



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. การคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการคัดแยกหาแบคทีเรียชอบเค็มจากตัวอย่างน้ำปลาที่มีอายุการหมักแตกต่างกัน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ 8 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดผสมซีกเตียมคลอไรด์จนกระทั่งมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 และ 25 เปอร์เซ็นต์ พบว่าในทั้ง 2 อายุการหมักคือ 10 วันและ 3 เดือน แบคทีเรียเจริญได้ดีที่สุดบน Brain heart infusion agar และ Tryptic soy yeast extract agar เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นอีก 6 ชนิด ในทั้ง 2 ความเข้มข้นของเกลือซีกเตียมคลอไรด์ แต่ในการทดลองนี้เลือกใช้ Tryptic soy yeast extract agar เนื่องจาก Brain heart infusion agar และ Brain heart infusion broth จะขุ่นเมื่อมีเกลือผสมอยู่ในปริมาณมาก ทำให้ผลต่อการทดลองในขั้นตอนต่อไป นอกจากนี้ Tryptic soy yeast extract agar ยังมีคุณสมบัติอื่น ๆ ที่เหมาะสมอีกหลายประการ และยังพบอีกว่าจำนวนของแบคทีเรียที่ชอบเค็มสูงมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นตามอายุการหมักส่วนของแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียที่ชอบเค็มปานกลางค่อนข้างจะคงที่

2. การศึกษาคุณสมบัติบางประการและคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่เจริญได้ดีภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำจากตัวอย่างน้ำปลาหมักตามธรรมชาติที่มีอายุการหมักแตกต่างกัน พบว่าตัวอย่างน้ำปลามีค่าความเป็นกรดต่างอยู่ในช่วง 5.23 ถึง 5.62 ปริมาณซีกเตียมคลอไรด์อยู่ในช่วง 25.73 ถึง 28.12 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นตามอายุการหมัก โดยปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดจะได้ตามมาตรฐานในตัวอย่างอายุการหมัก 6 เดือน ส่วนไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนจะได้ตามมาตรฐานในตัวอย่างอายุ 3 เดือน ตัวอย่างเริ่มมีกลิ่นคล้ายน้ำปลาในตัวอย่างอายุ 6 เดือนและเริ่มมีสีน้ำตาลซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาเคมี non-enzyme browning reaction ในตัวอย่างอายุ 2 เดือน ซึ่งแสดงว่ากระบวนการเกิดสีเกิดขึ้นก่อนหรือเกิดขึ้นได้เร็วกว่ากระบวนการเกิดกลิ่นของน้ำปลา การศึกษาจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดที่คัดแยกได้จากน้ำปลาอายุการหมักแตกต่างกัน ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีกเตียมคลอไรด์ผสมอยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 1.03×10^5 ถึง 2.34×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีกเตียมคลอไรด์ผสมอยู่ 25 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนแบคทีเรียอยู่ระหว่าง 4.60×10^5 ถึง 2.23×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่า

เฉลี่ยสูงกว่าจำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไรโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า แบคทีเรียที่ชอบเค็มสูงน่าจะมีความทนทานต่อการหมักน้ำปลามากกว่าแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียที่ชอบเค็มปานกลาง แต่ไม่สามารถหาความสัมพันธ์ของจำนวนแบคทีเรียในแต่ละช่วงอายุการหมักได้ เนื่องจากใช้ตัวอย่างจากถังหมักที่มีระยะเวลาการหมัก ชนิดของปลา อัตราส่วนผสมของเกลือและปลาแตกต่างกัน การจัดกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้ พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียในสภาวะดังกล่าวข้างต้นได้จำนวน 114 ไซโลไน เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม facultative anaerobes ที่มีรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก อยู่ติดกันเป็นคู่หรือสี่เซลล์ สันนิษฐานว่าเป็นแบคทีเรียสกุล *Pediococcus* จำนวน 30 ไซโลไน เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้เฉพาะภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ (obligate microaerobic bacteria) จำนวน 84 ไซโลไน ในจำนวนนี้เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อน ติดสีแกรมบวกจำนวน 63 ไซโลไน และเป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างไม่แน่นอน ติดสีแกรมลบ สันนิษฐานว่าเป็นแบคทีเรียในวงศ์ *Bacteroidaceae* จำนวน 21 ไซโลไน

3. การทดสอบเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มกลุ่มที่เจริญได้เฉพาะภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสย่อยกลีเซอรอลไตรบิวทาเรต (glycerol tributyrat) ได้ดี พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียได้ 7 ไซโลไน โดยคัดเลือกมาจากน้ำปลาดตัวอย่างละ 1 ไซโลไน ยกเว้นในตัวอย่างอายุ 6 เดือน คัดเลือกมา 2 ไซโลไนและพบว่าในสภาวะที่มีไรโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดจะให้อัตราส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณสุดต่อเส้นผ่าศูนย์กลางไซโลไน มากกว่าในสภาวะที่มีไรโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้การสร้างกรดไขมันที่ระเหยได้อันเป็นส่วนประกอบหนึ่งของกลิ่นน้ำปลาในธรรมชาติต้องใช้เวลาอันยาวนาน จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีบางประการ สันนิษฐานได้ว่าเป็นแบคทีเรียสกุล *Clostridium* กลุ่มที่มีสปอร์เป็นแบบ subterminal ที่ไม่สามารถย่อยเจลาตินได้ เมื่อศึกษาชีวเคมีเพิ่มเติมและศึกษาการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ พบว่าไม่สามารถจำแนกชนิดที่แน่ชัดลงไปได้ เพียงแต่พบว่าแบคทีเรีย 6 ใน 7 ไซโลไนที่คัดเลือกได้สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตและสารชนิดอื่น ๆ แล้วให้ผลใกล้เคียงกับ *Clostridium paraperfringens* มากกว่าชนิดอื่น ๆ ส่วนที่เหลืออีก 1 ไซโลไนให้ผลที่ไม่สอดคล้องกับชนิดใดใน *Clostridium* กลุ่มนี้เลย

4. การคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีส่วนประกอบของอาหารน้อยสุด (minimum medium) สำหรับแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เนื่องจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดไม่สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งของไนโตรเจนได้ จึงนำสารอินทรีย์บางตัวมาใช้ จากการศึกษาพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบน้อยสุด และแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

สามารถเจริญได้ดี ประกอบด้วย ทริปตอง กลูโคส ไซเตียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต ไรบัสเซียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์

5. การศึกษาชนิดของกรดไขมันที่ระเหยได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไขมันจากปลาสด เป็นสารตั้งต้น พบว่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อชุดที่ไม่เติมไขมันของ แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ มีค่าเฉลี่ยประมาณ 5.98 ส่วนชุดที่เติมไขมันมีค่าเฉลี่ยประมาณ 4.82 สภาพความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นนี้เกิดจากกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งเกิดจากการย่อยไขมัน ของปลาสดต้นรอยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ และที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ แบคทีเรียดังกล่าวจึงมีกรดไขมันอิสระรวมเลกุลใหญ่ที่เกิดจากการย่อยสลายไขมันปลาสดใน านตอนแรกเป็นสารตั้งต้น การศึกษาชนิดของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากอาหารเลี้ยง เชื้อที่เติมไขมันจากปลาสดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่จะสร้าง กรดอะซิติก (ยกเว้นแบคทีเรียหมายเลขที่ 3-9) และกรดบริบิโอนิค นอกจากนี้ยังมี การสร้างกรดบิวทริกโดยแบคทีเรียหมายเลข 1-6, 2-1, 4-8, 6-5 และ 13-6 กรดโอริชวาเลอริกโดยแบคทีเรียหมายเลข 1-6 และ 6-5 สาร unknown-1 โดย แบคทีเรียหมายเลข 1-6, 2-1, 3-9 และ 4-8 ไม่มีแบคทีเรียหมายเลขใดที่สร้างกรด- โอริชบิวทริก อัตราส่วนของกรดไขมันที่ระเหยได้แต่ละชนิดซึ่งแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ สร้างขึ้น พบว่ามีความแตกต่างกัน ชนิดของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากน้ำปลาที่ผลิต เป็นการค้า 5 ตัวอย่างได้แก่ ตราทิพรส ตราตราฐู ตราชุมพร ตราหอยนางรมและ ตรายอด ซึ่งส่วนใหญ่จะพบกรดอะซิติก กรดบริบิโอนิค กรดโอริชบิวทริก กรดบิวทริก กรดโอริชวาเลอริกและสาร unknown-3 โดยที่น้ำปลาตราหอยนางรมไม่พบกรดโอริชบิว- ทริกและน้ำปลาตราทิพรสไม่พบกรดโอริชวาเลอริกและสาร unknown-3 นอกจากนี้ยัง พบสาร unknown-1 ในน้ำปลาตราทิพรส สาร unknown-2 ในน้ำปลาตราชุมพร ซึ่งไม่ พบสารดังกล่าวในน้ำปลาตราอื่น ๆ สำหรับอัตราส่วนของกรดไขมันที่ระเหยได้แต่ละชนิดใน ของแต่ละตัวอย่างน้ำปลาก็มีความแตกต่างกันเช่นเดียวกับในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่จะพบ อัตราส่วนของกรดโอริชบิวทริกในทุตัวอย่างมีค่าค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับอัตรา- ส่วนของกรดชนิดอื่น ๆ

6. การเปรียบเทียบชนิดของกรดไขมันที่ระเหยได้ ซึ่งสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียที่คัดเลือกได้กับที่สกัดได้จากน้ำปลาที่มีผลิตขายเป็นการค้า พบว่าแบคทีเรียหมายเลข 1-6 และ 6-5 ำให้รูปแบบชนิดของกรดไขมันที่ระเหยได้ใกล้เคียงกับที่สกัดได้จากน้ำ- ปลาทั้ง 5 ตัวอย่าง ซึ่งชนิดของกรดไขมันดังกล่าวที่สำคัญได้แก่ กรดอะซิติก กรดบริบิโอนิค กรดบิวทริกและกรดโอริชวาเลอริก ยกเว้นกรดโอริชบิวทริกซึ่งพบจากตัวอย่างน้ำ- ปลาในอัตราส่วนที่ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับกรดชนิดอื่น ๆ และไม่พบเลยในสารสกัดจาก

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียหมายเลข 2-1, 4-8, 13-6 ที่สร้างกรด 3 ชนิดแรก แต่ไม่สร้างกรดไฮโซวารลอรिक ส่วนแบคทีเรียหมายเลข 3-9, 6-3 พบว่าให้รูปแบบของกรดที่ต่างไปจากของน้ำปลา นอกจากนี้ยังพบสาร unknown อีก 3 ชนิดจากตัวอย่างน้ำปลาและพบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้บางหมายเลขสามารถสร้างสาร unknown 1 ใน 3 ชนิดดังกล่าวแล้วได้ เมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันที่ระเหยได้แต่ละชนิดในแต่ละตัวอย่าง วัตถุประสงค์ที่ได้กราฟอ้างอิงกับของ internal standard พบว่ากรดไขมันระเหยได้ชนิดที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของกลิ่นน้ำปลา ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีปริมาณน้อยกว่าในน้ำปลา ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าแบคทีเรียหมายเลข 1-6 และ 6-5 น่าจะเป็นแบคทีเรียที่ควรนำไปศึกษาเพิ่มเติมในด้านต่าง ๆ เพื่อให้สามารถผลิตกรดไขมันที่ระเหยได้ ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของกลิ่นของน้ำปลา ให้มีปริมาณมากขึ้นกว่าเดิม และสามารถนำแบคทีเรียดังกล่าวไปใช้ในกระบวนการหมักน้ำปลาเพื่อช่วยเร่งการสร้างกลิ่นให้เร็วขึ้น ซึ่งจะทำได้สามารถลดระยะเวลาของการผลิตให้สั้นลงจากที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรนำแบคทีเรียหมายเลข 1-6 และ 6-5 ที่คัดเลือกได้ในการทดลองนี้ไปทำการปรับปรุงสายพันธุ์โดยวิธีการทางพันธุวิศวกรรม และปรับปรุงสภาวะของการเจริญ เช่น อุณหภูมิ แหล่งของสารอาหาร เพื่อทำให้แบคทีเรียที่คัดเลือกได้สามารถเปลี่ยนไขมันจากปลาที่ใช้ทำน้ำปลาให้เป็นกรดไขมันที่ระเหยได้ อันเป็นส่วนประกอบสำคัญของกลิ่นของน้ำปลาให้มากขึ้น
2. ควรนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาทดลองหมักน้ำปลาโดยมีการหมักตามวิธีธรรมชาติเป็นชุดควบคุม แล้วตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของกรดไขมันที่ระเหยได้ควบคู่ไปกับการตรวจสอบด้วยประสาทสัมผัสโดยการดมกลิ่นและตรวจสอบคุณสมบัติอื่น ๆ ของน้ำปลา

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย