Science and Technology
RMUTT Journal
Vol.6 No.2 (2016) : 147-156
www.sci.rmutt.ac.th/stj
Online ISSN 2229-1547

การปรับปรุงกลิ่นและรสชาติของน้ำปลาด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรีย

Improvement of Aroma and Flavor in Fish Sauce by Bacterial Enzyme

อรวรรณ พึ่งคำ[1*], ณัฐชรัฐ แพกุล[1], อดิสรณ์ ดีเปรมจิต [2] และ อนันต์ บุญปาน[2]

[1] สาขาวิชาอาหารและโภชนาการ คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

[2] คณะการจัดการธุรกิจอาหาร สถาบันการจัดการปัญญาภิวัฒน์ อ.ปากเกร็ด จ.นนทบุรี 11120

*E-mail: ananboo@pim.ac.th

บทคัดย่อ

การปรับปรุงกลิ่นและรสชาติของน้ำปลาโดยการเติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส และเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AB 005 และ *Halobacterium salinarium* PB 3233 ตามลำดับ ร่วมกับการหมัก พบว่า การเติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือร่วมกับการหมักน้ำปลาจะทำให้ปริมาณสารประกอบกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟตและปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ของน้ำปลาเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสารประกอบทั้งสองชนิดจะช่วยให้กลิ่นและรสชาติของน้ำปลาดีขึ้น ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่ชอบเกลือ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรสและเอนไซม์ไลเปสสำหรับใช้ร่วมกับการหมักน้ำปลาคือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ตามลำดับ นอกจากนั้น การทดลองหมักน้ำปลาโดยใช้เอนไซม์ที่ชอบเกลือ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (1.5 เปอร์เซ็นต์) และเอนไซม์ไลเปส (1.0 เปอร์เซ็นต์) ร่วมกับการหมัก พบว่า ปริมาณสารประกอบกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟตและกรดไขมันที่ระเหยได้ของน้ำปลาที่เติมเอนไซม์จะสูงกว่าน้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติ แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์จากแบคทีเรียร่วมกับการหมักน้ำปลาจะสามารถปรับปรุงคุณภาพด้านกลิ่นและรสชาติของน้ำปลาได้

คำสำคัญ: น้ำปลา เอนไซม์ที่ชอบเกลือ เอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส เอนไซม์ไลเปส สารประกอบกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต กรดไขมันที่ระเหยได้

Received: August 05, 2016
Revised: December 19, 2016
Accepted: November 24, 2016

Abstract

Improvement of aroma and flavor in fish sauce by application of halophilic 5′- phosphodiesterase (5′-PDE) from *Bacillus pumilus* AB 005 and lipase from *Halobacterium salinarium* PB 3233 into fish sauce fermentation showed that increasing of halophilic enzymes caused increase of guanosine 5′- monophosphate (5′- GMP) and volatile fatty acids (VFAs). 5′- GMP and VFAs produced from halophilic enzymes will give a better aroma and flavor in fish sauce. The optimum halophilic 5′- PDE and lipase concentrations that applied to fish sauce fermentation were 1.5% (w/w) and 1.0% (w/w), respectively. In addition, the fermentation of fish sauce by application of halophilic 5′- PDE (1.5%) and halophilic lipase (1.0%) were studied. The results showed that halophilic enzymes added fish sauce contained significantly higher 5′- GMP and VFAs contents compared to fish sauce without enzymes added. This indicates that application of halophilic enzymes to fish sauce fermentation could be improve aroma and flavor qualities in fish sauce.

Keywords: fish sauce, halophilic enzyme, 5′- phosphodiesterase, lipase, guanosine 5′- monophosphate, volatile fatty acid

1. บทนำ

น้ำปลาเป็นผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำพื้นเมืองของประเทศไทยที่จำเป็นในการประกอบอาหารประจำวัน ประชาชนคนไทยจะนิยมใช้น้ำปลาช่วยปรุงแต่งรสอาหารกันทุกครัวเรือน น้ำปลาได้จากการหมักปลากับเกลือนานประมาณ 8-12 เดือน โดยใช้ปลาขนาดเล็กซึ่งอาจเป็นปลาน้ำจืดหรือน้ำเค็มก็ได้ในกระบวนการหมักจะเกิดการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) โดยเอนไซม์จากอวัยวะภายในของปลาก่อนแล้วเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนจะย่อยสลายเนื้อปลาในขั้นต่อไปจนกลายเป็นน้ำปลา ไม่เพียงแต่ในประเทศไทยเท่านั้นที่ใช้น้ำปลาเป็นเครื่องปรุงรสอาหารยังมีประเทศอื่น ๆ ในเอเชียที่ผลิตและบริโภคน้ำปลาเช่นเดียวกัน เช่น เวียดนาม พม่า มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซียและญี่ปุ่น เป็นต้น โดยแต่ละประเทศก็จะมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไป

น้ำปลาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่นิยมใช้กันแพร่หลาย มีความสำคัญทั้งทางด้านโภชนาการและทางด้านเศรษฐกิจปัจจัยสำคัญที่จะทำให้ผู้บริโภคยอมรับน้ำปลา คือ กลิ่นและรสชาติ โดยกลิ่นของน้ำปลาจะเกิดจากสารประกอบหลายชนิดในน้ำปลาโดยเฉพาะกรดไขมันโมเลกุลต่ำ ๆ ที่ระเหยได้ (volatile fatty acids) ในน้ำปลา เช่น acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ isovaleric acids [1, 2] สำหรับรสชาติของน้ำปลาจะเกิดจากกรดอะมิโนและสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์โดยเฉพาะกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต (guanosine 5′- monophosphate, 5′- GMP) [3, 4]

ปัจจุบันการผลิตน้ำปลาในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ยังใช้การหมักโดยวิธีธรรมชาติแบบดั้งเดิมซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการหมักนานและคุณภาพน้ำปลาที่ได้ไม่สม่ำเสมอ ได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการหมักน้ำปลาโดยใช้วิธีการ

ต่าง ๆ เช่น การใช้กรด-ด่าง [5] การใช้เชื้อจุลินทรีย์ [6] การใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ [7, 8] เพื่อเร่งกระบวนการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลาให้กลายเป็นน้ำปลาเร็วขึ้น ซึ่งการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการหมักน้ำปลาส่วนใหญ่จะเป็นการพัฒนาเพื่อย่นระยะเวลาในการหมักน้ำปลาแต่น้ำปลาที่ได้มักจะมีกลิ่นและรสชาติด้อยกว่าน้ำปลาที่หมักโดยวิธีธรรมชาติ การวิจัยเพื่อพัฒนาปรับปรุงกลิ่นและรสชาติของน้ำปลาให้ดีขึ้นน่าที่จะทำได้โดยการเติมเอนไซม์ไลเปสและ5′-ฟอสโฟ ไดเอสเทอเรสที่ชอบเกลือ (halophilic 5′- phosphodiesterase, 5′- PDE and lipase) ร่วมไปกับการหมักน้ำปลา เอนไซม์ไลเปสและ 5′- PDE ที่ชอบเกลือจะมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันและกรดไรโบนิวคลีอิค (ribonucleic acid, RNA) ในตัวปลาให้เป็นกรดไขมันชนิด ต่าง ๆ และสารประกอบนิวคลีโอไทด์กัวโนซีน 5′- โมโนฟอสเฟต (guanosine 5′- monophosphate, 5′- GMP) ซึ่งจะช่วยทำให้กลิ่นและรสชาติของน้ำปลาดีขึ้น ดังนั้น ถ้าได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการใช้เอนไซม์ที่ชอบเกลือชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสและ 5′- PDE ร่วมกับการหมักน้ำปลาจึงน่าที่จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาให้เกิดกลิ่นและรสชาติที่ดีขึ้นในน้ำปลา

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมเอนไซม์จากจุลินทรีย์

การเตรียมเอนไซม์ 5′- PDE จาก *Bacillus pumilus* AB 005 และเอนไซม์ไลเปสจาก *Halobacterium salinarium* PB 3233 จะเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว Sehgal and Gibbons Complex (SGC) และ SGC ที่มีน้ำมันมะกอก 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ [9, 10] โดยถ่ายแบคทีเรียอายุประมาณ 1 วัน ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแขวนลอยปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลวชนิดเดียวกันปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อต่อลงในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลวปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 VVM ทำการเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตกตะกอนน้ำใส (supernatant) ที่ได้ด้วยเอทานอล แยกตะกอนเอนไซม์ออกจากน้ำหมัก นำตะกอนที่ได้ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ นำสารละลายเอนไซม์มาแยกโปรตีนปนเปื้อนออกด้วยวิธีไดอะไลซีส (dialysis) (11) จากนั้นนำมาทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) จะได้เอนไซม์อยู่ในรูปผงสำหรับใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

2.2 การศึกษาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

การศึกษาความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′- PDE และเอนไซม์ไลเปส โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยทำการแปรผันความเข้มข้นเกลือ NaCl ในสับสเตรทให้มีปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายของ

เกลือ NaCl ในสารละลายเป็น 0 – 50 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

การวิเคราะห์กิจกรรมของ 5′- PDE ดัดแปลงจากวิธีการของ [12] โดยใช้สารละลายเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร สำหรับทำปฏิกิริยากับสารละลายกรดไรโบนิวคลีอิก 1.0 มิลลิลิตร (กรดไรโบนิวคลีอิก 0.1 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4.7H_2O$ 0.16 โมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ พีเอช 7.0) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติมเอทานอล 99.8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 6.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งนาน 20 นาที ปั่นเหวี่ยงแยกตะตอนออก นำส่วนใสที่ได้ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น 50 เท่า นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร หนึ่งหน่วยของกิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 1.0 หน่วย ภายใต้สภาวะที่ใช้วิเคราะห์

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จะทำโดยการวัดปริมาณกรดไขมันที่เพิ่มขึ้น ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ [13] โดยใช้สารละลายเอนไซม์ไลเปส 2 มิลลิลิตร สำหรับทำปฏิกิริยากับสับสเตรท (น้ำมันมะกอกบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายผสมระหว่างอะซิโตนและเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วทำการไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.05 นอร์มัล กำหนดให้ 1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันมะกอกให้ได้กรดไขมันที่อยู่ในรูปของกรดโอเลอิก 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 ชั่วโมง

2.4 การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการหมักน้ำปลา

2.4.1 การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ 5′- PDE ที่เหมาะสม

ใช้ปลาไส้ตันและเกลือป่นในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก โดยใช้ปลา 250 กรัม เกลือป่น 125 กรัม นำมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน และบรรจุใส่ขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาพลาสติก นำไปบ่มที่อุณหภูมิประมาณ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นเติมเอนไซม์ 5′- PDE ที่ชอบเกลือโดยแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 0.5, 1.0 , 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) นำไปบ่มต่ออีกเป็นเวลา 24 สัปดาห์ สำหรับตัวอย่างควบคุม (control) จะเตรียมการหมักเช่นเดียวกันแต่ไม่เติมเอนไซม์ เก็บตัวอย่างน้ำปลาทุก ๆ 7 วัน ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ 5′-GMP ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Ikeda [14]

2.4.2 การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสม

ใช้ปลาไส้ตันและเกลือป่นในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก โดยใช้ปลา 250 กรัม เกลือป่น 125 กรัม นำมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน และบรรจุใส่ขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาพลาสติก นำไปบ่มที่อุณหภูมิประมาณ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือโดยแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 0.1, 0.5, 1.0 , 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) นำไปบ่มต่ออีกเป็นเวลา 24 สัปดาห์ สำหรับตัวอย่างควบคุม (control) จะเตรียมการหมักเช่นเดียวกันแต่ไม่เติมเอนไซม์ เก็บตัวอย่างน้ำปลา

ทุก ๆ 7 วัน ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ ได้แก่ acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Sanceda [2]

2.5 การหมักน้ำปลาโดยใช้เอนไซม์ 5′- PDE ร่วมกับเอนไซม์ไลเปส

การหมักน้ำปลาจะใช้ปลาไส้ตันและเกลือป่นในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก โดยใช้ปลา 250 กรัม เกลือป่น 125 กรัม บรรจุใส่ขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาพลาสติก นำไปบ่มที่อุณหภูมิประมาณ 35-37 องศาเซลเซียส หลังจากการหมักเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการเติมเอนไซม์ 5′- PDE และเอนไซม์ไลเปสความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 2.4 นำไปบ่มต่ออีกเป็นเวลา 24 สัปดาห์ สำหรับตัวอย่างควบคุม (control) จะเตรียมการหมักเช่นเดียวกันแต่ไม่เติมเอนไซม์ เก็บตัวอย่างทุก ๆ 7 วัน ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ 5′-GMP และกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ในการทดลองจะวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ 5′-GMP และกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ในน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดเพื่อเปรียบเทียบ

2.6. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

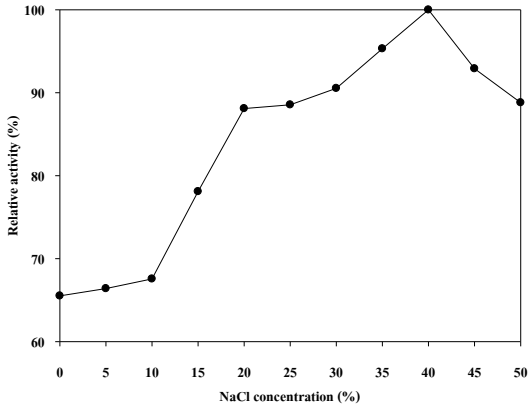
วิเคราะห์อิทธิพลของการเติมเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด คือ เอนไซม์ 5′-PDE และเอนไซม์ไลเปสต่อปริมาณสารประกอบ 5′-GMP และกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆจะใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

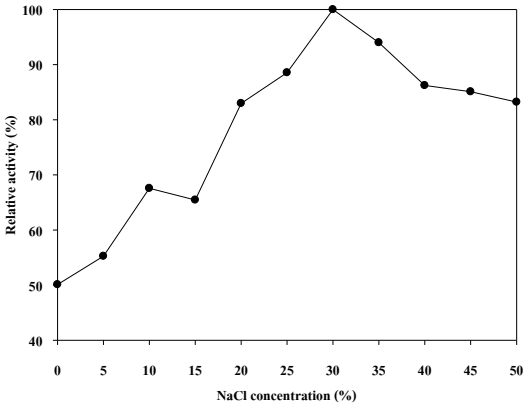
3.1 การศึกษาความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการศึกษาความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE และเอนไซม์ไลเปส พบว่า เอนไซม์ 5′-PDE และเอนไซม์ไลเปสสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้นของเกลือ NaCl 30 เปอร์เซ็นต์ และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะสามารถทำงานได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสูงสุดในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl ระหว่าง 20-50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในสภาวะที่ไม่มีเกลือเอนไซม์ก็ยังสามารถทำงานได้เช่นกันแต่การทำงานจะต่ำกว่าในสภาวะที่มีเกลือ (รูปที่ 1 และ 2) จากผลการทดลองนี้แสดงว่าในการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE และเอนไซม์ไลเปสจะต้องการเกลือ NaCl เพื่อให้การทำงานมีประสิทธิภาพสูงขึ้นหรือมีสมบัติเป็นเอนไซม์ที่ชอบเกลือ (halophilic enzyme) สมบัติการเป็นเอนไซม์ที่ชอบเกลือของเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะคล้ายกับเอนไซม์นิวคลีเอส H (nuclease H) จากแบคทีเรีย *Micrococcus varians* var. *halophilus* [15] และเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. No. 3241 [16] จากคุณสมบัติดังกล่าวเอนไซม์ทั้งสองชนิด จึงมีความเป็นไปได้สำหรับการนำไปใช้ร่วมกับการหมักน้ำปลาซึ่งมีสภาพความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 10-50 เปอร์เซ็นต์ โดยปล่อยให้เอนไซม์ที่ชอบเกลือเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายกรดไรโบนิวคลีอิคและไขมันในตัวปลาในตัวปลาให้เป็นสารประกอบ5′-GMP และกรดไขมันที่

ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ซึ่งจะช่วยทำให้น้ำปลามีกลิ่นและรสชาติที่ดีขึ้นได้ [2, 9, 14, 17, 18]



รูปที่ 1 ผลของความข้มข้นเกลือ NaCl ต่อกิจกรรมของ เอนไซม์ 5′-PDE



รูปที่ 2 ผลของความข้มข้นเกลือ NaCl ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

3.2 การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ 5′-PDE ที่เหมาะสม

การเติมเอนไซม์ 5′-PDE ที่ชอบเกลือร่วมกับการหมักน้ำปลาจะทำให้ปริมาณสารประกอบ 5′-GMP ในน้ำปลาเพิ่มสูงขึ้น ปริมาณสารประกอบ 5′-GMP ในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างจากน้ำปลาที่ไม่มีการเติมเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) น้ำปลาที่เติมเอนไซม์ 0.1 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณสารประกอบ 5′-GMP แตกต่างจากน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เกิดสารประกอบ 5′-GMP ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 1) จากผลการทดลองแสดงว่าการเติมเอนไซม์ 5′-PDE ที่ชอบเกลือที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปร่วมกับการหมักน้ำปลาจะทำให้ปริมาณสารประกอบ 5′-GMP ในน้ำปลาสูงกว่าการไม่เติมเอนไซม์ การเติมเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับการหมักน้ำปลาจะทำให้เกิดสารประกอบ 5′-GMP ในน้ำปลาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ 5′-PDE ที่ชอบเกลือสำหรับเติมลงไปร่วมกับการหมักน้ำปลาเพื่อเพิ่มปริมาณสารประกอบ 5′-GMP ในน้ำปลาคือการใช้เอนไซม์ 1.5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบ 5′-GMP ในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ 5′-PDE ที่ชอบเกลือร่วมกับการหมัก

5′-PDE concentration (%)	5′-GMP[1/] (mg/L)
0	29.20 [c]
0.1	32.80 [b]
0.5	33.02 [b]
1.0	34.45 [b]
1.5	43.91 [a]
2.0	44.70 [a]

หมายเหตุ [1/] = ตัวอักษรที่แตกต่างกันเหนือตัวเลขในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

3.3 การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสม

การเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือร่วมกับการหมักน้ำปลาจะทำให้ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ ในน้ำปลาเพิ่มสูงขึ้น ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้ง 6 ชนิดที่เกิดขึ้นในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ 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 ($P>0.05$) (ตารางที่ 2) จากผลการทดลองแสดงว่าการเติมเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปร่วมกับการหมักน้ำปลาจะทำให้ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ 6 ชนิด ได้แก่ acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid ในน้ำปลาสูงกว่าการไม่เติมเอนไซม์ การเติมเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับการหมักน้ำปลาจะทำให้เกิดกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้ง 6 ชนิด ในน้ำปลาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ สำหรับเติมลงไปร่วมกับการหมักน้ำปลาเพื่อเพิ่มปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ในน้ำปลาคือการใช้เอนไซม์ 1.0 เปอร์เซ็นต์

3.4 การหมักน้ำปลาโดยใช้เอนไซม์ 5′- PDE ร่วมกับเอนไซม์ไลเปส

การศึกษาปริมาณสารประกอบ 5′-GMP และปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ของน้ำปลาชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติเป็นเวลา 24 สัปดาห์ (FS) น้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์ 5′-PDE ร่วมกับเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ 1.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (HPHLFS) และน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาด (commercial fish sauce, C) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3

การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบ 5′-GMP ซึ่งเป็นสารเสริมรสชาติ (flavor enhancer) ในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ และมีส่วนช่วยทำให้น้ำปลามีรสชาติดีขึ้น[19] พบว่า น้ำปลา C และน้ำปลา HPHLFS มีปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่จะมีปริมาณสูงกว่าในน้ำปลา FS นั่นแสดงว่าการเติมเอนไซม์ 5′-PDE ที่ชอบเกลือร่วมกับการหมักน้ำปลาจะสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย RNA ในตัวปลาไปเป็นสารประกอบ 5′-GMP ได้ [9]

การเปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ ได้แก่ acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid ซึ่งเป็นกรดไขมันที่มีบทบาทต่อกลิ่นของน้ำปลา [2, 17, 18] พบว่า ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้ง 6 ชนิดของน้ำปลา HPHLFS จะมีปริมาณสูงกว่าน้ำปลา FS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แสดงว่าเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือน่าที่จะมีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันในตัวปลาไปเป็นกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่าง ๆ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้ง 6 ชนิดของน้ำปลา HPHLFS

กับน้ำปลา C พบว่าน้ำปลา C จะมีปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้งสูงกว่าน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ ซึ่งอาจเนื่องมาจากน้ำปลา C ใช้ระยะเวลาในการหมักนานกว่า โดยน้ำปลาที่วางขายในท้องตลาดมักจะใช้ระยะเวลาในการหมักนาน 12-18 เดือน ทำให้มีการสะสมของกรดอินทรีย์ที่ระเหยมากกว่าในน้ำปลา HPHLFS ซึ่งใช้เวลาในการหมักเพียงแค่ 24 สัปดาห์ (6 เดือน)

4. สรุปผลการวิจัย

การทดลองหมักน้ำปลาโดยเติมเอนไซม์ที่ชอบเกลือ 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ 5′-PDE (1.5 เปอร์เซ็นต์) และเอนไซม์ ไลเปส (1.0 เปอร์เซ็นต์) ลงไปร่วมกับการหมัก พบว่า ปริมาณสารประกอบ 5′-GMP และกรดไขมันที่ระเหยได้ของน้ำปลาที่เติมเอนไซม์จะมีปริมาณสูงกว่าน้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติ แสดงว่าเอนไซม์ที่ชอบเกลือทั้ง 2 ชนิด มีบทบาทในกระบวนการย่อยสลายสารประกอบต่าง ๆ ในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้กระบวนการทางเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในการปรับปรุงคุณภาพด้านกลิ่นและรสชาติของน้ำปลา

ตารางที่ 2 ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ (มิลลิกรัม / 100 มิลลิลิตร) ในน้ำปลาที่เติมเอนไซม์ไลเปสร่วมกับการหมัก

Lipase concentration (%)	Acetic acid[1/]	Propionic acid[1/]	Isobutyric acid[1/]	Butyric acid[1/]	Isovaleric acid[1/]	Valeric acid[1/]
0	75.50[d]	16.10[d]	4.26[d]	31.45[d]	19.33[d]	2.61[d]
0.1	71.70[c]	23.42[c]	7.41[c]	37.10[c]	23.11[c]	5.72[c]
0.5	74.02[b]	25.51[b]	9.62[b]	39.02[b]	25.25[b]	7.10[b]
1.0	81.35[a]	29.71[a]	12.65[a]	42.85[a]	29.01[a]	10.46[a]
1.5	81.51[a]	30.01[a]	12.72[a]	43.03[a]	30.01[a]	10.72[a]
2.0	81.60[a]	30.05[a]	12.75[a]	43.10[a]	30.13[a]	10.84[a]

หมายเหตุ [1/] = ตัวอักษรที่แตกต่างกันเหนือตัวเลขในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

ตารางที่ 3 ปริมาณสารประกอบ 5′-GMP และกรดไขมันที่ระเหยได้ของน้ำปลาที่ได้จากการเติมเอนไซม์ร่วมกับการหมัก

Fish sauce	5′-GMP[1/]	Volatile fatty acid (mg/100ml)					
	(mg/L)	Acetic[1/]	Propionic[1/]	Isobutyric[1/]	Butyric[1/]	Isovaleric[1/]	Valeric[1/]
FS	39.19[b]	74.50[c]	25.20[c]	4.24[c]	74.50[c]	19.33[c]	2.61[c]
HPHLFS	42.50[a]	90.50[b]	39.13[b]	12.80[b]	90.50[b]	30.05[b]	10.66[b]
C	43.04[a]	95.36[a]	49.06[a]	16.16[a]	95.36[a]	41.47[a]	13.15[a]

หมายเหตุ [1/] = ตัวอักษรที่แตกต่างกันเหนือตัวเลขในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

FS คือ น้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติ

HPHLFS คือ น้ำปลาที่หมักโดยมีการเติมเอนไซม์ 5′-PDE (1.5 เปอร์เซ็นต์) และเอนไซม์ไลเปส (1.0 เปอร์เซ็นต์)

C คือ น้ำปลาที่วางขายในท้องตลาด (commercial fish sauce)

5. เอกสารอ้างอิง

[1] R.C. McIver, R.J. Brodes and G.A. Reineccus. "Flavor of fermented fish sauce". J. Agr. Food Chem. 30 (1982) : 1017-1020.

[2] N. Sanceda, E. Suzuki and T. Kurata. "Branched chain amino acids as source of specific branched chain volatile fatty acids during the fermentation process of fish sauce". Amino Acids. 24 (2003) : 81-87.

[3] วีระสิทธิ์ กัลยากฤต, อนันต์ บุญปาน, Takahiro Ikeda และ สมพร โตใจ. "การใช้เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียทนเกลือ *Pseudomonas* sp. เพื่อผลิตสารเสริมรสชาติในน้ำปลา". *ใน* เรื่องเต็มการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ; 2546. น. 201-207.

[4] P. Ritthiruangdej and T. Suwonsichon. "Sensory properties of Thai fish sauces and their categorization". Kasetsart J. (Nat. Sci.) 40 (Suppl.) (2006) : 181 – 191.

[5] N. Sanceda, T. Kurata and N. Arakawa. "Accelerated fermentation process for the manufacture of fish sauce using histidine". J. Food Sci. 61(1996) : 220-222, 225.

[6] T. Ok, T. Matsukura, Z. Ooshiro, S. Hayashi and T. Itakura. "Study on the use of halophilic bacteria in production of fish sauce". J. Jap. Soc. Food Sci. Technol. 29 (10) (1982b): 623-627.

[7] วรรณา พรเศรษฐคุณ. "การคัดเลือกสายพันธุ์และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดต้องการเกลือเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมหมัก". วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2534.

[8] T. Nakano, H. Watanabe, H. Hata, D.V. Qua and T. Miura. "An application of protease produced by a moderately halophilic marine bacterium to fish sauce processing". Bull. Jap. Soc. Fish. 52 (9) (1986) : 1581-1587.

[9] อนันต์ บุญปาน, สิริแข พงษ์สวัสดิ์ และ เมทินี มาเวียง. "การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรสจากน้ำปลาดิบ". วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มทร.ธัญบุรี. 5 (1) (2558) : 43-52.

[10] W. Kanlayakrit and A. Boonpan. "Screening of halophilic lipase-producing bacteria and characterization of enzyme for fish sauce quality improvement". Kasetsart J. (Nat. Sci.). 41 (2007) : 576-585.

[11] วัชรีวรรณ บุญส่งศรี, อนันต์ บุญปาน และ สิริแข พงษ์สวัสดิ์. "การศึกษาการผลิตเอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรสจากแบคทีเรียทนเกลือ *Bacillus* sp. RMUT

001". วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มทร.ธัญบุรี. 3 (2) (2556) : 27- 37.

[12] M. Fujimoto, A. Kuninaka, and H. Yoshino, "Purification of a nuclease from *Penicillium citrinum*". Agric. Biol. Chem.38 (1974) : 83-777.

[13] H. Horani. "Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipase". World J. Microbiol. Biotechnol. 12 (1996) : 399-401.

[14] T. Ikeda. "Characterization of extracellular halophilic ribonuclease from halotolerant *Pseudomonas* sp.". M.S. thesis, Kasetsart University. 2000.

[15] M. Kamekura and H. Onishi . Properties of the halophilic nuclease of a moderately halophile, *Micrococcus varians* subsp. *halophilus*. J. Bacteriol. 133 (1) (1978) : 59-65.

[16] W. Kanlayakrit, T. Ikeda, S. Tojai, P. Bavornreungroj and A. Boonpan. " Production and characterization of extracellular halophilic ribonuclease from halotolerant *Pseudomonas* sp." Bulletin of National Pintung University of Science and Technology. 10 (4) (2001): 281-289.

[17] J. Dougan and G.E. Howard. "Some flavouring constituents of fermented fish sauces". J. Sci. Food Agric. 26 (1975) : 887-894

[18] R.C. McIver, R.J. Brodes and G.A. Reineccus. "Flavor of fermented fish sauce". J. Agr. Food Chem. 30 (1982) : 1017-1020.

[19] A. Kuninaka, M. Kibi, H. Yoshino and K. Sahaguchi. "Studies on 5′-phosphodiesterases in microorganisms. Part 2. Properties and application of *Penicillium citrinum* 5′- phosphodiesterase". Agric. Biol. Chem. 25 (1961) : 693-701.