บทที่ 4

ผลและอภิปรายผล

1. การคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการคัดแยกหาแบคทีเรียชอบเค็มจากตัวอย่างน้ำปลาที่มีระยะเวลาการหมักแตกต่างกัน

จากการทดลองใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 8 ชนิดเพื่อนำมาคัดแยกแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำปลา โดยแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อออกเป็น 3 กลุ่ม คือ (1) อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียชอบเค็ม (halophilic bacteria) ได้แก่ Complex medium of Dundas และ Sehgal & Gibbons medium (2) อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (anaerobic bacteria) ได้แก่ Viande-Levure glucose agar (3) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผู้เคยทำการทดลองใช้คัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำปลาชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Brain heart infusion agar, Tryptic soy yeast extract agar, Tryptone yeast extract agar, Nutrient agar และ Plate count agar โดยอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดผสมโซเดียมคลอไรด์ โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 และ 25 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังได้เติม cysteine hydrochloride ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดเพื่อทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อนั้น มีสภาพเป็นสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำมากขึ้น เนื่องจากสารดังกล่าว เป็นสารรีดิวซ์ที่ช่วยลดการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาในอดีตพบว่า แบคทีเรียที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักน้ำปลาในธรรมชาติ ได้แก่กลุ่มแบคทีเรียทนเค็มและกลุ่มแบคทีเรียชอบเค็ม ซึ่งแบคทีเรียแต่ละกลุ่มจะเจริญได้ดีในช่วงระยะเวลาการหมักที่แตกต่างกัน แม้แต่ในกลุ่มแบคทีเรียชอบเค็มซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักน้ำปลา ก็อาจมีระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดภายในถังหมักที่แตกต่างกัน (46) ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ควรจะต้องเหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียชอบเค็มชนิดต่าง ๆ ให้มากที่สุด ในการทดลองนี้จึงศึกษากับตัวอย่างน้ำปลาที่มีอายุการหมักแตกต่างกัน 2 ระยะคือ ที่มีอายุการหมัก 10 วัน ซึ่งเป็นระยะเริ่มต้นของการหมักโดยแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยโปรตีนของเนื้อปลาและที่อายุการหมัก 3 เดือน ซึ่งแบคทีเรียในระยะส่วนใหญ่จะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดกลิ่นของน้ำปลา ซึ่งทั้งกระบวนการย่อย

โปรตีนและกระบวนการเกิดกลิ่นเป็นกระบวนการสำคัญในการเกิดน้ำปลา นอกจากนี้ผลการศึกษาในตัวอย่างที่อายุการหมัก 3 เดือน ยังเป็นการสนับสนุนผลการคัดเลือกชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการคัดเลือกในครั้งแรกด้วย ซึ่งพบว่าจำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำปลา 1 มิลลิลิตร ที่มีอายุการหมัก 10 วันและ 3 เดือนในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ได้แสดงผลในตารางที่ 11 และตารางที่ 12

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดที่คัดแยกได้จากน้ำปลาอายุการหมัก 10 วัน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ซึ่งผสมโซเดียมคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 และ 25 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อผสมโซเดียมคลอไรด์	จำนวนแบคทีเรียในน้ำปลาหมัก 1 มิลลิลิตร	
	15% โซเดียมคลอไรด์	25% โซเดียมคลอไรด์
1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียชอบเค็ม		
Complex medium of Dundas	2.67×10^2	4.20×10^1
Sehgal & Gibbons medium	3.10×10^2	5.90×10^1
2. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ		
Viande-Levure glucose agar	3.15×10^2	4.40×10^1
3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผู้เคยทำการทดลองใช้คัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำปลา		
Brain heart infusion agar	4.95×10^2	1.45×10^2
Tryptic soy yeast extract agar	4.60×10^2	1.39×10^2
Tryptone yeast extract agar	3.28×10^2	7.10×10^1
Nutrient agar	2.37×10^2	3.70×10^1
Plate count agar	3.55×10^2	9.30×10^1

ตารางที่ 12 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดที่คัดแยกได้จากน้ำปลาอายุการหมัก 3 เดือน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ซึ่งผสมโซเดียมคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 และ 25 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อผสมโซเดียมคลอไรด์	จำนวนแบคทีเรียในน้ำปลาหมัก 1 มิลลิลิตร	
	15% โซเดียมคลอไรด์	25% โซเดียมคลอไรด์
1. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียชอบเค็ม		
Complex medium of Dundas	2.18×10^2	2.83×10^2
Sehgal & Gibbons medium	2.46×10^2	3.50×10^2
2. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ		
Viande-Levure glucose agar	1.42×10^2	5.60×10^2
3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผู้เคยทำการทดลองใช้คัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำปลา		
Brain heart infusion agar	5.85×10^2	4.70×10^3
Tryptic soy yeast extract agar	5.10×10^2	4.65×10^3
Tryptone yeast extract agar	2.98×10^2	6.75×10^2
Nutrient agar	2.15×10^2	1.81×10^2
Plate count agar	3.65×10^2	9.10×10^2

จากตารางที่ 11 และตารางที่ 12 พบว่าในแต่ละความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และอายุการหมักทั้ง 2 ระยะเวลา Brain heart infusion agar และ Tryptic soy yeast extract agar มีจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียเกิดขึ้นใกล้เคียงกัน และมีจำนวนมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น ๆ อีก 6 ชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะโคโลนีบางชนิดไม่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น พบเฉพาะใน Brain heart infusion agar และ Tryptic soy yeast extract agar เท่านั้น ส่วนลักษณะโคโลนีที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นสามารถพบได้ทั้งใน Brain heart infusion agar และ Tryptic soy yeast extract agar ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่น่าให้ความสนใจคือ Brain heart infusion agar และ Tryptic soy yeast extract agar แต่ข้อเสียของ Brain heart infusion agar และ Brain heart infusion broth คือเมื่อผสมโซเดียมคลอไรด์ลงไปโดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 และ 25 เปอร์เซ็นต์แล้ว พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อนี้จะตกตะกอนและมีลักษณะขุ่น ทำให้ไม่สะดวกและยากต่อการอ่านผลจำนวนแบคทีเรีย รวมทั้งการอ่านผลอื่นในการทดลองขั้นตอนต่อไป ซึ่งปัญหาดังกล่าวจะไม่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy yeast extract agar และ Tryptic soy yeast extract broth ประกอบด้วยเหตุผลอื่นสนับสนุน คือ Tryptic soy yeast extract agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถใช้เลี้ยงแบคทีเรียทั่ว ๆ ไปทั้งที่เป็นกลุ่ม anaerobes และ facultative anaerobes (77) มี yeast extract เป็นสารกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียชอบเค็มบางชนิด (33) วิธีการเตรียมไม่ยุ่งยากเนื่องจากมีขายในลักษณะอาหารสำเร็จรูป มีการใช้ Tryptic soy broth ที่มีส่วนประกอบหลักใกล้เคียงกับ Tryptic soy yeast extract agar เป็น enrichment media สำหรับแบคทีเรียทนเค็มบางชนิด (78) มีผู้เคยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ในการศึกษาจำนวนและชนิดของแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำปลามาแล้ว (79) ดังนั้นจึงเลือก Tryptic soy yeast extract agar ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลองขั้นตอนต่อไป

ส่วนเหตุผลที่อาหารเลี้ยงเชื้ออื่น ๆ เช่น Complex medium of Dundas และ Sehgal & Gibbons medium ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียชอบเค็ม แต่ในการทดลองนี้ให้ผลไม่ดีเท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ อาจเป็นเพราะอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียชอบเค็มที่มีโคโลนีสีแดงหรือชมพู เช่น Halococcus sp., Halobacterium sp. ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (strictly aerobes) แต่ในการทดลองนี้มุ่งเน้นคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ จึงทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไม่เหมาะสมในการใช้คัดแยก ส่วน Nutrient agar, Plate count agar, Tryptone yeast extract agar และ Viande-Levure glucose agar ที่ให้ผลการทดลองไม่ดีเท่ากับ Tryptic soy yeast extract agar อาจเป็นเพราะส่วนประ-

ถอบของอาหารไม่อุดมสมบูรณ์เหมือน Tryptic soy yeast extract agar

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียในทั้ง 2 ระยะเวลาของการหมัก พบว่า เมื่ออายุการหมักเพิ่มขึ้นแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 25 เปอร์เซ็นต์จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นด้วย ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ จะมีจำนวนแบคทีเรียค่อนข้างคงที่ จึงเป็นไปได้ว่าเมื่ออายุการหมักเพิ่มขึ้น เกลือจะละลายแพร่กระจายไปทั่วทุกส่วนของถังหมักและภายในตัวปลาได้มากขึ้น ในสภาวะดังกล่าวแบคทีเรียทนเค็ม (halotolerant bacteria) และแบคทีเรียที่ชอบเค็มปานกลาง (moderate halophilic bacteria) จะยังมีชีวิตรอดอยู่แต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนหรือเพิ่มจำนวนได้ช้ามาก ส่วนแบคทีเรียที่ชอบเค็มสูง (extreme halophilic bacteria) จะเจริญได้ดีและเพิ่มจำนวนมากขึ้น ดังนั้นแบคทีเรียที่ชอบเค็มสูงจึงน่าจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักน้ำปลาซึ่งสภาวะที่มีเกลืออยู่ในปริมาณสูง มากกว่าแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียที่ชอบเค็มปานกลาง

2. การศึกษาคุณสมบัติบางประการและคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่เจริญได้ดีภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำจากตัวอย่างน้ำปลาหมักตามธรรมชาติที่มีอายุการหมักแตกต่างกัน

2.1 การศึกษาข้อมูลเบื้องต้น คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการของตัวอย่างน้ำปลาที่มีอายุการหมักแตกต่างกัน

2.1.1 ข้อมูลเบื้องต้นและลักษณะทางกายภาพบางประการของตัวอย่างน้ำปลาที่ตรวจสอบได้แก่ อายุการหมัก ชนิดและอัตราส่วนของปลาที่ใช้ อัตราส่วนของปลาและเกลือ สภาพการหมัก ลักษณะของตัวอย่างน้ำปลา ได้แสดงในตารางที่ 13

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างน้ำปลาที่นำมาใช้ในการศึกษาเพื่อคัด-แยกแบคทีเรีย

ตัวอย่าง	อายุการหมัก (เดือน)	ชนิดของปลาและอัตราส่วนของปลาแต่ละชนิด	อัตราส่วนของปลาและเกลือ (โดยน้ำหนัก)	สภาพการหมัก	ลักษณะของตัวอย่างปลาหมัก
1	1	ปลาทูและปลาทูหลังเขียว	70 และ 30	กลางแจ้ง	สีแดง ข้น กลิ่นเหม็นคาว
2	2	ปลาทูและปลาไส้ตัน (60:40)	70 และ 30	กลางแจ้ง	สีเหลือง ใส กลิ่นเหม็นคาว
3	3	ปลาทูและปลาไส้ตัน (50:50)	70 และ 30	กลางแจ้ง	สีน้ำตาลเหลือง ใส กลิ่นเหม็นหืน
4	4	ปลาทูและปลาไส้ตัน (80:20)	70 และ 30	กลางแจ้ง	สีน้ำตาล ใส กลิ่นเหม็นหืน
5	6	ปลาไส้ตันและปลาอื่น ๆ (95:5)	60 และ 40	ในที่ร่ม	สีน้ำตาล ใส กลิ่นคล้ายน้ำปลา
6	13	ปลาไส้ตันและปลาอื่น ๆ (95:5)	55 และ 45	ในที่ร่ม	สีน้ำตาลเข้ม ใส กลิ่นคล้ายน้ำปลา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.2 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีบางประการของตัวอย่างน้ำปลาที่อายุการหมักแตกต่างกันได้แก่ ความเป็นกรดด่าง (pH) ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน ปริมาณแอมโมเนียคัลไนโตรเจน และปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน ได้แสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดงคุณสมบัติทางเคมีของตัวอย่างน้ำปลาที่นำมาใช้ในการศึกษาเพื่อคัดแยกแบคทีเรีย

ตัวอย่าง	อายุการหมัก (เดือน)	pH	ปริมาณ NaCl (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแอมโมเนียคัล-ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน (กรัมต่อลิตร)
1	1	5.61	26.77	12.54	7.36	1.68	5.68
2	2	5.34	28.12	16.10	10.73	1.42	9.30
3	3	5.51	27.60	18.38	12.17	1.78	10.39
4	4	5.23	27.08	18.64	12.59	1.45	11.13
5	6	5.31	26.04	23.23	15.13	1.51	13.62
6	13	5.62	25.73	27.50	19.12	2.79	16.33

