิยมอันดับ 2 มหาวิทยาลัยรามคำแหง วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	อาจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2547)