บทที่ 5

สรุป

1. การศึกษาหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการแยกเชื้อจากน้ำปลา โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆได้แก่ Tryptone yeast extract agar, Lochhead skim milk agar , Proteose peptone agar, Complex medium of dundus , Tryptic soy agar, Brain heart infusion agar และ Nutrient agar อาหารแต่ละชนิดเติมเกลือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า Tryptone yeast extract agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อขึ้นมากทั้งชนิดและจำนวน จึงได้คัดเลือกไว้เพื่อใช้ในการทดลอง และผลการศึกษาถึงระยะเวลาการบ่ม (Incubation peroid) ที่เหมาะสมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone yeast extract agar เติมเกลือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อที่ทนเค็มได้เล็กน้อยใช้ระยะเวลา 8 วันในการบ่ม ส่วนพวกที่ทนเค็มสูงต้องใช้ระยะเวลาในการบ่มเชื้ออย่างน้อย 14 วัน

2. การเปลี่ยนแปลงทั้งปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในระยะ 253 วันของกระบวนการหมัก พบว่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือมีปริมาณเชื้อขึ้นจำนวนสูงสุด 4.5×10^{4} เซลล์/มิลลิลิตรในวันแรกของการหมัก และปริมาณต่ำสุด 24 เซลล์/มิลลิลิตรในวันสุดท้ายของการทดลอง ส่วนบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์มีปริมาณเชื้อสูงสุดในวันแรก 3.74×10^{4} เซลล์/มิลลิลิตร และมีเชื้อปริมาณต่ำสุดเท่ากับ 28 เซลล์/มิลลิลิตรในวันสุดท้ายของการทดลอง การเปลี่ยนแปลงของเชื้อทั้ง 2 กลุ่มนี้คล้ายกันมากโดยเชื้อจะลดปริมาณลงอย่างรวดเร็วภายในประมาณ 2 สัปดาห์แรกของการหมักจนเหลือประมาณ 3.25×10^{2} และ 6.29×10^{2} เซลล์/มิลลิลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือและเติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นจะค่อยๆลดจำนวนจนเหลือต่ำสุดดังกล่าว ทั้งสองกลุ่มมีความสัมพันธ์แบบตรงกันข้ามกับสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนที่ระดับความเชื่อมั่นสูง ยกเว้นเชื้อกลุ่มที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือ กับ แอมโมเนียคัลไนโตรเจนเป็นแบบไม่มีนัยสำคัญจึงไม่ควรจะมีบทบาทในกระบวนการหมัก และลักษณะของโคโลนีของเชื้อใกล้เคียงกันมากมีความสัมพันธ์ในแง่จำนวนที่ระดับความเชื่อมั่นสูงโดยมีค่าสหสัมพันธ์(r)เท่ากับ 0.9740^{**} ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ สำหรับบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 20

เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเชื้อสูงสุด 7.26×10^{3} เซลล์/มิลลิลิตร ในวันที่ 62 ลักษณะของเชื้อที่พบมี 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกปรากฏตั้งแต่เริ่มหมักจนถึงประมาณ 18 วันส่วนใหญ่เป็นพวกมีโคโลนีกลมนูนสีขาวและเหลืองสด หลังจากที่กลุ่มนี้ลดจำนวนลงจนแทบไม่มี จะปรากฏเชื้ออีกกลุ่มหนึ่งซึ่งโคโลนีมีลักษณะสีแดงค่อนข้างโปร่งแสงซึ่งจะปรากฏในช่วง 12 ถึง 124 วันเป็นพวกที่เจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ มีความสัมพันธ์กับสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนทุกชนิดแต่ไม่มีนัยสำคัญ แต่มีความสัมพันธ์กับกรดอะมิโนอิสระที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จึงอาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก และนับว่าเป็นกลุ่มที่ควรศึกษาที่สุด เนื่องจากสามารถเจริญเพิ่มจำนวนในถังหมักได้ แบคทีเรียทั้งหมดที่พบในกระบวนการหมักแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ พวกรูปกลมแกรมบวก(C^{+}) พวกรูปแท่งแกรมบวก(R^{+}) และพวกรูปแท่งแกรมลบ(R^{-}) พวก C^{+} เป็นพวกที่มีปริมาณมากในระยะแรกของการหมักซึ่งเป็นพวกทนเค็มได้ค่อนข้างต่ำ หลังจากที่แบคทีเรียส่วนใหญ่ตายไปจะมี C^{+} อีกกลุ่มหนึ่งซึ่งเป็นพวกทนเค็มสูงเจริญเป็นจำนวนมาก(ได้แก่กลุ่มแบคทีเรียกลุ่มโคโลนีสีแดง) ซึ่งคาดว่าเป็นกลุ่มที่มีบทบาทในกระบวนการหมักน้ำปลา พวก R^{+} พบตลอดการทดลองในปริมาณต่ำและพบว่าส่วนใหญ่เป็นพวกที่สร้างสปอร์ได้ ส่วนพวก R^{-} พบในปริมาณที่น้อยมากและหายไปในช่วง 32 วัน ทั้ง R^{+} และ R^{-} คาดว่าเป็นพวกที่ไม่มีบทบาทในกระบวนการหมัก

3. การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในระยะ 253 วันของกระบวนการหมัก พบว่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่พบมีค่าสูงสุดเท่ากับ 25.9414 กรัม/ลิตรในวันสุดท้ายของการทดลอง และมีการเพิ่มขึ้นเป็น 2 ระยะ ระยะแรกตั้งแต่เริ่มหมักจนถึงประมาณ 53 วันเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วถึง 83.02 เปอร์เซ็นต์ ของค่าสูงสุดที่พบโดยเพิ่มเฉลี่ยประมาณวันละ 0.2687 กรัม/ลิตร ระยะที่ 2 คือช่วงวันที่ 74 ถึง 124 วัน เพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยอย่างช้าๆในอัตราเฉลี่ยประมาณวันละ 0.0720 กรัม/ลิตร ส่วนปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนพบว่ามีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 16.7693 กรัม/ลิตรในวันสุดท้ายของการทดลอง มีการเพิ่มปริมาณเป็น 2 ระยะเช่นกัน ระยะแรกตั้งแต่เริ่มหมักจนถึงประมาณ 53 วัน เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วถึง 70.76 เปอร์เซ็นต์ ของค่าสูงสุดที่พบโดยเพิ่มเฉลี่ยประมาณวันละ 0.1753 กรัม/ลิตร ระยะที่ 2 เพิ่มขึ้นในช่วง 102 - 124 วัน โดยเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยเฉลี่ยประมาณวันละ 0.1046 กรัม/ลิตร การเพิ่มปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมดและไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนในระยะแรก คาดว่าเป็นผลจากกระบวนการย่อยตัวเองของเซลล์เนื้อปลาเป็นส่วนใหญ่ ส่วนการเพิ่มปริมาณในระยะที่ 2 นั้นเป็นระยะที่แบคทีเรียกลุ่มโคโลนีสีแดงยังเจริญเป็นจำนวนมากอยู่

จึงอาจจะเกี่ยวข้องกัน หลังจาก 124 วันไปแล้วทั้งปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนค่อนข้างคงที่จึงคาดว่าระยะเวลา 124 วันนี้ การย่อยสลายของโปรตีนเกิดขึ้นเต็มที่แล้ว จึงควรจะเป็นระยะที่เพียงพอสำหรับขั้นตอนการย่อยสลายโปรตีน ปริมาณของแอมโมเนียคัลไนโตรเจนพบว่ามีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.7065 กรัม/ลิตร มีการเพิ่มปริมาณเป็น 2 ระยะเช่นกัน ระยะแรกตั้งแต่เริ่มหมักจนถึงประมาณ 39 วัน เพิ่มปริมาณสูงถึง 62.90 เปอร์เซ็นต์ ของค่าสูงสุดที่พบหรือเพิ่มเฉลี่ยประมาณวันละ 0.0210 กรัม/ลิตร และเพิ่มขึ้นอีกครั้งหนึ่งในช่วง 124 - 195 วันโดยเพิ่มเฉลี่ยประมาณวันละ 0.0040 กรัม/ลิตร ซึ่งเป็นช่วงที่แบคทีเรียกลุ่มที่มีโคโลนีสีแดงเริ่มหายไป การเพิ่มระยะแรกคงเป็นผลเนื่องมาจากกระบวนการย่อยตัวเองของเซลล์เนื้อปลาส่วนการเพิ่มระยะที่ 2 นี้อาจเนื่องมาจากกระบวนการของเซลล์แบคทีเรียกลุ่มสีแดงดังกล่าว ซึ่งในช่วงที่แบคทีเรียสีแดงกำลังเจริญสูงสุดนั้น การเพิ่มปริมาณของแอมโมเนียคัลไนโตรเจนกลับมีน้อย โดยเพิ่มเฉลี่ยประมาณวันละ 0.002 กรัม/ลิตรเท่านั้นซึ่งเป็นอัตราเพิ่มเฉลี่ยที่ต่ำกว่าระยะที่แบคทีเรียกลุ่มนี้หายไปจึงอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถนำแอมโมเนียไปใช้เพื่อการเจริญได้

การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่าปริมาณเกลือในถังหมักมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 24.7 ถึง 30.0 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าสูงสุดในระยะแรกและจะลดต่ำลงอย่างมากในช่วงวันที่ 74 ถึง 86 โดยลดจาก 29 เปอร์เซ็นต์เหลือ 26 เปอร์เซ็นต์ คาดว่าเป็นช่วงที่ผนังเซลล์ของเนื้อปลาถูกทำลายหมดแล้วโดยเอนไซม์ทั้งจากของปลาเองและจากแบคทีเรียกลุ่มโคโลนีสีแดงซึ่งกำลังเจริญสูงสุดในระยะนี้ทำให้ของเหลวภายในเซลล์ไหลออกมาสู่ภายนอก มีความสัมพันธ์แบบตรงกันข้ามกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณไนโตรเจนในรูปของกรดอะมิโนที่ระดับความเชื่อมั่นสูง ซึ่งเป็นสิ่งที่บอกให้ทราบว่าการเพิ่มปริมาณไนโตรเจนของกรดอะมิโนนั้นมีความสัมพันธ์กับการลดลงของปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์

การเปลี่ยนแปลงของ pH อยู่ในช่วง 5.22 -5.96 หรือเฉลี่ย 5.47 การเปลี่ยนแปลงของ pH มีความสัมพันธ์แบบตรงกันข้ามกับปริมาณไนโตรเจนในรูปของกรดอะมิโนบ้างเล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญ กรดอะมิโนที่เพิ่มขึ้นอาจมีผลหรือไม่มีผลทำให้ pH ต่ำลง

การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ในช่วง 124 วัน อุณหภูมิภายในถังหมักสูงกว่าภายนอกถัง

หมัก ต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ คาดว่าเป็นผลมาจากกิจกรรมการย่อยสลายต่างๆที่เกิดขึ้นมากในช่วงนี้ทำให้มีการปลดปล่อยพลังงานออกมามากเป็นผลให้อุณหภูมิสูงขึ้น หลังจาก 124 วันไปแล้วอุณหภูมิภายนอกถังหมักและภายในถังหมักไม่มีความแตกต่างกันซึ่งเป็นระยะที่ตรงกับระยะที่แบคทีเรียส่วนใหญ่ตายไปเกือบหมด

การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนอิสระทั้งหมด พบว่ากรดอะมิโนทั่วไปในน้ำปลามีประมาณ 17 ชนิด ชนิดที่มีมากได้แก่ไลซีน กรดกลูตามิค และอะลานินชนิดที่มีน้อย ได้แก่ ซิสเตอีนและไทโรซีน มีการเพิ่มปริมาณของกรดอะมิโนรวมทั้งหมดเป็น 3 ระยะ คือ ช่วง 1 ถึง 9 วัน โดยเพิ่มเฉลี่ยประมาณวันละ 2.64 กรัม/ลิตร ช่วง 9 ถึง 62 วัน เพิ่มเฉลี่ยประมาณวันละ 5.52 กรัม/ลิตร และช่วงหลังจาก 62 วันจนถึงสิ้นสุดการทดลอง เพิ่มเฉลี่ยประมาณวันละ ๐.44 กรัม/ลิตร มีความสัมพันธ์แบบตรงกันข้ามกับแบคทีเรียกลุ่มที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือและเติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีนัยสำคัญ แต่มีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียกลุ่มที่มีโคโลนีสีแดง ชอบเค็ม และสร้างโปรติเอสได้ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จึงอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียชอบเค็มดังกล่าวมีส่วนช่วยเพิ่มอัตราการปลดปล่อยกรดอะมิโนอิสระในน้ำปลา

4. การคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มที่สร้างโปรติเอสได้ดี พบว่าแบคทีเรีย Isolate 1 เป็นแบคทีเรียชอบเค็มที่สามารถย่อย Skim milk agar และเจลลาตินได้ดีที่สุด เมื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี พบว่าเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล Halococcus

5. การนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาเพิ่มจำนวนและหมักกับปลาโดยเปรียบเทียบการย่อยสลายเนื้อปลากับการหมักตามธรรมชาติ พบว่าเมื่อนำแบคทีเรีย Isolate 1 ไปเพิ่มจำนวนในโหลหมักปลากับเกลือในอัตราส่วนปลา 750 กรัม : เกลือ 250 กรัม : เชื้อ Isolate 1 จำนวน 1 กรัม (เซลล์เปียก หรือประมาณ 3.37×10^{12} เซลล์) ในระยะเวลา 73 วันพบว่าในโหลที่เติมเชื้อมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนสูงกว่าในโหลควบคุมเฉลี่ย ๐.2827** และ ๐.2185** กรัม/ลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณเชื้อทั้งหมดและปริมาณเชื้อเฉพาะพวกที่มีโคโลนีสีแดงที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 25 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าในโหลควบคุมเฉลี่ย 4.๐๐ x

10^{8} และ 3.48×10^{8} เซลล์/มิลลิลิตร สำหรับแอมโมเนียคัลไนโตรเจนมีน้อยกว่าในโหลควบคุม 0.1205 ** กรัม/ลิตร แต่ค่า pH และปริมาณเกลือไม่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีแนวทางเป็นไปได้ที่จะใช้เชื้อแบคทีเรียชอบเค็มที่สร้างน้ำย่อยโปรตีนได้เพิ่มลงไปในถังหมักน้ำปลาเพื่อช่วยย่นระยะเวลาในการหมัก

ข้อเสนอแนะ

1. ในการหมักน้ำปลาตามธรรมชาตินั้นระยะเวลาในการหมักเพียง 4 เดือน น่าจะเพียงพอแล้วสำหรับขั้นตอนการย่อยสลายโปรตีนของเนื้อปลา และจะเห็นได้ว่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนมีค่าสูงสุดตามที่มาตรฐานกำหนดนั้นใช้ระยะเวลาเพียง 46 และ 32 วันตามลำดับ ดังนั้นในขั้นตอนการทำให้เกิดกลิ่นที่ดีนั้นสามารถเริ่มต้นได้ภายในหนึ่งเดือนครึ่งถึงสองเดือนหลังจากหมัก ซึ่งระยะนี้ก็เป็นระยะเดียวกับที่แบคทีเรียกลุ่มที่ชอบเค็มสูงกำลังเจริญเป็นจำนวนมากจึงไม่แน่ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับการเกิดกลิ่นของน้ำปลาควรน่าจะได้มีการศึกษาแบคทีเรียกลุ่มนี้ในแง่ของการทำให้เกิดกลิ่นน้ำปลาด้วยเช่นกัน
2. แบคทีเรียที่เป็นจำนวนมากในกระบวนการหมักน้ำปลาและเป็นกลุ่มที่คาดว่าจะมีบทบาทในกระบวนการหมักน้ำปลานั้นพบว่าเป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนดังนั้นการหมักน้ำปลาโดยวิธีดั้งเดิมที่มีสภาพของถังหมักค่อนข้างจะเป็น anaerobe นั้นเป็นวิธีที่เหมาะสมแล้วหรือไม่ควรจะได้มีทดลองศึกษากันใหม่