2.2 การศึกษาจำนวนและคัดแยกแบคทีเรียโดยใช้วิธี dilution plating method โดยใช้ Tryptic soy yeast extract agar ผสมโซเดียมคลอไรด์โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 และ 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน ซึ่งผลการศึกษาได้แสดงในตารางที่ 15

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดที่คัดแยกได้จากน้ำปลามีอายุการหมักแตกต่างกันเมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy yeast extract agar ผสมโซเดียมคลอไรด์ โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 และ 25 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน

ตัวอย่าง	อายุการหมัก (เดือน)	จำนวนแบคทีเรียใน 1 มิลลิลิตรของตัวอย่างน้ำปลา	
		Tryptic soy yeast extract agar + 15% โซเดียมคลอไรด์	Tryptic soy yeast extract agar + 25% โซเดียมคลอไรด์
1	1	1.67×10^5	2.23×10^5
2	2	1.03×10^3	2.67×10^4
3	3	2.75×10^4	4.50×10^5
4	4	1.14×10^3	4.60×10^3
5	6	2.42×10^3	1.62×10^4
6	13	2.34×10^5	3.20×10^4

จากตารางที่ 13 แสดงว่าปลาที่ใช้หมักน้ำปลาคือ ปลาทูและปลาไส้ตัน ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าน้ำปลาที่ดีควรทำมาจากปลาไส้ตัน ส่วนอัตราส่วนของปลาและเกลือที่ใช้หมักน้ำปลาคือ 70 ส่วน และ 30 ส่วนโดยน้ำหนัก ยกเว้นในตัวอย่างที่ 5 และ 6 ใช้ปลา 60 ส่วน เกลือ 40 ส่วน และปลา 55 ส่วน เกลือ 45 ส่วนตามลำดับ สภาพการหมักพบว่ามีทั้งในที่ร่มและสภาพกลางแจ้ง เมื่อพิจารณาลักษณะของตัวอย่างพบว่าในตัวอย่างที่มีอายุการหมัก 1,2,3 และ 4 เดือนยังไม่มีคุณลักษณะของน้ำปลาทั้งสีและกลิ่น ในตัวอย่างอายุการหมัก 1 เดือน มีสีแดงและขุ่น ซึ่งอาจเกิดจากสีของเลือดปลาและการแขวนลอยของโปรตีนของปลาในสารละลายที่มีเกลือผสมอยู่ในปริมาณมาก ส่วนกลิ่นเหม็นคาวเกิดจากกลิ่นของสารประกอบไนโตรเจนและสารที่ระเหยได้ชนิดอื่น ๆ จากตัวปลา (19) หรือที่เกิดจากการย่อยสลายเนื้อปลาโดยแบคทีเรีย ในตัวอย่างอายุการหมัก 2 เดือน ตัวอย่างใสขึ้น เนื่องจากเนื้อปลามีขนาดเล็กลงเกิดการตกตะกอนของเศษเนื้อและก้างปลา โปรตีนโมเลกุลใหญ่ถูกย่อยให้มีโมเลกุลเล็กลงจนสามารถละลายได้ในสารละลาย ส่วนกลิ่น

ยังคงเหม็นคาวแต่น้อยกว่าในตัวอย่างอายุการหมัก 1 เดือน สีเริ่มเป็นสีเหลือง ซึ่งเกิดจากผลของปฏิกิริยาเคมีที่เรียกว่า non-enzyme browning reaction (50) ซึ่งเมื่อเกิดปฏิกิริยานี้มากขึ้น สีของตัวอย่างจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในที่สุด ในตัวอย่างอายุการหมัก 3 เดือน สีเป็นสีน้ำตาลมากขึ้น ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาเคมีดังกล่าวแล้ว กลิ่นคาวเริ่มลดน้อยลงเนื่องจากสารประกอบไนโตรเจนและสารที่ระเหยได้อื่น ๆ ถูกย่อยสลายให้มีโมเลกุลเล็กลงหรือถูกเปลี่ยนไปเป็นสารชนิดอื่น โดยปฏิกิริยาเคมีและกิจกรรมของจุลินทรีย์ แต่กลับพบกลิ่นเหม็นหืนของไขมันมากขึ้น ซึ่งสันนิษฐานว่าเมื่อเนื้อปลาถูกย่อยสลายให้มีขนาดเล็กลง ไขมันและกรดไขมันในปลาส่วนที่ไม่ละลายในน้ำจะแขวนลอยอยู่ในสารละลายและลอยอยู่ที่ผิวของสารละลาย ซึ่งเมื่อไขมันและกรดไขมันที่ลอยอยู่ที่ผิวโดยเฉพาะชนิดที่ไม่อิ่มตัว ทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) เกิดเป็นเปอร์ออกไซด์ซึ่งเมื่อสลายตัวต่อไป จะได้ fatty aldehyde และ hydroxy fatty acid ทำให้เกิดการเหม็นหืน (rancidity) (80) ในตัวอย่างน้ำปลาอายุการหมัก 4 เดือน ตัวอย่างมีสีน้ำตาลเข้มขึ้น อธิบายโดยหลักการเช่นเดียวกับในตัวอย่างอายุการหมัก 3 เดือนและยังคงมีกลิ่นเหม็นหืนอยู่ ในตัวอย่างที่ 5 สีของตัวอย่างเป็นสีน้ำตาลและมีลักษณะใสใกล้เคียงกับสีของน้ำปลาที่ผลิตขายเป็นการค้า เริ่มมีกลิ่นคล้ายน้ำปลาเกิดขึ้น ซึ่งจากการสัมผัสโดยการดมกลิ่น สันนิษฐานว่าเป็นกลิ่นของกรดไขมันโมเลกุลเล็ก ๆ เช่น กรดอะซีติคและกรดโปรปิโอนิค ที่เกิดจากการย่อยสลายไขมันในตัวปลาโดยเอนไซม์ไลเปสจากตัวปลาและจุลินทรีย์ในถังหมัก ส่วนกลิ่นเหม็นหืนน้อยลง เนื่องจาก fatty aldehyde และ hydroxy fatty acid ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นหืนถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดไขมันที่ระเหยได้ในที่สุด สาเหตุที่ได้กลิ่นของน้ำปลาในตัวอย่างที่ 5 ซึ่งมีอายุการหมัก 6 เดือน อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์กลุ่มที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเกิดกลิ่นของน้ำปลามีการเจริญในถังหมักได้ค่อนข้างช้า หรือสภาพแวดล้อมในช่วงต้น ๆ ของการหมักยังไม่เหมาะแก่การทำงานของเอนไซม์หรือกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง นอกจากกลิ่นของกรดไขมันแล้วยังมีกลิ่นคล้ายแอมโมเนียผสมอยู่ด้วย ส่วนในตัวอย่างที่ 6 ซึ่งมีอายุการหมัก 13 เดือน พบว่าตัวอย่างมีสีน้ำตาลเข้ม ลักษณะใสและมีกลิ่นเหมือนน้ำปลาที่ผลิตขายเป็นการค้า จากการดมกลิ่นพบกลิ่นของกรดไขันเช่นเดียวกับในตัวอย่างอายุการหมัก 6 เดือน แต่กลิ่นของแอมโมเนียลดลง นอกจากนี้ยังมีกลิ่นหอมของน้ำปลาที่คล้ายกับกลิ่นเนื้อ ซึ่งอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ละลายอยู่ในน้ำปลา

จากตารางที่ 14 พบว่าน้ำปลาทั้ง 6 ตัวอย่างมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 5.23 ถึง 5.62 และมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์อยู่ระหว่าง 25.73 ถึง 28.12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าเป็นไปตามมาตรฐานของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม โดยน้ำปลาชั้นคุณภาพที่ 1 ควรมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 5 ถึง 6 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ไม่น้อยกว่า 23 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนมี

แนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นตามอายุการหมัก โดยปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนจะได้ตามมาตรฐานซึ่งไม่น้อยกว่า 20 กรัมต่อลิตร และ 10 กรัมต่อลิตรในอายุการหมักที่ 6 และ 3 เดือนตามลำดับ

จากตารางที่ 15 แสดงปริมาณของแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำปลาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 1.03×10^3 ถึง 2.34×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 25 เปอร์เซ็นต์มีค่าอยู่ระหว่าง 4.60×10^3 ถึง 4.50×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะพบว่าแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบเค็มสูง จะมีจำนวนมากกว่าแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียที่ชอบเค็มปานกลาง เพราะว่าแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักน้ำปลาเป็นแบคทีเรียซึ่งเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือผสมอยู่ในปริมาณมาก แต่ที่จำนวนของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ไม่แตกต่างกันมากเนื่องจากอาจมีแบคทีเรียที่ชอบเค็มสูงบางชนิดสามารถเจริญได้ในทั้ง 2 ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ส่วนในตัวอย่างอายุการหมัก 13 เดือน พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียทีชอบเค็มปานกลางมากกว่าแบคทีเรียที่ชอบเค็มสูง อาจเป็นเพราะสารอาหารสำหรับการเจริญของแบคทีเรียในน้ำปลาลดน้อยลง และสภาพแวดล้อมในการเจริญไม่เหมาะสม จึงทำให้แบคทีเรียที่ชอบเค็มสูงบางชนิดลดจำนวนลง ส่วนแบคทีเรียทนเค็ม และแบคทีเรียที่ชอบเค็มปานกลางยังคงทนอยู่ในสภาพดังกล่าวได้ เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่โดยเฉพาะ Bacillus sp. จะสามารถอยู่ในรูปของสปอร์ซึ่งทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้เป็นเวลานาน แต่จากผลที่ได้เราไม่สามารถเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียในน้ำปลาแต่ละอายุการหมักได้ เนื่องจากตัวอย่างน้ำปลามาจากถังหมักน้ำปลาต่างถังกัน นอกจากนี้ชนิดของปลา อัตราส่วนของปลาแต่ละชนิดและแหล่งที่มาของปลาแตกต่างกัน ทำให้ปริมาณของแบคทีเรียตั้งต้นมีความแตกต่างกันทั้งชนิดและจำนวน นอกจากนี้แบคทีเรียที่มีอยู่เดิมในถังหมัก ปริมาณของเกลือที่ใช้ และสภาพของการหมักทั้งกลางแจ้งและในที่ร่ม อาจมีอิทธิพลต่อชนิดและจำนวนของแแบคทีเรียในถังหมักด้วย ในการทดลองนี้เลือกใช้อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เพราะว่าเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของกลุ่ม mesophilic bacteria และของพวก halophilic bacteria (33) และเนื่องจากน้ำปลารวมทั้งในกระบวนการหมักน้ำปลามีเกลือผสมอยู่ในปริมาณมาก ดังนั้นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องจึงต้องสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเกลือผสมอยู่ในปริมาณมากเช่นกัน ด้วยเหตุผลดังกล่าว ในการทดลองนี้จึงคัดแยกแบคทีเรียเฉพาะจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือผสมอยู่ 25 เปอร์เซ็นต์ เพื่อมุ่งเน้นคัดแยกเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียที่

ชอบเค็มสูง (extreme halophilic bacteria) เป็นสำคัญ

2.3 การจัดกลุ่มและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 แสดงจำนวนโคโลนีและกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำปลาอายุการหมักแตกต่างกันที่เจริญบน Tryptic soy yeast extract agar โดยมีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 25 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำและสภาวะปกติ เป็นเวลา 7 วัน

ตัวอย่าง	อายุการหมัก (เดือน)	จำนวนโคโลนีที่แยกได้	กลุ่มที่เจริญได้ในทั้งสองสภาวะ (กลม, แกรมบวก)	กลุ่มที่เจริญได้เฉพาะภายใต้สภาวะที่ออกซิเจนต่ำ	
				ท่อนสั้น แกรมบวก	รูปร่างไม่แน่นอน แกรมลบ
1	1	28	6	16	6
2	2	29	7	17	5
3	3	14	3	9	2
4	4	13	4	7	2
5	6	20	8	8	4
6	13	10	2	6	2
	รวม	114	30	63	21

จากตารางที่ 16 พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำปลาทั้ง 6 ตัวอย่าง ได้ทั้งหมด 114 โคโลนี ซึ่งสามารถจัดแยกออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ 1) กลุ่มที่เจริญได้ทั้งภายใต้สภาวะปกติและสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ (facultative anaerobes) ซึ่งมีโคโลนีใส ขนาดเล็ก เจริญอยู่ที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก มีการจัดเรียงตัวอยู่เดี่ยว ๆ เป็นคู่ แต่ส่วนใหญ่อยู่ติดกันสี่เซลล์ เซลล์มีขนาดใหญ่ จากลักษณะและคุณสมบัติเฉพาะที่มีการเรียงตัวเป็นสี่เซลล์ เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติในหนังสือ

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (64) พบว่าลักษณะคล้ายแบคทีเรียในวงศ์ Micrococcaceae สกุล Pediococcus ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีการจัดเรียงตัวเป็นกลุ่ม 4 เซลล์ (tetrad) เป็นลักษณะสำคัญและบางชนิดเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเกลืออยู่ด้วยในปริมาณมาก โดยมีผู้เคยศึกษาพบ Pediococcus halophilus จากน้ำปลาและอาหารที่มีเกลือผสมอยู่ชนิดอื่น ๆ (18,30) แบคทีเรียในกลุ่มนี้คิดเป็น 26.31 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 2) กลุ่มที่เจริญได้เฉพาะภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ซึ่งมีรูปร่างท่อนสั้นติดสีแกรมบวก การจัดเรียงตัวมักอยู่เดี่ยว ๆ โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีขนาด 1-2 มิลลิเมตร สีขาว โปร่งแสง มีความหนืด ถ้าเจริญใต้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีรูปร่างกลมและเป็นรูปรี แบคทีเรียในกลุ่มนี้คิดเป็น 55.27 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 3) กลุ่มที่เจริญได้เฉพาะภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ซึ่งมีรูปร่างไม่แน่นอน ติดสีแกรมลบ มีการจัดเรียงตัวไม่แน่นอน โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีขนาด 0.5-1.0 มิลลิเมตร สีขาวเหลือง โปร่งแสง ถ้าเจริญใต้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อมักจะแผ่ใต้อาหารเลี้ยงเชื้อ จากลักษณะดังกล่าว เมื่อเทียบกับหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (64) สันนิษฐานว่าเป็นแบคทีเรียในวงศ์ Bacteroidaceae แบคทีเรียในกลุ่มนี้คิดเป็น 18.42 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด จะเห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มที่พบในอัตราส่วนที่มากคือกลุ่มที่เจริญได้เฉพาะภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ซึ่งมีรูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมบวก และยังพบในทุกระยะของการหมัก จึงเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้คงจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการใดกระบวนการหนึ่งของการหมักน้ำปลา

3. การทดสอบเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มกลุ่มที่เจริญได้เฉพาะภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ดี

3.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปส โดยดูจากบริเวณใสที่เกิดจากการย่อยกลีเซอรอลไตรบิวไทเรต (glycerol tributyrate) พบว่าแบคทีเรียชอบเค็มกลุ่มที่เจริญได้เฉพาะภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ซึ่งคัดแยกได้ 84 โคโลนี สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสย่อยกลีเซอรอลไตรบิวไทเรตได้ทั้งหมด จึงทำการคัดแยกโคโลนีที่ให้อัตราส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีมากที่สุดมาจากอายุการหมักละ 1 โคโลนี ยกเว้นในตัวอย่างที่ 5 ซึ่งมีอายุการหมัก 6 เดือน และเริ่มมีกลิ่นของน้ำปลาได้คัดเลือกมา 2 โคโลนี ซึ่งอัตราส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ดังแสดงในตารางที่ 17

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบความสามารถของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในการสร้างเอนไซม์ไลเปส โดยแสดงถึงอัตราส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของแบคทีเรียในสภาวะที่มีเกลืออยู่ด้วย 15 และ 25 เปอร์เซ็นต์

อายุการหมัก (เดือน)	แบคทีเรียหมายเลข	อัตราส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี	
		15% โซเดียมคลอไรด์	25% โซเดียมคลอไรด์
1	1-6	2.46	2.25
2	2-1	2.32	1.80
3	3-9	2.11	1.73
4	4-8	2.27	2.15
6	6-3	2.25	1.95
6	6-5	2.34	2.01
13	13-6	2.57	2.16

จากตารางที่ 17 พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จะให้อัตราส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีแบคทีเรียในสภาวะที่มีเกลือผสมอยู่ 15 เปอร์เซ็นต์มากกว่าที่ 25 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าความเข้มข้นของเกลือสูง อาจมีผลต่อการสร้างและการทำงานของเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย แต่ในการทดลองขั้นตอนต่อไปเลือกใช้สภาวะที่มีเกลือผสมอยู่ 25 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากความเป็นจริงในกระบวนการหมักน้ำปลาจำเป็นต้องมีการเติมเกลือลงไปอย่างน้อย 25 เปอร์เซ็นต์ เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่ทำให้เกิดการเน่าเสียและในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา ของเหลวในถังหมักก็มีเกลือละลายอยู่ในปริมาณสูงเช่นกัน จากผลของเกลือต่อการทำงานและการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย ซึ่งมีผลทำให้ไขมันถูกเปลี่ยนเป็นกรดไขมันที่ระเหยได้ อันเป็นส่วนประกอบชนิดหนึ่งของกลิ่นน้ำปลาช้าลง จึงทำให้กระบวนการหมักน้ำปลาตามธรรมชาติ ต้องใช้ระยะเวลานานเนื่องจากขาดกลิ่นที่ดีของน้ำปลา ถึงแม้จะมีปริมาณของสารประกอบไนโตรเจนและลักษณะอื่น ๆ ได้ตรงตามมาตรฐานที่กำหนดไว้แล้ว

3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ซึ่งผลได้แสดงไว้ในตารางที่ 18 และตารางที่ 19

ตารางที่ 18 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เปรียบเทียบกับ *Clostridium paraperfringens*

วิธีการทดสอบ	หมายเลขแบคทีเรียที่คัดเลือกได้							*Cl. paraperfringens*
	1-6	2-1	3-9	4-8	6-3	6-5	13-6	
1. ลักษณะโคโลนี								
รูปร่าง	กลม ขอบเรียบ	กลม ขอบเรียบ	กลม ขอบเรียบ	กลม ขอบเรียบ	กลม ขอบเรียบ	กลม ขอบเรียบ	กลม ขอบเรียบ	กลม ขอบเรียบ
ขนาด(มิลลิเมตร)	1.0-1.2	1.0-1.2	0.5-1.0	1.0-1.2	1.0-1.2	1.0-1.2	1.0-1.2	0.5-1.0
สี	ขาวเหลือง โปร่งแสง	ขาวเหลือง โปร่งแสง	ขาวเหลือง โปร่งแสง	ขาวเหลือง โปร่งแสง	ขาวเหลือง โปร่งแสง	ขาวเหลือง โปร่งแสง	ขาวเหลือง โปร่งแสง	ขาวเหลือง โปร่งแสง
2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา								
รูปร่าง	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน
การติดสีแกรม	+	+	+	+	+	+	+	+
สปอร์	+	+	+	+	+	+	+	+
การเคลื่อนที่	-	-	-	-	-	-	-	-
3. ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี								
เอนไซม์คาตาเลส	-	-	-	-	-	-	-	-
เอนไซม์ออกซิเดส	-	-	-	-	-	-	-	-
เอนไซม์ธีเอส	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	-
การรีดิวซ์ไนเตรต	+	+	-	+	+	+	+	d
การสร้างอินโดล	+	+	+	+	+	+	+	-
การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์	+	+	+	+	+	+	+	+
MR-VP	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่เจริญ	ไม่มีรายงานผลการทดสอบ
การย่อยแป้ง	+	+	-	+	+	+	+	+

ตารางที่ 18 (ต่อ)

วิธีการทดสอบ	หมายเลขแบคทีเรียที่คัดเลือกได้							Cl. paraperfringens
	1-6	2-1	3-9	4-8	6-3	6-5	13-6	
การย่อยเจลลาตินที่ 15 และ 25 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์	-	-	-	-	-	-	-	-
การย่อยโปรตีนที่ 15 และ 25 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์	-	-	-	-	-	-	-	-
4. การเจริญในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ กัน								ไม่มีรายงานผลการทดสอบขั้นตอนนี้
0.5 เปอร์เซ็นต์	-	-	-	-	-	-	-	
5.0 เปอร์เซ็นต์	-	-	-	-	-	-	-	
10.0 เปอร์เซ็นต์	-	-	-	-	-	-	-	
15.0 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+	+	+	+	
20.0 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+	+	+	+	
29.0 เปอร์เซ็นต์	+	+	+	+	+	+	+	

+ หมายถึง ให้ผลบวกในการทดสอบ
- หมายถึง ให้ผลลบในการทดสอบ
d หมายถึง สายพันธุ์ส่วนใหญ่ให้ผลบวก แต่มีบางสายพันธุ์ให้ผลลบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 แสดงความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เปรียบเทียบกับ Clostridium paraperfringens

ชนิดของคาร์โบไฮเดรต	หมายเลขแบคทีเรียที่คัดเลือกได้							Cl. paraperfringens
	1-6	2-1	3-9	4-8	6-3	6-5	13-6	
กลูโคส	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+
ฟรุคโตส	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+
กาแลคโตส	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+
ซูโครส	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+
มอลโตส	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+
แลคโตส	+(G)	+(G)	-(-)	+(G)	+(G)	+(G)	-(-)	+
อราบิโนส	+(G)	+(G)	-(-)	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	-
ไซโลส	+(G)	+(G)	+(-)	+(G)	+(G)	+(G)	+(-)	-
แมนนิทอล	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-
ราฟิโนส	+(G)	+(G)	-(-)	+(G)	+(-)	+(G)	+(-)	-
แมนโนส	+(G)	+(G)	+(-)	+(G)	+(G)	+(G)	+(G)	+
ไรโบส	+(-)	+(-)	-(-)	+(-)	+(-)	+(-)	+(-)	d
ซอร์บิตอล	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-
ดุโอซิตอล	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-

\+ หมายถึง สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตแล้วสร้างกรด

\- หมายถึง ไม่สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้จึงไม่สร้างกรด

+(G) หมายถึง สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตแล้วสร้างกรดและกาซ

+(-) หมายถึง สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตแล้วสร้างกรด แต่ไม่สร้างกาซ

-(-) หมายถึง ไม่สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้ จึงไม่สร้างกรดและกาซ

d หมายถึง สายพันธุ์ส่วนใหญ่ใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดนั้นแล้วให้กรด แต่มีบางสายพันธุ์ที่ไม่ให้ผลบวก

จากตารางที่ 18 โคโลนีที่นำมาตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาพบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมด มีรูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมบวกและพบมีการสร้างสปอร์แบบ sub-terminal ทำให้สันนิษฐานตามหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (64) ได้ว่าอาจเป็นแบคทีเรียในกลุ่มรูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมบวกและสร้างสปอร์ในสกุล Clostridium ในวงศ์ Bacillaceae ซึ่งได้มีผู้เคยศึกษาพบแบคทีเรียสกุลนี้ในน้ำปลาของเวียดนาม แต่ไม่ได้ให้รายละเอียดของการศึกษาดังกล่าว (11) เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยดูจากการย่อยเจลลาติน สามารถจัดไว้ในกลุ่มที่มีสปอร์เป็นแบบ sub-terminal ที่ไม่ย่อยเจลลาติน จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีอื่น ๆ ในตารางที่ 18 พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ให้ผลเหมือนกัน ยกเว้นแบคทีเรียหมายเลข 3-9 ที่ให้ผลต่างจากแบคทีเรียหมายเลขอื่น คือไม่สามารถย่อยแป้งและรีดิวส์ไนเตรตได้ แต่แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือผสมอยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปจนถึงประมาณ 29 เปอร์เซ็นต์ และจะไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือผสมอยู่น้อยกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดมาทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ ตามตารางที่ 19 เพื่อจัดจำแนกชนิดพบว่า แบคทีเรียหมายเลข 1-6, 2-1, 4-8, 6-3, 6-5 และ 13-6 ให้ผลการทดสอบใกล้เคียงกันเป็นส่วนใหญ่ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับชนิดของ Clostridium ในกลุ่มที่มีสปอร์เป็นแบบ sub-terminal และไม่ย่อยเจลลาติน พบว่าไม่ตรงกับชนิดใดเลย เพียงแต่ให้ผลการทดสอบใกล้เคียงกับ Clostridium paraperfringens มากกว่าชนิดอื่น ๆ ส่วนแบคทีเรียหมายเลข 3-9 พบว่าให้ผลการทดสอบที่ไม่สอดคล้องกับชนิดใดใน Clostridium กลุ่มนี้เลย สาเหตุที่ทำให้ไม่สามารถจัดจำแนกชนิดที่แน่นอนของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่มีเกลืออยู่สูงมาก จึงทำให้มีการผันแปรของพันธุกรรมและลักษณะต่าง ๆ หรือการทดสอบต่าง ๆ ต้องทำในอาหารที่มีเกลืออยู่สูง เนื่องจากไม่สามารถทำในสภาวะที่มีเกลือต่ำกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ได้ จึงทำให้ปฏิกริยาบางปฏิกริยาไม่เกิดขึ้นหรือเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์เป็นปัจจัยทำให้การแปรผลไม่ถูกต้อง

จากคุณสมบัติของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ดังที่กล่าวมาแล้ว จึงน่าจะนำแบคทีเรียดังกล่าวมาศึกษาความสามารถในการสร้างกรดไขมันที่ระเหยได้ ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการผลิตน้ำปลาเนื่องจาก 1) แบคทีเรียที่คัดเลือกได้เป็นแบคทีเรียชอบเค็ม (halophilic bacteria) เนื่องจากเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเกลือผสมอยู่ 15 เปอร์เซ็นต์จนถึง 29 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นเปอร์เซ็นต์เกลือที่ใกล้เคียงกับของน้ำปลาและยังสามารถเจริญได้ในช่วงของเปอร์เซ็นต์เกลือที่กว้าง ทำให้ไม่เป็นอุปสรรคในการเจริญของแบคทีเรียนี้ในถังหมักที่มีการคลุกปลาและเกลือไม่ทั่วถึง 2) เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ซึ่งเป็นสภาพของถังหมัก เนื่องจากในถังหมักมีการทับถมของปลาและเกลือ มีสารละลายของเกลือที่ทำให้ออกซิเจนละลายอยู่ได้น้อย ที่ผิวหน้าของถังหมักยัง

มีเกลือและเศษปลาลอยปิดผิวหน้าป้องกันการละลายของออกซิเจนจากอากาศลงไป ดังนั้น ภายในถังหมักจึงมีสภาพเป็น anaerobes ทำให้แบคทีเรียชอบเค็มส่วนใหญ่โดยเฉพาะกลุ่มที่มีสีแดงหรือสีชมพู ซึ่งต้องการออกซิเจนในการเจริญไม่สามารถเจริญได้ 3) สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสย่อยไขมันที่เป็นไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเป็นไขมันส่วนใหญ่ในปลาได้ในสภาวะที่มีเกลืออยู่สูงถึง 25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นลักษณะที่จำเพาะเนื่องจากเอนไซม์ต่าง ๆ มักจะถูกยับยั้งการทำงานในสภาวะที่มีเกลืออยู่สูง 4) เป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ ทำให้สามารถทนอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้เป็นเวลานาน เช่น ตามถังหมักในช่วงเวลาพักการหมัก ในน้ำทะเล ในเกลือ เป็นต้น 5) เป็นแบคทีเรียที่ไม่สร้างสารพิษ (toxin) และไม่ทำให้เกิดโรค (non-pathogenic) โดยดูจากการที่แบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่สร้างเอนไซม์ย่อยเจลลาตินและโปรตีน ซึ่งการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวเป็นลักษณะสำคัญของแบคทีเรียพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญกลุ่มที่สร้างสารพิษและกลุ่มที่ทำให้เกิดโรค (64) 6) ในตัวอย่างน้ำปลาพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ในอัตราส่วนที่มากเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ จึงมีโอกาสเป็นไปได้มากว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักน้ำปลามากกว่าจะเป็นเพียงพวกที่ปนเปื้อนอยู่ภายในถังหมักเท่านั้น

4. การคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีส่วนประกอบของอาหารน้อยที่สุด (minimum medium) ซึ่งทำให้แบคทีเรียที่คัดเลือกได้สามารถเจริญได้ดี

ในการทดลองใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ ที่มีแหล่งสารอาหารอยู่ในรูปของสารประกอบอนินทรีย์ชนิดต่าง ๆ อาหารเลี้ยงเชื้อ medium-73 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวของ Dundas และ basal salt medium ที่มีกลูโคส กลีเซอลีน กลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอน และมีสารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้สามารถเจริญได้เฉพาะใน basal salt medium ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและมีทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งผลการทดลองได้แสดงในตารางที่ 20 ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีส่วนประกอบน้อยที่สุดที่จะใช้ในขั้นตอนต่อไป จึงมีส่วนประกอบในสารละลาย 1 ลิตร คือ ทริปโตน 15.0 กรัม กลูโคส 2.5 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 250.0 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.0 กรัม โปตัสเซียมคลอไรด์ 0.75 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ 0.2 กรัม เป็นที่น่าสังเกตว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่นำมาทดสอบ เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผู้เคยทำการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มมาแล้ว แต่เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่มีสีแดง (red halophilic bacteria) และแบคทีเรียในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ และยังมีผู้รายงานต่อไปอีกว่าไม่ค่อยพบแบคทีเรียชอบเค็มที่เป็นพวกไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (33) จึงอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียชอบเค็มกลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญดังเช่นที่คัดเลือกได้มีความจำเพาะในการใช้แหล่งของสารอาหาร คือ ไม่สามารถใช้สารประกอบอนินทรีย์ เช่น เกลือแอมโมเนียม เกลือไนเตรต

ตารางที่ 20 แสดงผลการคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของอาหารน้อยที่สุด ซึ่งทำให้แบคทีเรียที่คัดเลือกได้สามารถเจริญได้ดี เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ	หมายเลขแบคทีเรียที่คัดเลือกได้						
	1-6	2-1	3-9	4-8	6-3	6-5	13-6
อาหารเลี้ยงเชื้อของ Vreeland และ Martin	-	-	-	-	-	-	-
อาหารเลี้ยงเชื้อของ Vreeland และคณะ	-	-	-	-	-	-	-
อาหารเลี้ยงเชื้อของ Dundas และคณะ	-	-	-	-	-	-	-
อาหารเลี้ยงเชื้อ Medium-73	-	-	-	-	-	-	-
Basal salt medium + กลูโคส + NH_4Cl	-	-	-	-	-	-	-
Basal salt medium + กลูโคส + $(NH_4)_2SO_4$	-	-	-	-	-	-	-
Basal salt medium + กลูโคส + NH_4Cl + KNO_3	-	-	-	-	-	-	-
Basal salt medium + กลูโคส + $(NH_4)_2SO_4$ + KNO_3	-	-	-	-	-	-	-
Basal salt medium + กลูโคส + ผงสกัดจากยีสต์	-	-	-	-	-	-	-
Basal salt medium + กลูโคส + เคซีนไฮโดรไลซิส	-	-	-	-	-	-	-
Basal salt medium + กลูโคส + แคสอะมิโนแอซิด	-	-	-	-	-	-	-
Basal salt medium + กลูโคส + เปปโตน	-	-	-	-	-	-	-
Basal salt medium + กลูโคส + ทริปโตน	G	G	G	G	G	G	G
Basal salt medium + กลีเซอลีน + ทริปโตน	-	-	-	-	-	-	-
Basal salt medium + กลีเซอรอล + ทริปโตน	-	-	-	-	-	-	-

G หมายถึง แบคทีเรียสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้นได้ โดยสังเกตจากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

- หมายถึง ไม่สังเกตพบการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รวมถึงสารประกอบอินทรีย์บางชนิด เช่น เปปโตน และผงสกัดจากยีสต์ ซึ่งอาจเนื่องมาจากสภาวะในการเจริญเป็นสภาวะที่จำเพาะ คือ มีโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณมากและยังเป็นการเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ดังนั้นจึงต้องมีสารอินทรีย์ที่จำเพาะเป็นตัวรับอิเลคตรอนในกระบวนการสร้างพลังงานของเซลล์

5. การศึกษาชนิดของกรดไขมันที่ระเหยได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไขมันจากปลาไส้ตันเป็นสารตั้งต้น พบว่า

5.1 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อชุดที่มีและไม่มีไขมันจากปลาไส้ตันผสมอยู่ โดยหลังจากเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีส่วนประกอบน้อยที่สุดที่มีและไม่มีไขมันจากปลาไส้ตันผสมอยู่ จนครบ 14 วัน แล้วนำไปวัดค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละขวด เพื่อเป็นการตรวจสอบขั้นต้นถึงกรดไขมันที่เกิดจากการย่อยสลายไขมันจากปลาไส้ตัน ซึ่งพบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 แสดงค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมและไม่เติมไขมันจากปลาไส้ตัน หลังจากเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ภายใต้สภาวะที่มีออกเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน

แบคทีเรียหมายเลข	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	
	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมไขมัน	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมไขมัน
ชุดควบคุม (ไม่ได้ใส่เชื้อ)	6.49	6.47
1-6	5.95	4.61
2-1	6.02	4.86
3-9	6.11	5.06
4-8	5.95	4.80
6-3	5.94	4.84
6-5	5.98	4.86
13-6	5.92	4.76

จากตารางที่ 21 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมและไม่เติมไขมันจากปลาไส้ตัน พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมไขมันจากปลาไส้ตันมีค่าความเป็น

กรดด่างสูงกว่าที่เติมไขมันจากปลาไส้ตันในทุกชุดการทดลอง แต่มีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม (control) นั้น อาจเป็นผลจากการใช้สารประกอบที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ก็เป็นปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แสดงว่ากรดส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นในการทดลองนี้ไม่ได้เกิดจากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว โดยพบว่า ค่าเฉลี่ยของความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมไขมันมีค่าเท่ากับ 5.98 ส่วนชุดที่เติมไขมันจากปลาไส้ตันมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.82 ค่าเฉลี่ยต่างกันประมาณ 1.16 ค่าความเป็นกรดด่างที่ลดลงนี้เกิดจากกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงของสารอินทรีย์โดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ เมื่อดมกลิ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อชุดที่เติมไขมันจากปลาไส้ตันหลังจากเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ พบกลิ่นของกรดแสดงว่า กรดอินทรีย์ดังกล่าวส่วนใหญ่เป็นกรดที่ระเหยได้ โดยกรดอินทรีย์หรือกรดไขมันที่ระเหยได้ที่พบได้ทั่วไปเช่น กรดอะซีติก กรดโปรปิโอนิค กรดไอโซบิวไทริค กรดบิวไทริค และกรดไอโซวาเลอริค ซึ่งกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในการทดลองนี้ ส่วนใหญ่น่าจะเกิดจาก การย่อยสลายไดรกลีเซอไรด์อันเป็นส่วนประกอบสำคัญในไขมันของปลาไส้ตันที่เติมลงไป โดยเอนไซม์ไลเปสที่สร้างจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทำให้เกิดเป็นกรดไขมันอิสระที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันโดยเฉพาะกลุ่มที่มีโมเลกุลขนาดเล็กพวกกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ส่วนกรดไขมันอิสระโมเลกุลขนาดใหญ่ที่เกิดขึ้นจะถูกใช้ไปในกิจกรรมของเซลล์แบคทีเรียดังกล่าวจนได้เป็นกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ซึ่งมักเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย โดยกระบวนการหลังนี้จะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีกรดไขมันอิสระ ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไลเปสย่อยสลายไดรกลีเซอไรด์ในกระบวนการแรกเสียก่อน ดังนั้นกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งมีผู้เคยศึกษาพบว่าเป็นองค์ประกอบสำคัญในกลิ่นของน้ำปลา (52) ที่เกิดขึ้นในการทดลองนี้จึงน่าจะมาจากกระบวนการย่อยสลายไขมันของปลาไส้ตันที่เติมลงไป และผลจากการใช้กรดไขมันอิสระที่มีโมเลกุลใหญ่ที่เกิดจากกระบวนการแรก โดยชนิดของกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นได้ทำการศึกษาในการทดลองต่อไปโดยใช้เครื่องกาซโครมาโตกราฟี ส่วนที่ค่าความเป็นกรดด่างไม่อยู่ในช่วงค่าเฉลี่ยของน้ำปลานั้น เพราะว่าในน้ำปลามีสารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์ชนิดอื่น ๆ อีกมากนอกจากกรดไขมัน ซึ่งสารดังกล่าวอาจมีคุณสมบัติเป็นด่างหรือเป็นบัฟเฟอร์ นอกจากนี้กรดไขมันยังมีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน การแตกตัวต่ำจึงทำให้น้ำปลามีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 5.0 ถึง 6.0

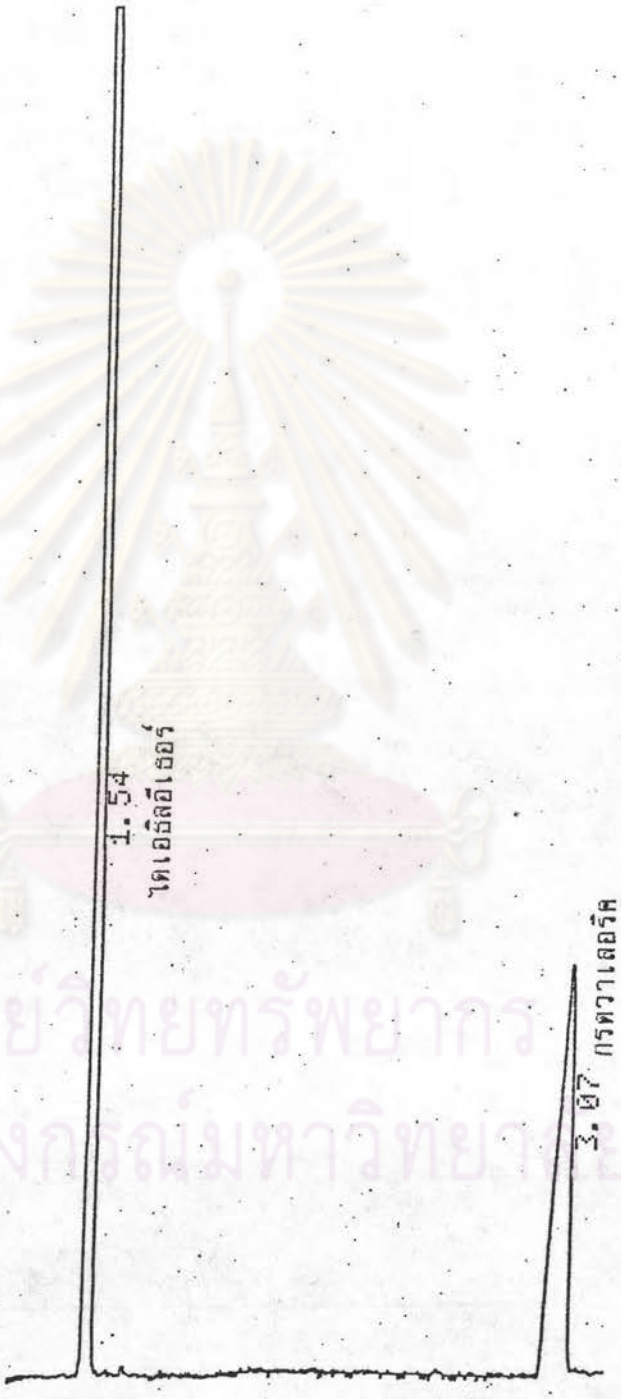
5.2 การศึกษาชนิดของกรดไขมันที่ระเหยได้ ซึ่งสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมไขมันจากปลาไส้ตันและชุดควบคุม โดยใช้เครื่องกาซโครมาโตกราฟี ได้โครมาโตแกรมดังแสดงในรูปที่ 4 ถึง 11

5.3 การศึกษาชนิดของกรดไขมันที่ระเหยได้ ซึ่งสกัดจากน้ำปลาที่ผลิตเป็นการค้า 5 ตัวอย่างและได้รับเครื่องหมายรับรองของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม โดยใช้เครื่องกาซโครมาโตกราฟี ได้โครมาโตแกรมดังแสดงในรูปที่ 12 ถึง 16

จากโครมาโตแกรมในข้อ 5.2 และ 5.3 เมื่อเปรียบเทียบค่า retention time (RT) กับโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้มาตรฐาน ซึ่งผ่านกระบวนการสกัดและวิเคราะห์ด้วยเครื่องกาซโครมาโตกราฟีเช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อและตัวอย่างน้ำปลา สามารถสรุปชนิดของกรดไขมันที่ระเหยได้ ซึ่งสกัดจากอาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้และจากตัวอย่างน้ำปลา รวมทั้งยังสามารถใช้พื้นที่ใต้กราฟ (peak) แต่ละกราฟคำนวณหาอัตราส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันแต่ละชนิดในโครมาโตแกรมเดียวกันได้ดังแสดงในตารางที่ 22

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อแบคทีเรีย)



หมายเหตุ ตัวเลขแต่ละชุดแสดงค่า retention time กราฟ (peak) ที่ปรากฏแสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ในสารสกัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเติมแบคทีเรียหมายเลข 1–6 ที่คัดเลือกได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน

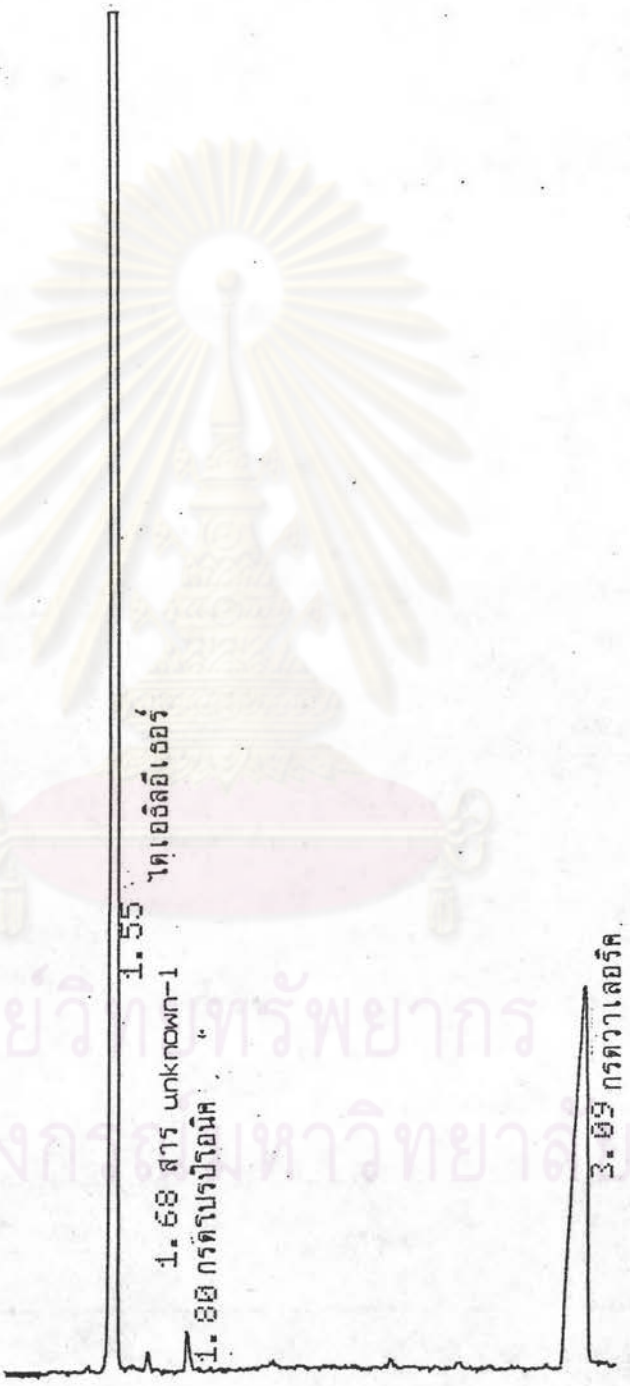
หมายเหตุ ตัวเลขแต่ละชุดแสดงค่า retention time กราฟ (peak) ที่ปรากฏแสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ในสารสกัด

รูปที่ 6 แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเติมแบคทีเรียหมายเลข 2-1 ที่คัดเลือกได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน

หมายเหตุ ตัวเลขแต่ละชุดแสดงค่า retention time กราฟ (peak) ที่ปรากฏแสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ในสารสกัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเติมแบคทีเรียหมายเลข 3-9 ที่คัดเลือกได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน



หมายเหตุ ตัวเลขแต่ละชุดแสดงค่า retention time กราฟ (peak) ที่ปรากฏแสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ในสารสกัด

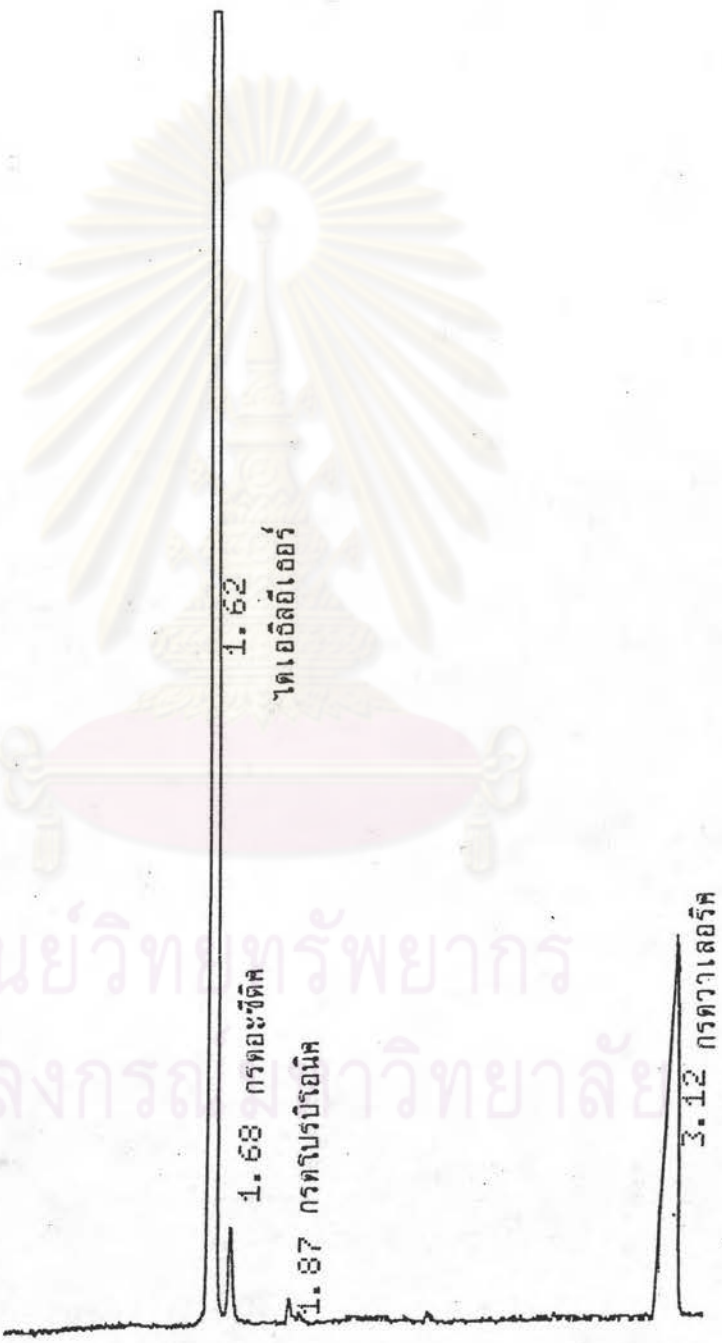
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเติมแบคทีเรียหมายเลข 4-8 ที่คัดเลือกได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน

หมายเหตุ ตัวเลขแต่ละชุดแสดงค่า retention time กราฟ (peak) ที่ปรากฏแสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ในสารสกัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

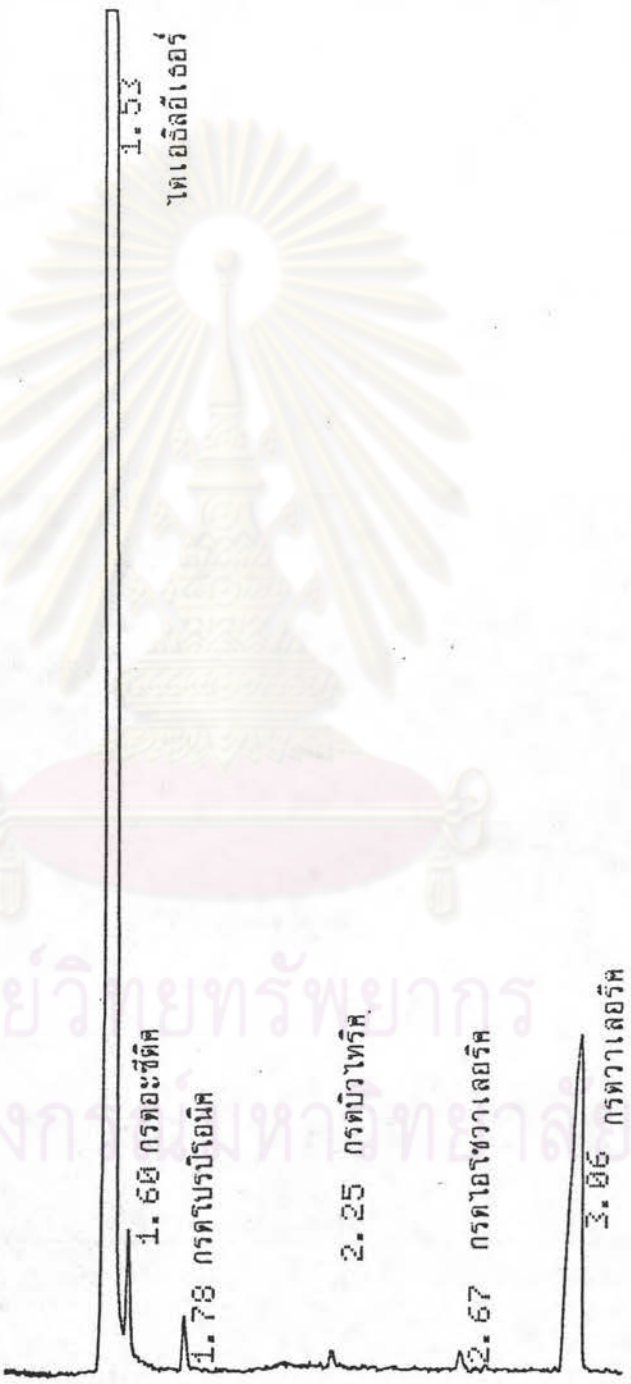
รูปที่ 9 แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเติมแบคทีเรียหมายเลข 6-3 ที่คัดเลือกได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน



หมายเหตุ ตัวเลขแต่ละชุดแสดงค่า retention time กราฟ (peak) ที่ปรากฏแสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ในสารสกัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

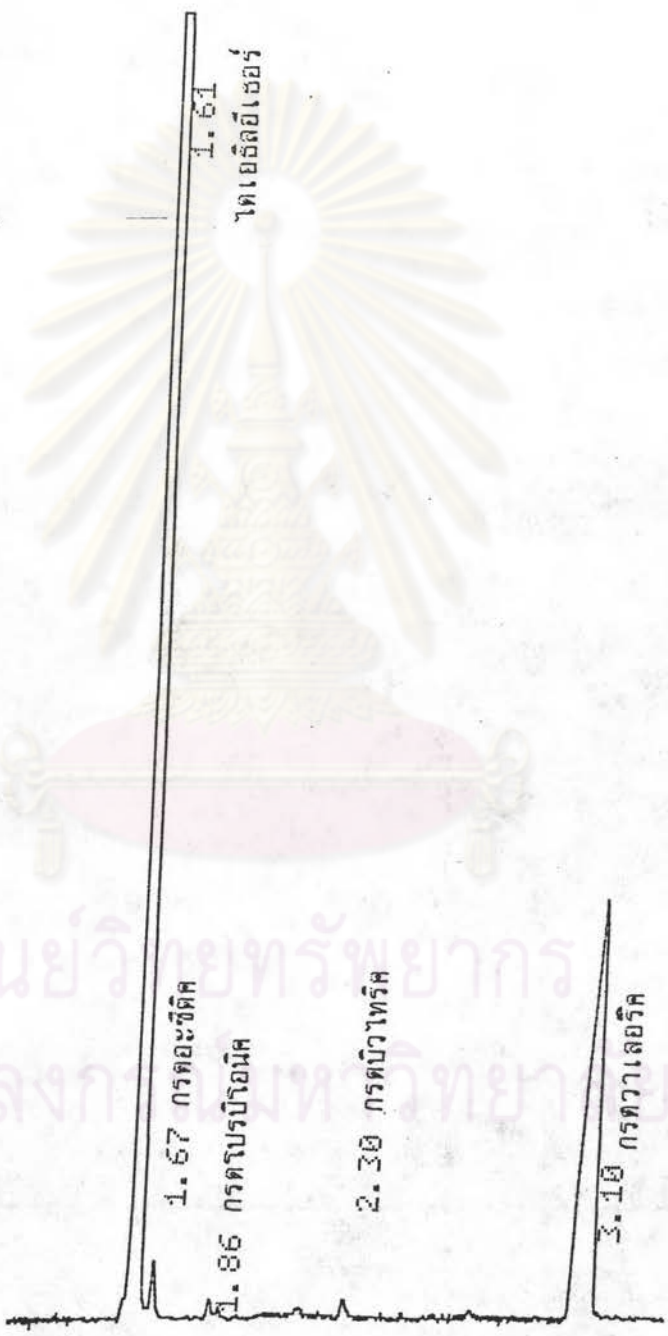
รูปที่ 10 แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเติมแบคทีเรียหมายเลข 6-5 ที่คัดเลือกได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน



หมายเหตุ ตัวเลขแต่ละชุดแสดงค่า retention time กราฟ (peak) ที่ปรากฏแสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ในสารสกัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

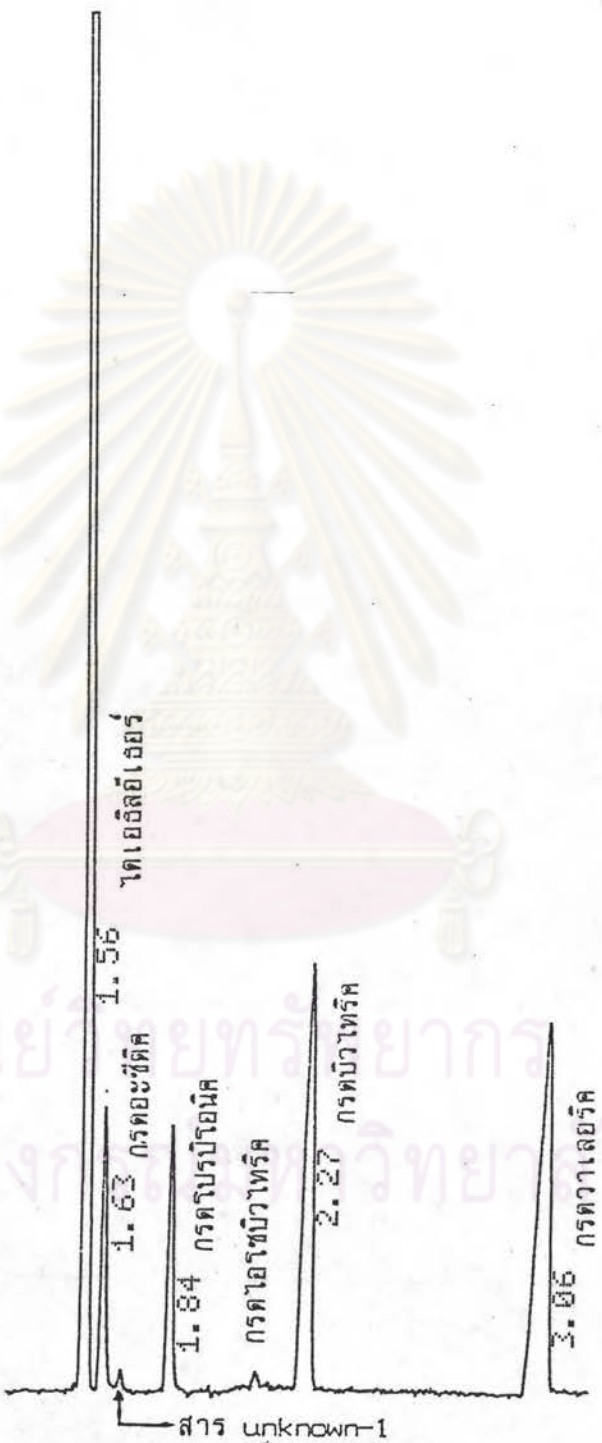
รูปที่ 11 แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเติมแบคทีเรียหมายเลข 13-6 ที่คัดเลือกได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน



หมายเหตุ ตัวเลขแต่ละชุดแสดงค่า retention time กราฟ (peak) ที่ปรากฏแสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ในสารสกัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 12 แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากน้ำปลาดราทิพรส

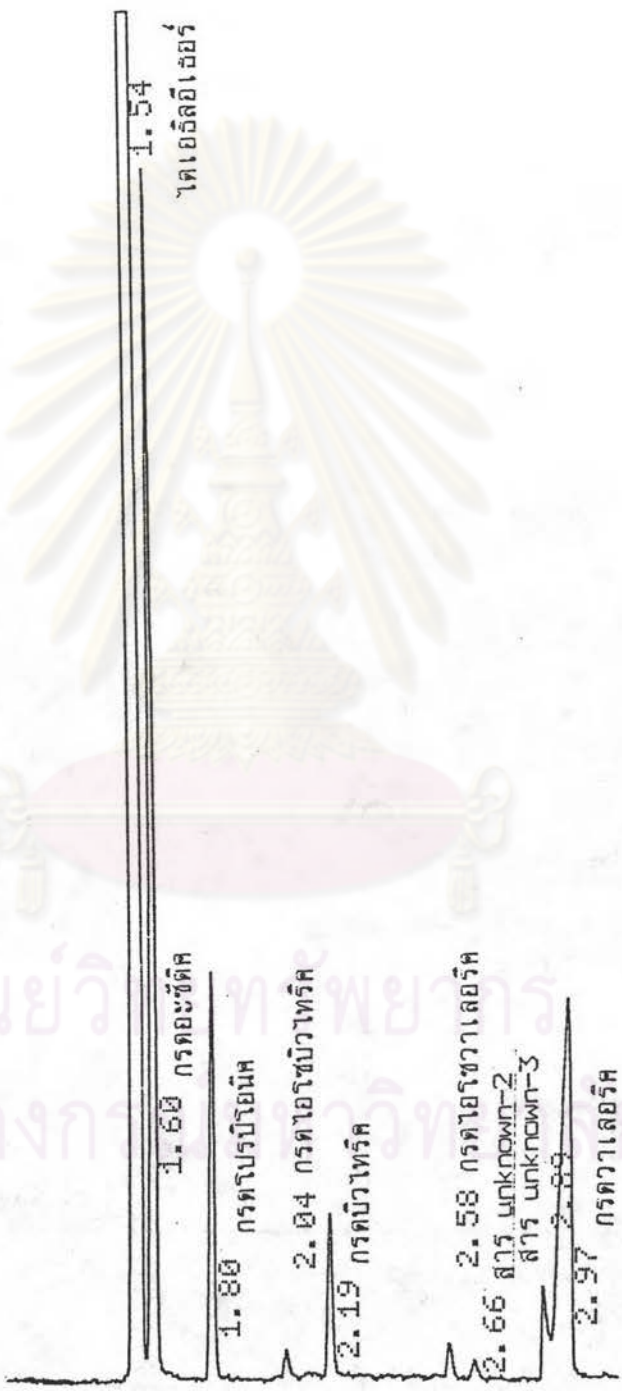


หมายเหตุ ตัวเลขแต่ละชุดแสดงค่า retention time กราฟ (peak) ที่ปรากฏแสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ในสารสกัด

รูปที่ 13 แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากน้ำปลาตราตราชู

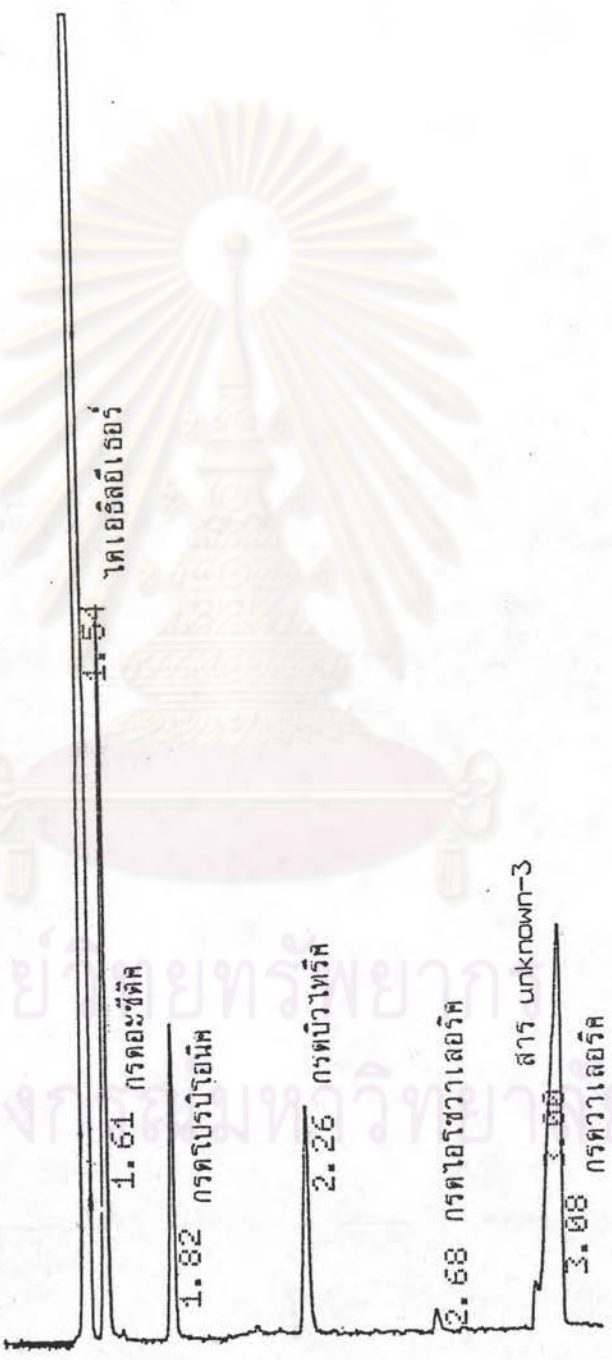
หมายเหตุ ตัวเลขแต่ละชุดแสดงค่า retention time กราฟ (peak) ที่ปรากฏแสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ในสารสกัด

รูปที่ 14 แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากน้ำปลาตราชุมพร



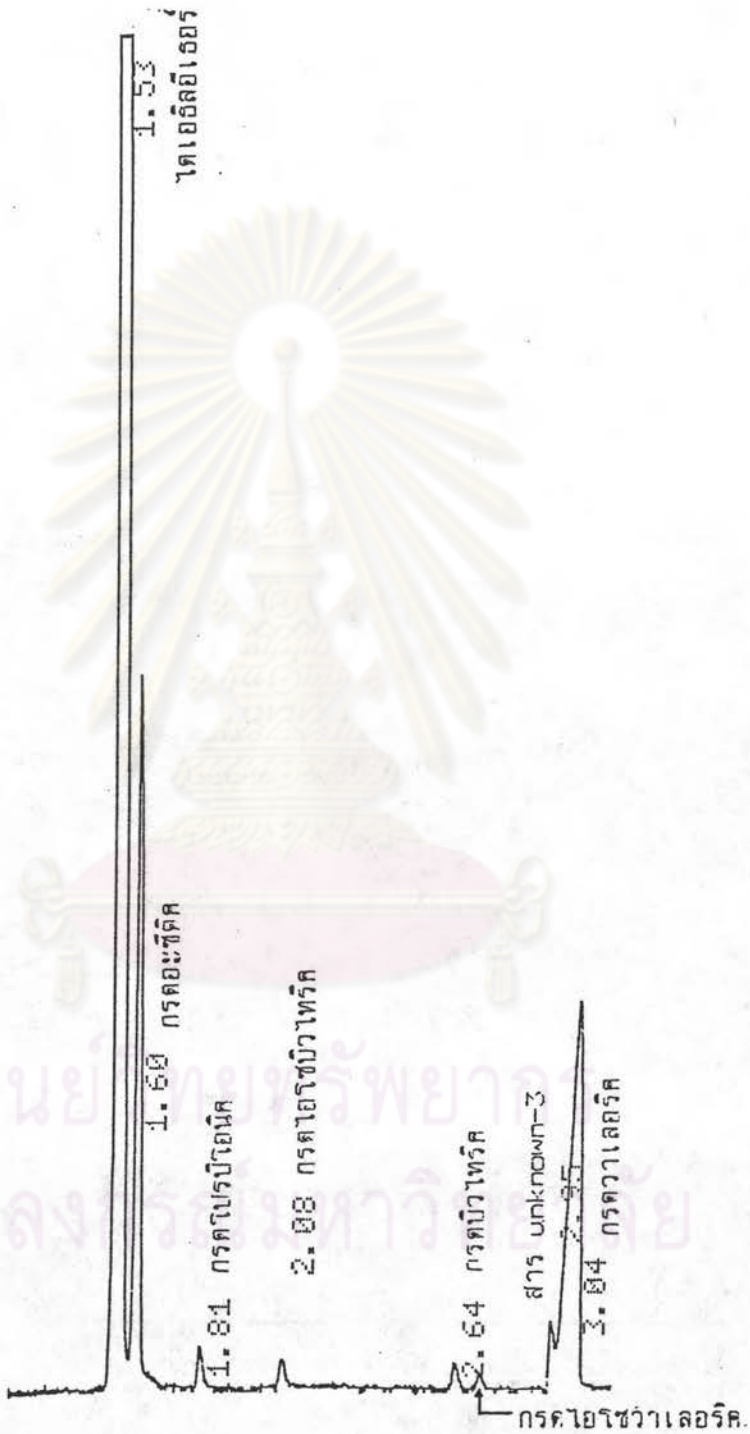
หมายเหตุ ตัวเลขแต่ละชุดแสดงค่า retention time กราฟ (peak) ที่ปรากฏแสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ในสารสกัด

รูปที่ 15 แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากน้ำปลาดราหอยนางรม



หมายเหตุ ตัวเลขแต่ละชุดแสดงค่า retention time กราฟ (peak) ที่ปรากฏแสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ในสารสกัด

รูปที่ 16 แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากน้ำปลาดรายอด



หมายเหตุ ตัวเลขแต่ละชุดแสดงค่า retention time กราฟ (peak) ที่ปรากฏ แสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ในสารสกัด

ตารางที่ 22 แสดงชนิดและอัตราส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันที่ระเหยได้แต่ละชนิดในแต่ละโครมาโตแกรมของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้และตัวอย่างน้ำปลาที่ผลิตเป็นการค้า

ชนิดของกรด	สารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อหมักด้วยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้								น้ำปลาที่ผลิตเป็นการค้าในประเทศไทย				
	ชุดควบคุม	1-6	2-1	3-9	4-8	6-3	6-5	13-6	ทิพรส	ตราชู	ชุมพร	หอยนางรม	ยอด
กรดอะซีติค	-	41.8	57.5	-	48.6	85.0	60.3	64.7	25.1	43.1	60.6	48.9	80.9
สาร unknown-1	-	trace	trace	52.2	trace	-	-	-	trace	-	-	-	-
กรดโปรปิโอนิค	-	48.3	42.4	47.7	42.3	14.9	21.3	11.0	22.3	21.5	20.7	23.8	4.4
กรดไอโซบิวไทริค	-	-	-	-	-	-	-	-	trace	2.0	1.3	-	3.0
กรดบิวไทริค	-	trace	trace	-	8.9	-	7.3	24.2	52.5	18.7	8.4	21.1	3.5
กรดไอโซวาเลอริค	-	9.8	-	-	-	-	11.0	-	-	7.1	1.9	1.9	trace
สาร unknown-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	-	-
สาร unknown-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.3	5.7	4.0	7.9

เครื่องหมาย - หมายถึง ผลการวิเคราะห์ตรวจไม่พบสารดังกล่าว

trace หมายถึง ผลการวิเคราะห์ไม่ได้แสดงค่า retention time และพื้นที่ใต้กราฟ แต่จากตำแหน่งของกราฟในโครมาโตแกรมสันนิษฐานได้ว่าเป็นสารดังกล่าว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากโครมาโตแกรมในรูปที่ 4 ถึง 16 และตารางที่ 22 พบว่าในชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จะไม่พบกรดไขมันที่ระเหยได้ นอกจากกรดวาเลอริคที่ใช้เป็น internal standard ส่วนแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จะสร้างทั้งกรดอะซีติคและกรดโปรปิโอนิค ยกเว้นแบคทีเรียหมายเลข 3-9 ที่สร้างเฉพาะกรดโปรปิโอนิค นอกจากกรดทั้งสองชนิดนี้แล้วยังพบกรดบิวไทริค ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียหมายเลข 1-6, 2-1, 4-8, 6-5 และ 13-6 กรดไอโซวาเลอริคซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียหมายเลข 1-6, 6-5 และยังพบสาร unknown-1 ที่มีค่า retention time อยู่ระหว่างกรดอะซีติคและกรดโปรปิโอนิค ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียหมายเลข 1-6, 2-1, 3-9, 4-8 ซึ่งพบสารดังกล่าวจากสารสกัดของน้ำปลาที่ผลิตเป็นการค้าดราทิพรสด้วย ไม่มีแบคทีเรียที่คัดเลือกได้หมายเลขใดสร้างกรดไอโซบิวไทริค ในกรณีของตัวอย่างน้ำปลาที่ผลิตเป็นการค้าที่ใช้ในการวิเคราะห์ทุกตัวอย่างจะพบกรดอะซีติค กรดโปรปิโอนิค กรดบิวไทริค กรดไอโซบิวไทริค (ยกเว้นน้ำปลาตราหอยนางรมไม่พบกรดนี้) กรดไอโซวาเลอริค (ยกเว้นน้ำปลาดราทิพรสซึ่งไม่พบกรดนี้) สาร unknown-3 ซึ่งมีค่า retention time อยู่ระหว่างกรดไอโซวาเลอริคและกรดวาเลอริคที่ใช้เป็น internal standard และมีกราฟ (peak) ใกล้กับ internal standard มาก (ยกเว้นน้ำปลาดราทิพรสซึ่งไม่พบสารดังกล่าว) นอกจากนี้ในน้ำปลาทิพรสยังพบสาร unknown-1 เช่นเดียวกับที่แบคทีเรียหมายเลข 1-6, 2-1, 3-9, 4-8 สร้างขึ้น และในน้ำปลาชุมพรยังพบสาร unknown-2 ซึ่งมีค่าretention time อยู่ระหว่างกรดไอโซวาเลอริคและสาร unknown-3 จากที่กล่าวมาจะพบว่าแบคทีเรียหมายเลข 1-6 และ 6-5 ให้ชนิดของกรดไขมันที่ระเหยได้ใกล้เคียงกับที่สกัดได้จากน้ำปลาทั้ง 5 ชนิดและยังพบอีกว่า แบคทีเรียหมายเลข 6-5 ยังให้อัตราส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดโปรปิโอนิคใกล้เคียงกับของน้ำปลา 4 ชนิดคือ ทิพรส ดราชู ชุมพร และหอยนางรม นอกจากนี้ยังให้อัตราส่วนของกรดแต่ละชนิดใกล้เคียงกับของน้ำปลาชุมพรมากกว่าชนิดอื่น ๆ

เมื่อคำนวณอัตราส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันที่ระเหยได้ในการทดลองนี้ โดยอ้างอิงจากพื้นที่ใต้กราฟ (peak) ของกรดวาเลอริคที่ใช้เป็น internal standard ซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำปลาในปริมาณเท่ากันทุกตัวอย่างก่อนจะนำไปสกัด ทำให้สามารถเปรียบเทียบอัตราส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันที่ระเหยได้แต่ละชนิดในระหว่างตัวอย่างต่าง ๆ ได้ ผลการเปรียบเทียบอัตราส่วนดังกล่าวได้แสดงในตารางที่ 23

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 23 เปรียบเทียบอัตราส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ และจากตัวอย่างน้ำปลาที่ผลิตเป็นการค้า โดยคำนวณอ้างอิงจาก internal standard

ชนิดของกรด	สารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อหมักด้วยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้								น้ำปลาที่ผลิตเป็นการค้าในประเทศไทย				
	ชุดควบคุม	1-6	2-1	3-9	4-8	6-3	6-5	13-6	ทิพรส	ตราชู	ชุมพร	หอยนางรม	ยอด
กรดอะซีติค	-	7.1	13.5	-	15.4	8.6	16.3	5.7	35.3	39.4	142.5	56.7	85.2
สาร unknown-1	-	trace	trace	1.1	trace	-	-	-	trace	-	-	-	-
กรดโปรปิโอนิค	-	8.2	9.9	2.8	13.4	1.5	5.8	1.0	31.4	19.7	48.6	28.6	4.7
กรดไอโซบิวไทริค	-	-	-	-	-	-	-	-	trace	1.8	3.1	-	3.2
กรดบิวไทริค	-	trace	trace	-	2.8	-	2.0	2.1	73.8	16.9	19.8	25.3	3.8
กรดไอโซวาเลอริค	-	1.7	-	-	-	-	2.9	-	-	6.3	4.6	2.4	trace
สาร unknown-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.4	-	-
สาร unknown-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.7	13.6	4.7	8.4

เครื่องหมาย - หมายถึง ผลการวิเคราะห์ตรวจไม่พบสารดังกล่าว

trace หมายถึง ผลการวิเคราะห์ไม่ได้แสดงค่า retention time และพื้นที่ใต้กราฟ แต่จากตำแหน่งของกราฟในโครมาโตแกรมสันนิษฐานได้ว่าเป็นสารดังกล่าว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากตารางที่ 23 เมื่อเปรียบเทียบกรดไขมันแต่ละชนิดในแต่ละตัวอย่าง โดยใช้พื้นที่ใต้กราฟอ้างอิงกับ internal standard ที่เติมลงไปในปริมาณที่เท่า ๆ กันทุกตัวอย่าง พบว่าในน้ำปลาทิพรสจะพบกรดบิวไทริคในอัตราส่วนที่สูงกว่าน้ำปลาชนิดอื่น ๆ มากซึ่งอาจเนื่องมาจากชนิดของปลาที่นำมาใช้ผลิตเป็นปลาที่มีชนิดของไขมันซึ่งเมื่อถูกย่อยสลายแล้วให้กรดดังกล่าวออกมามาก ส่วนในน้ำปลาชุมพรและน้ำปลายอดจะพบกรดอะซีติค ในอัตราส่วนที่สูงมากเช่นกัน ซึ่งอาจเกิดจากสารที่เติมลงไปในกระบวนการหมักเช่น น้ำตาล ซึ่งเมื่อถูกแบคทีเรียใช้ไปในการเจริญแล้วจะให้ผลผลิตสุดท้ายออกมาเป็นกรดอะซีติค หรือเกิดจากชนิดของปลาที่ใช้ในการผลิตเช่นเดียวกับกรณีของกรดโปรปิโอนิค นอกจากนี้ยังพบอีกว่า กรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดที่พบในอัตราส่วนที่มากและมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลิ่นของน้ำปลาซึ่งสกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเกือบทุกชนิดมีปริมาณน้อยกว่าที่สกัดได้จากตัวอย่างน้ำปลาทั้งนี้อาจเกิดมาจากสาเหตุหลายประการ ได้แก่

1. ชนิดของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งของกลิ่นน้ำปลา อาจมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดไขมัน เช่น รา ยีสต์ แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือมากและภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ แม้แต่ในกลุ่มของแบคทีเรียก็อาจมีแบคทีเรียหลายชนิดที่มีส่วนเกี่ยวข้องเนื่องจากกระบวนการของการเกิดน้ำปลาเป็นกระบวนการทางธรรมชาติของการเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ที่ซับซ้อนและใช้ระยะเวลาที่ยาวนาน ดังนั้นจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องจึงอาจต้องมีความสัมพันธ์กันหรือเจริญต่อเนื่องกัน ซึ่งแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในการทดลองนี้อาจเป็นชนิดหนึ่งในความสัมพันธ์ดังกล่าวที่สร้างกรดไขมันที่ระเหยได้ร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ

2. กรดไขมันที่ระเหยได้ในน้ำปลานอกจากจะมาจากการย่อยสลายไขมันโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้แล้ว ยังอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงมาจากสารอื่น เช่น กรดอะมิโน โดยปฏิกริยาทางเคมีหรือกิจกรรมของจุลินทรีย์ ซึ่งในการทดลองนี้มุ่งเน้นกรดไขมันที่ระเหยได้อันเกิดจากการย่อยสลายไขมันเพียงชนิดเดียวจึงทำให้ได้ปริมาณกรดไขมันต่ำ

3. ปริมาณไขมันจากปลาไส้ตันที่ใช้ ปกติปลาทั่วไปจะมีไขมันอยู่ประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก แต่ในการทดลองนี้สามารถเติมไขมันลงไปได้เพียง 0.2 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากถ้าเติมไขมันลงไปในปริมาณมาก ไขมันจะไม่กระจายตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่จะจับกันเป็นกลุ่ม ติดอยู่ตามผนังด้านในของภาชนะ

6. เปรียบเทียบชนิดของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายไขมันของปลาไส้ตันโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้กับที่พบในน้ำปลาที่ผลิตเป็นการค้า

การสร้างกรดไขมันที่ระเหยได้จากไขมันของปลาไส้ตันโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ พบว่าสามารถสร้างกรดไขมันที่ระเหยได้ แต่มีชนิดและอัตราส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์

ของกรดแต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกรดไขมันระเหยได้ที่สกัดได้จากตัวอย่างน้ำปลาที่ผลิตเป็นการค้า พบว่าแบคทีเรียหมายเลข 1-6 และ 6-5 เป็นแบคทีเรียที่มีแนวโน้มในการสร้างกรดไขมันระเหยได้ จากไขมันของปลาไส้ตันในรูปแบบที่คล้ายคลึงกันกับรูปแบบของกรดไขมันระเหยได้ที่สกัดได้จากน้ำปลา ซึ่งประกอบไปด้วยกรดที่สำคัญ ๆ ได้แก่ กรดอะซีติค กรดโปรปิโอนิค กรดบิวไทริคและกรดไอโซบิวไทริค ส่วนสาร unknown-1 นั้นพบในปริมาณน้อยมากทั้งจากที่แบคทีเรียสร้างขึ้นและในน้ำปลาทิพรส จึงสันนิษฐานว่า สาร unknown-1 อาจเป็นสารระเหยได้ชนิดหนึ่งที่มีสภาพเป็นกรดและมีขนาดโมเลกุลเล็ก เพราะถูกสกัดได้ในสภาวะที่เป็นกรด เช่นเดียวกับกรดไขมันระเหยได้ชนิดต่าง ๆ และมีค่า retention time อยู่ระหว่างกรดอะซีติคและกรดโปรปิโอนิค ซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็ก นอกจากนี้ยังอาจเป็นสารหนึ่งที่ประกอบกันเป็นกลิ่นของน้ำปลาบางชนิด แต่ไม่ใช่สารที่เป็นองค์ประกอบหลักในกลิ่นของน้ำปลา เพราะน้ำปลา 4 ชนิดใน 5 ชนิดที่ใช้ในการทดลองไม่พบสารดังกล่าว หรืออีกประการหนึ่งสาร unknown-1 นี้อาจถูกสร้างขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักของทุกตัวอย่างน้ำปลาแต่มีปริมาณน้อยมากจึงสูญเสียไปในระหว่างกระบวนการผลิตและการเก็บรักษา ส่วนกรดไอโซบิวไทริคนั้นพบในตัวอย่างน้ำปลาในอัตราส่วนที่น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกรดชนิดอื่นและไม่พบเลยในสารสกัดจากอาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ อาจเป็นเพราะในธรรมชาติสารดังกล่าวเป็นส่วนประกอบของกลิ่นน้ำปลาในอัตราส่วนที่น้อย ดังนั้นการสร้างกรดไอโซบิวไทริคของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จึงอาจมีการสร้างขึ้นน้อยมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้หรืออาจต้องใช้ระยะเวลาหมักมากกว่า 14 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาในการทดลองนี้ หรือจะมีการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันหรือสารอื่น ๆ มาเป็นกรดไอโซบิวไทริค ข้อสนับสนุนการสันนิษฐานดังกล่าวพบได้จากน้ำปลาที่หมักตามธรรมชาติ เมื่อเก็บไว้นาน ๆ จะมีกลิ่นที่ต่างไปจากน้ำปลาที่ผลิตใหม่ ๆ แสดงว่ามีการระเหยของสารบางอย่างออกไปและมีการเปลี่ยนแปลงของสารระเหยได้ ซึ่งเป็นสิ่งที่ทำให้เกิดกลิ่นของน้ำปลาจากชนิดหนึ่งไปเป็นอีกชนิดหนึ่ง และเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้น้ำปลาทั้ง 5 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้มีอัตราส่วนของกรดไขมันที่ระเหยได้แต่ละชนิดไม่เท่ากัน เนื่องจากน้ำปลาแต่ละตัวอย่างมีอายุที่แตกต่างกัน สาร unknown-2 พบเฉพาะในน้ำปลาชุมพรตัวอย่างเดียว อาจอธิบายได้ด้วยข้อสันนิษฐานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของสารชนิดต่าง ๆ ในระหว่างอายุของการเก็บรักษาทั้งนี้เพราะน้ำปลาชุมพรที่ใช้มีอายุการเก็บที่นาน สังเกตจากสีของน้ำปลาที่มีสีค่อนข้างดำเนื่องจากน้ำปลาที่ผลิตใหม่ ๆ จะมีสีน้ำตาลใสถ้าเก็บไว้นาน สีของปลาจะเข้มขึ้นตามลำดับ หรืออาจเป็นกลิ่นเฉพาะตัวที่มีเฉพาะในน้ำปลาชนิดนี้ ซึ่งเกิดจากกรรมวิธีการหมักหรือสารบางอย่างที่เติมลงไปในระหว่างการหมัก เพราะเมื่อดมกลิ่นของน้ำปลาทั้ง 5 ตัวอย่างก่อนการสกัดพบว่าน้ำปลาชุมพรให้กลิ่นหอมคล้ายซอสปรุงรสที่ทำจากถั่วเหลือง ซึ่งต่างไปจากน้ำปลาอีก 4 ตัวอย่างส่วนสาร unknown-3 สามารถอธิบายได้ด้วยเหตุผลเช่น

เดียวกับกรดไอโซบิวไทริคและสาร unknown2 ที่สารดังกล่าวอาจจะเปลี่ยนแปลงมาจากสารอื่นในภายหลังหรือต้องใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อให้นานขึ้น

การศึกษาชนิดและอัตราส่วนของกรดไขมันที่ระเหยได้แต่ละชนิดที่พบในสารสกัดจากน้ำปลาที่ผลิตเป็นการค้าในประเทศไทยที่ทำในการทดลองนี้พบว่าสอดคล้องกับผลการศึกษากรดไขมันที่ระเหยได้ในสารสกัดจากน้ำปลาที่ผลิตในต่างประเทศ ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้เครื่องกาซโครมาโตกราฟีแบบต่าง ๆ กรดไขมันระเหยได้ชนิดที่พบในปริมาณมากได้แก่ กรดอะซีติค กรดโปรปิโอนิค กรดไอโซบิวไทริค กรดบิวไทริคและกรดไอโซวาเลอริค แต่จากโครมาโตแกรมของการศึกษาดังกล่าวไม่พบสาร unknown ทั้ง 3 ชนิดดังที่พบในการทดลองนี้ ตารางเปรียบเทียบชนิดและอัตราส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันที่ระเหยได้ ซึ่งสกัดจากตัวอย่างน้ำปลาที่ใช้ในการทดลองนี้และผลการศึกษาของน้ำปลาที่ผลิตในต่างประเทศ ได้แสดงในตารางที่ 24

ตารางที่ 24 แสดงชนิดและอัตราส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากน้ำปลาที่ผลิตเป็นการค้าในประเทศไทย และน้ำปลาผลิตในต่างประเทศที่มีผู้เคยทำการศึกษาโดยใช้เครื่องกาซโครมาโตกราฟี

ชนิดของกรด	น้ำปลาที่ผลิตเป็นการค้าในประเทศไทย					น้ำปลาที่มีผู้เคยทำการศึกษาแล้วในต่างประเทศ					
	ทิพรส	ตราชู	ชุมพร	หอยนางรม	ยอด	A	B	C	D	E	F
กรดอะซีติค	25.1	43.1	60.6	48.9	80.9	3.8	29.0	9.7	3.1	+	+
สาร unknown-1	trace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กรดโปรปิโอนิค	22.3	21.5	20.7	23.8	4.4	22.2	14.0	4.1	0.8	+	+
กรดไอโซบิวไทริค	trace	2.0	1.3	-	3.0	3.3	3.0	1.8	5.4	+	+
กรดบิวไทริค	52.5	18.7	8.4	21.1	3.5	51.3	17.0	1.4	trace	+	+
กรดไอโซวาเลอริค	-	7.1	1.9	1.9	trace	17.4	6.0	82.8	90.6	+	+
สาร unknown-2	-	-	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-
สาร unknown-3	-	7.3	5.7	4.0	7.9	-	-	-	-	-	-

A = น้ำปลาฟิลิปปินส์ (53) C = น้ำปลาทำจากปลาตาเดียว (flounder) (81) E = น้ำปลาญี่ปุ่น (55)
B = น้ำปลาไทย (54) D = น้ำปลาทำจากปลาเทราท (trout) (81) F = น้ำปลาเวียดนาม (55)

เครื่องหมาย + หมายถึง พบกรดไขมันที่ระเหยได้แต่ไม่ได้ระบุอัตราส่วนของกรดไขมัน
เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่พบกรดไขมันที่ระเหยได้จากการวิเคราะห์หรือจากรายงานการวิเคราะห์
trace หมายถึง ผลการวิเคราะห์ไม่ได้แสดงค่า retention time และพื้นที่ใต้กราฟแต่จากตำแหน่งของกราฟในโครมาโตแกรมสันนิษฐานได้ว่าเป็นสารดังกล่าว

จากตารางที่ 24 พบว่าอัตราส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันที่ระเหยได้แต่ละชนิดในแต่ละตัวอย่างน้ำปลามีความแตกต่างกันมาก ซึ่งอาจเนื่องมาจากชนิด ความสดดดูกาล สถานที่จับปลา ความสะอาดของเกลือ อัตราส่วนของปลาและเกลือ สภาวะแวดล้อมของการหมัก จุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิมในถังหมัก กรรมวิธีการหมักและสารชนิดอื่นที่เติมลงไป เช่น น้ำตาลทราย น้ำตาลเคี่ยวไหม้ สิ่งเหล่านี้ล้วนเป็นปัจจัยสำคัญต่อกลิ่นและรสของน้ำปลา ซึ่งในน้ำปลาแต่ละตราหรือน้ำปลาในแต่ละประเทศย่อมมีความแตกต่างของปัจจัยดังกล่าว แต่สิ่งหนึ่งที่เหมือนกันคือ น้ำปลาทุกตัวอย่างพบกรดไอโซบิวไทริคในอัตราส่วนที่น้อยจนถึงไม่พบเลย เมื่อพิจารณาถึงอัตราส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันระเหยได้ที่สกัดจากน้ำปลา 5 ตัวอย่างในการทดลองนี้ ส่วนใหญ่พบกรดอะซีติค กรดโปรปิโอนิคและกรดบิวไทริคในอัตราส่วนที่สูงและกรดไอโซบิวไทริคในอัตราส่วนที่ต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Magno-Orejana (12) ที่ศึกษาปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ในน้ำปลาไทยที่อายุการหมักแตกต่างกัน และการศึกษาของประเสริฐ สายสิทธิ์ (39) ซึ่งใช้โครมาโตกราฟีแบบกระดาษเพื่อศึกษากรดไขมันที่ระเหยได้ในน้ำปลา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย