

(ฉบับสมบูรณ์)

รหัสโครงการ SUT3-305-49-24-16



รายงานการวิจัย

การใช้เอนไซม์จากปลาและกล้าเชื้อแบคทีเรียในกระบวนการหมักน้ำปลา
(The use of endogenous proteinase and bacterial starter cultures for
fish sauce fermentation)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-305-49-24-16



รายงานการวิจัย

การใช้เอนไซม์จากปลาและกล้าเชื้อแบคทีเรียในกระบวนการหมักน้ำปลา (The use of endogenous proteinase and bacterial starter cultures for fish sauce fermentation)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุรลักษณ์ รอดทอง

สาขาวิชาจุลชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549-2550

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กรกฎาคม 2555

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือและห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ 1 และ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ และบริษัทอุตสาหกรรมน้ำปลาระยองที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเกลือสมุทร และตัวอย่างปลา ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีความสำคัญที่สุดสำหรับงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณบริษัทอีสต์เอเซียติกที่ให้ความอนุเคราะห์เอนไซม์โปรตีนเอสที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณคณะผู้ช่วยวิจัย และนักศึกษาบัณฑิตในโครงการ ที่อุทิศตน และมุ่งมั่นในการทำวิจัยด้วยความอดสาหัส



บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์โดยรวมของงานวิจัยนี้คือพัฒนากระบวนการผลิตที่สามารถลดระยะเวลาการหมักน้ำปลาโดยใช้เทคโนโลยีกล้ำเชื้อร่วมกับเอนไซม์ทางการค้าและเอนไซม์ในตัวของปลา กิจกรรมที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายตัวเองของปลากระตัก (*Stolephorus* spp.) เมื่อพิจารณาจากระดับการย่อยสลายโปรตีนและกิจกรรมโปรตีนเอสในปลา คือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โปรตีนเอสที่คล้ายทริปซิน (Trypsin-like proteinases) เป็นโปรตีนสกุลหลักที่มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายตัวเองของปลากระตัก

แบคทีเรียกรดแล็กติก 2 ไอโซเลท คือ MS33 และ MCD10-5-10 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำปลาหมักเดือนที่ 1 และ 5 มีรูปร่างเซลล์กลม เรียงตัวเป็นคู่ (Pairs) และแบบสี่เซลล์ (Tetrads) สามารถเจริญได้ ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0-25% และเจริญได้ดีที่เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5-10% มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene เหมือนกับ *Tetragenococcus halophilus* ATCC 33315 99.0% จึงระบุได้ว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 2 ไอโซเลทนี้เป็นชนิด *T. halophilus* อย่างไรก็ตามทั้ง 2 สายพันธุ์มีความแตกต่างในการผลิตเอนไซม์ และแบบแผนการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ รวมถึงความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 2 สายพันธุ์ (*T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10) ในอาหาร Fish broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% และวิเคราะห์องค์ประกอบของสารระเหยด้วยวิธี Purge and trap ควบคู่กับการแยกสารและระบุชนิดของสารด้วยเทคนิค Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) พบว่าสามารถสร้างสารประกอบแอลกอฮอล์ ได้แก่ Isopropyl alcohol, 1-Propanol, 1-Butanol, 1-Penten-3-ol, 3-Methyl-1-butanol, 1-Pentanol และ 1-Hexanol แบคทีเรียกรดแล็กติก *T. halophilus* MS33 สร้าง 2-Methylpropanal ในปริมาณที่มากกว่าตัวอย่างควบคุม ($p < 0.05$) สายพันธุ์ MS33 นี้มีแนวโน้มสร้างสารระเหยที่ให้กลิ่นเนื้อมีผลึกไขมันที่ปริมาณเกลือสูง 25% และไม่สร้าง Dimethyl disulfide ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นอูจจาระ

การเร่งกระบวนการหมักน้ำปลาด้วยเอนไซม์ทางการค้าร่วมกับการใช้แบคทีเรียกรดแล็กติกคือ *T. halophilus* MCD 10-5-10 และ *T. halophilus* MS33 โดยการย่อยปลากระตักด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase 2.4L) ในระดับ 0.25% และเอนไซม์เฟโวไซม์ (Flavouzyme 500L) ในระดับ 0.5% น้ำปลาที่ได้มีมาตรฐานเทียบเท่ากับน้ำปลาชั้นที่ 1 หลังจากการหมักเป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่าจำนวนแบคทีเรียลดลงจากวันเริ่มต้น 3-4 Log CFU/ มิลลิลิตร ในเดือนที่ 2 และไม่สามารถตรวจนับแบคทีเรียได้ในเดือนที่ 3 แต่อย่างไรก็ตามปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนที่เติมกล้ำเชื้อ *T. halophilus* มีค่าสูงกว่าตัวอย่างควบคุม

โดยอยู่ในช่วง 704-727 มิลลิโมลาร์ ($p < 0.05$) ตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้ำเชื้อ *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 มีปริมาณฮีสตามีนต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม ($p < 0.05$) ตรวจไม่พบ Dimethyl disulfide ในตัวอย่างการเติมกล้ำเชื้อ *T. halophilus* MCD10-5-10 ในน้ำปลา จากผลการทดสอบความชอบ กลิ่น และการยอมรับรวมของน้ำปลาที่เติมกล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกไม่ต่างจากตัวอย่างทางการค้าที่หมักเป็นเวลา 12 เดือน ($p > 0.05$)

ทดสอบการหมักน้ำปลาด้วยการเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองของปลากระตักพร้อมกับการใช้กล้ำเชื้อแบคทีเรีย *T. halophilus* MCD10-5-10 และ *T. halophilus* MS33 โดยบ่มปลากระตักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนกระบวนการหมักน้ำปลา พบว่าการเติมกล้ำเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทในตัวอย่างที่ผ่านการบ่มสามารถเร่งการย่อยสลายในช่วง 3 เดือนแรกของการหมัก และเมื่อหมักเป็นเวลา 7 เดือน ตัวอย่างที่ผ่านการบ่มก่อนการเติมกล้ำเชื้อ *T. halophilus* MS33 และตัวอย่างควบคุมที่ไม่ผ่านการเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองมีปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนสูงสุด ($p < 0.05$) ตัวอย่างที่ไม่ผ่านการเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองและเติมกล้ำเชื้อ *T. halophilus* MCD10-5-10 มีปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนน้อยกว่าตัวอย่างควบคุม ($p < 0.05$) หากไม่มีการใช้กล้ำเชื้อการบ่มปลา ก่อนการหมักไม่ได้ช่วยเร่งกระบวนการหมัก ปริมาณฮีสตามีนในทุกตัวอย่างอยู่ในช่วง 12.91-16.22 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าที่ไม่เกินค่ามาตรฐาน 20 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร ดังนั้นการหมักน้ำปลาด้วยการเติมกล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกและเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองของปลากระตักก่อนการหมักเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถเร่งกระบวนการหมักน้ำปลาได้

Abstract

Overall objective of this research was to develop a process that can reduce fermentation time using starter culture in conjunction with commercial enzyme or fish endogenous proteinases. Optimum autolytic activity of Indian anchovy based on the extent of proteolysis and endogenous proteolytic activity was at 50°C, 10%NaCl for 4 h. Trypsin-like proteases were mainly expressible for autolytic activity.

Two isolate, MS33 and MCD10-5-10, of lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermented for 1 and 5 months were cocci with pairs/tetrads. They grew at 0-25% NaCl with optimum NaCl concentration of 5-10 %. The result of 16S rRNA gene sequences showed homology to *T. halophilus* ATCC 33315 at 99.0%. Thus, these isolates were identified as *T. halophilus*. However, both strains showed variation in enzyme production and sugar fermentation pattern as well as growth at 45°C.

Two strains of lactic acid bacteria (*T. halophilus* MS33 and *T. halophilus* MCD10-5-10) were cultured in fish broth containing 25%NaCl and volatile compounds were analyzed by purge and trap equipped with Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) for identification. These isolates produced alcohols including isopropyl alcohol, 1-propanol, 1-butanol, 1-penten-3-ol, 3-methyl-1-butanol, 1-pentanol, and 1-hexanol. Isolate MS33 produced 2-methylpropanal more than the control ($p<0.05$). This isolate produced volatile compounds providing “meaty” note at high salt content of 25%. Dimethyl disulfide, a compound attributing to fecal note, was not detected in the sample added *T. halophilus* MS33.

Acceleration of fish sauce fermentation using 0.25%Alcalase 2.4L and 0.5%Flavozyme 500L in combination with a starter culture of *T. halophilus* MCD10-5-10 and *T. halophilus* MS33 was investigated. The first grade fish sauce was obtained after 6 months of fermentation. Lactic acid bacterial counts of inoculated samples decreased 3-4 Log CFU/ml at 2 months of fermentation and were not detected after 3 months. α -Amino contents of 6-mo-old fish sauce samples were 704-727 mM and higher than the control ($p<0.05$). Addition of *T. halophilus* MS33 and *T. halophilus* MCD10-5-10 resulted in lower histamine content than the control ($p<0.05$). Dimethyl disulfide was not detected in the fish sauce sample added *T. halophilus* MCD10-5-10. Based on the liking test, odor and overall

acceptance of fish sauce fermented using lactic acid bacteria cultures were not different from those of the traditionally-fermented fish sauce ($p>0.05$).

Fish sauce fermentation using pre-autolysis in combination with a starter culture of *T. halophilus* MCD10-5-10 and *T. halophilus* MS33 was investigated. Autolysis was induced at 40°C, 10%NaCl for 4 h before fermentation. Pretreatment of autolysis and addition both of starter cultures induced degree of hydrolysis within the first 3 months of fermentation. After 7 months, the sample pretreated with autolysis and adding *T. halophilus* MS33 and the control sample without pre-autolysis (no starter culture added) exhibited higher α -Amino content ($p<0.05$). The sample without pre-autolysis in combination with *T. halophilus* MCD10-5-10 showed lower α -Amino content than the control ($p<0.05$). Pre-autolysis without starter culture did not accelerate fermentation. Histamine content of all samples ranged 12.91-16.22 mg/100 ml, which did not exceed an allowable limit of 20 mg/100 mL. Therefore, the use of lactic acid bacterial starter culture in conjunction with pre-autolysis could be an alternative means to accelerate fish sauce fermentation.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อไทย	ข
บทคัดย่ออังกฤษ	ง
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
ขอบเขตงานวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	4
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	
2.1 น้ำปลา	5
2.2 เอนไซม์จากตัวปลา	5
2.3 จุลินทรีย์ในกระบวนการหมักน้ำปลา	11
2.4 แบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria)	12
2.5 องค์ประกอบของสารระเหยในน้ำปลา	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 การย่อยสลายตัวเองของปลากระตัก	19
3.2 การระบุชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา และการใช้ประโยชน์กล้าเชื้อในการหมักน้ำปลา	21
3.3 การใช้กล้าเชื้อจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำปลา และการย่อยสลายตัวเองในกระบวนการหมักน้ำปลา	33
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
4.1 ผลการศึกษาการย่อยสลายตัวเองของปลากระตัก	35

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ โอลิโกเปปไทด์	35
4.1.2 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของโปรตีน	36
4.2 ผลการศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติก	45
4.2.1 การระบุชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือก	45
4.2.2 ความสามารถสร้างสารระเหยในอาหาร Fish broth	50
4.2.3 การใช้แบคทีเรียกรดแล็กติกในการหมักน้ำปลา	51
4.3 ผลการศึกษาการหมักน้ำปลาโดยใช้ก้านเชื้อจากแบคทีเรียกรดแล็กติกร่วมกับการใช้โปรตีนจากปลากระตัก	63
บทที่ 5 บทสรุป	
5.1 สรุปผลการวิจัย	72
5.2 ข้อเสนอแนะ	73
บรรณานุกรม	74
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	88
ภาคผนวก ข	94
ภาคผนวก ค	96
ประวัตินักวิจัย	106



สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	เอนไซม์โปรตีนในกล้ามเนื้อปลาชนิดต่างๆ	8
2.2	ความแตกต่างทางสรีรวิทยาระหว่างสกุล <i>Tetragenococcus</i> และ <i>Pediococcus</i>	14
2.3	สมบัติทางสรีรวิทยาและการใช้น้ำตาลของแบคทีเรียกรดแล็กติกในสกุล <i>Tetragenococcus</i> 4 ชนิด	16
3.1	Universal primers สำหรับเพิ่มจำนวน 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction	27
4.1	ลักษณะทางสัณฐานและผลทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติก 2 ไอโซเลท และ <i>T. halophilus</i> ATCC 33315	47
4.2	ปริมาณสารระเหยสัมพันธ์ตัวอย่าง Fish broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% และเติมแบคทีเรียกรดแล็กติก บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน	52
4.3	ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนของตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกลูตาเมตบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน	53
4.4	ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในน้ำปลาที่หมักโดยใช้กลูตาเมตแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 6 เดือน	56
4.5	คุณสมบัติทางเคมีของน้ำปลาที่หมักโดยกลูตาเมตแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 6 เดือน	57
4.6	ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (Free amino acid, มก./100 มล.) ในตัวอย่างน้ำปลาที่หมักด้วยกลูตาเมตแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 6 เดือน และหมักทางการค้าเป็นเวลา 12 เดือน	58
4.7	ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด (Total amino acid, มก./100 มล.) ในตัวอย่างน้ำปลาที่หมักด้วยกลูตาเมตแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 6 เดือน และหมักทางการค้าเป็นเวลา 12 เดือน	59
4.8	ปริมาณสารระเหยสัมพันธ์กับสารมาตรฐานภายในของน้ำปลาหมักด้วยกลูตาเมตแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 6 เดือน เทียบกับตัวอย่างทางการค้าที่หมักเป็นเวลา 12 เดือน	61
4.9	คะแนนความชอบต่อตัวอย่างน้ำปลาเติมกลูตาเมตแบคทีเรียกรดแล็กติกที่หมักเป็น	63

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
	เวลา 6 เดือน เทียบกับตัวอย่างทางการค้าที่หมักเป็นเวลา 12 เดือน	
4.10	ระดับการย่อยสลายตัวเองของปลากระดักเมื่อบ่มที่ 40 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง	64
4.11	การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในช่วง 3 เดือนแรกของการหมัก ในตัวอย่างน้ำปลาบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และไม่บ่ม โดยหมักด้วยก้านเชื้อ <i>T. halophilus</i> MCD 10-5-10 และ <i>T. halophilus</i> MS33	65
4.12	คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของตัวอย่างน้ำปลาที่เติมก้านเชื้อ <i>T. halophilus</i> MCD 10-5-10 และ <i>T. halophilus</i> MS33 ของปลาผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และปลาที่ไม่ได้บ่มก่อนการหมัก	70
4.13	ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนของตัวอย่างน้ำปลาที่เติมก้านเชื้อ <i>T. halophilus</i> MCD 10-5-10 และ <i>T. halophilus</i> MS33 ของปลาผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และปลาที่ไม่ได้บ่มก่อนการหมัก	71
ค1	ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ในรูปปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α -Amino group content) ในตัวอย่างปลากระดักที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35, 50 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆ	96
ค2	กิจกรรมโปรตีนสกลุ่ม Trypsin-like ในตัวอย่างปลากระดักที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35, 50 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆ	98
ค3	กิจกรรมโปรตีนสกลุ่ม Chymotrypsin-like ในตัวอย่างปลากระดักที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35, 50 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆ	100
ค4	กิจกรรมโปรตีนสกลุ่ม Cathepsin L-like ในตัวอย่างปลากระดักที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35, 50 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆ	102

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ค5	กิจกรรมโปรตีนสกลุ่ม L-leucine aminopeptidase ในตัวอย่างปลากะตักที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35, 50 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆ	104



สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ขั้นตอนการผลิตน้ำปลา	6
4.1	ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ในรูปของปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α -Amino group) ในตัวอย่างปลากะตักที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 (a), 50 (b) และ 65 องศาเซลเซียส (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ	37
4.2	กิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่ม Trypsin-like ในตัวอย่างปลากะตักที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 (a), 50 (b) และ 65 องศาเซลเซียส (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ	39
4.3	กิจกรรมของเอนไซม์ Chymotrypsin-like ในตัวอย่างปลากะตักที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 (a), 50 (b) และ 65 องศาเซลเซียส (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ	41
4.4	กิจกรรมของเอนไซม์ Cathepsin L-like ในตัวอย่างปลากะตักที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 (a), 50 (b) และ 65 องศาเซลเซียส (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ	42
4.5	กิจกรรมของเอนไซม์ Luecine aminopeptidase ในตัวอย่างปลากะตักที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 (a), 50 (b) และ 65 องศาเซลเซียส (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ	44
4.6	สัณฐานวิทยาของเซลล์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกจำนวน 2 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างจากบ่อหมักน้ำปลาเดือนที่ 1 (a) และ 5 (b) และ <i>T. halophilus</i> ATCC 33315 (c) ข้อมสี่เซลล์ (ลูกศร) แบบแกรม ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ (Bar = 1 μ m)	46
4.7	ผลผลิต PCR ของ 16S rRNA gene ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย Primers fD1/rP2; Lane M คือ 1 kb DNA Ladder (Fermentas life sciences) เป็น Molecular weight markers; 2 คือ MS33; 5 คือ MCD10-5-10; 8 คือตัวอย่างควบคุมเชิงลบ	49
4.8	Phylogenetic tree ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เป็นสายพันธุ์คัดเลือก 2 สายพันธุ์ และสายพันธุ์จาก NCBI nucleotide sequence database (U.S.A.) ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene (Partial sequence) โดยใช้วิธี Maximum Parsimony ตัวเลขที่ Branch เป็นค่า Bootstrap จาก 1,000 replications	49
4.9	การเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียตรวจนับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (a) และ JCM 168 (b) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 18% ระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา	54

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.10	แบคทีเรียที่ตรวจนับได้จากระบบการหมักปลาในห้องปฏิบัติการ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ JCM 168 (a) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 18% และนำมาทดสอบการเจริญบนอาหาร MRS agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 18% (b)	55
4.11	ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ในรูป (a)ไทโรซีน และ (b)กลุ่มแอลฟาอะมิโน (α -Amino group content) ในตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกลิ่นเชื้อ <i>T. halophilus</i> MCD10-5-10 โดยปลาผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และปลาที่ไม่ผ่านการบ่ม ก่อนการหมักน้ำปลา ที่ระยะเวลาต่างๆ	68
4.12	ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ในรูป (a)ไทโรซีน และ (b)กลุ่มแอลฟาอะมิโน (α -Amino group content) ในตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกลิ่นเชื้อ <i>T. halophilus</i> MS33 โดยปลาผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และปลาที่ไม่ผ่านการบ่ม ก่อนการหมักน้ำปลา ที่ระยะเวลาต่างๆ	69

คำอธิบายสัญลักษณ์

ANOVA	Analysis of variance
α	Alfa
bp	Base pair
CFU	Colony forming unit
cm	Centrimeter
°C	Degree Celsius
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	Deoxycytidine triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
dTTP	Deoxythymidine triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
et al.	et alia (and others)
mg	Milligram
h	Hour
ml	Milliliter
μ l	Microliter
mM	Millimolar
mmol	Millimole
μ mol	Micromole
%	Percentage
PCR	Polymerase chain reaction
rpm	Revolution per minute
s	Second
sp.	Species

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาการทำวิจัย

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกน้ำปลาเป็นอันดับ 1 ของโลก มีกำลังการผลิตเพื่อบริโภคภายในประเทศ 95% คิดเป็นมูลค่า 7,000-8,000 ล้านบาท/ปี และผลิตเพื่อการส่งออกอีก 5% คิดเป็นมูลค่ากว่า 1,000 ล้านบาทต่อปี (<http://www.manager.co.th>) ด้วยกระแสความนิยมบริโภคอาหารไทยในต่างประเทศ ปริมาณการส่งออกน้ำปลาจึงขยายตัวอย่างต่อเนื่องซึ่งในปี พ.ศ. 2551 มูลค่าการส่งออกน้ำปลา 1,019.99 ล้านบาท เพิ่มขึ้นจากปีที่ผ่านมา 18.31% ปัจจุบันน้ำปลาในตลาดโลกมีการแข่งขันมากขึ้นโดยคู่แข่งสำคัญ คือ เวียดนาม และฟิลิปปินส์ ซึ่งมีข้อได้เปรียบในด้านแรงงานและวัตถุดิบ (<http://fic.nfi.or.th>) การผลิตน้ำปลาในประเทศไทยยังคงอาศัยกระบวนการผลิตแบบดั้งเดิม โดยคลุกเคล้าน้ำปลาจะตัก (*Stolephorus* spp.) ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักกับเกลือในอัตราส่วนโดยประมาณ 3 ต่อ 1 และหมักในบ่อซีเมนต์ที่ฝังอยู่ในพื้นดินใช้ระยะเวลาการหมัก 12-18 เดือน กระบวนการย่อยสลายโปรตีนปลาเกิดขึ้นโดยธรรมชาติ โดยเอนไซม์จากตัวปลา (Endogenous proteinases) และ/หรือ โปรตีนจากจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากแบคทีเรีย (Bacterial proteinases) ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในระหว่างกระบวนการหมัก จากลักษณะการผลิตที่พึ่งพาธรรมชาติ ทำให้เกิดปัญหาในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ ปัญหาในด้านต้นทุนการผลิตเนื่องจากต้องใช้พื้นที่จำนวนมากและใช้เวลานาน และปัญหาในการจัดการกระบวนการผลิตให้ถูกสุขลักษณะ ปัญหาเหล่านี้เป็นข้อจำกัดต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมน้ำปลา และยังเป็นอุปสรรคในการส่งออกน้ำปลาและเพื่อแข่งขันในตลาดโลก

การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำปลาให้ใช้เวลาในการหมักสั้นลง และสามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ได้นั้น เป็นยุทธศาสตร์สำคัญต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมน้ำปลาของประเทศ ได้มีการศึกษาการลดระยะเวลาการหมักน้ำปลาทั้งจากนักวิจัยไทยและต่างประเทศมากมาย ซึ่งสามารถสรุปวิธีการเร่งกระบวนการหมักได้ 3 แนวทางคือ (1) การใช้กรด (2) การใช้เอนไซม์โปรตีนสทางการค้าหรือการเร่งโปรตีนสในตัวปลา และ (3) การใช้จุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการนำแนวทางเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม ทั้งนี้เนื่องจากการใช้กรดแต่เพียงอย่างเดียวทำให้คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ที่ได้เปลี่ยนไป Gildberg et al. (1984) พบว่าการใช้กรดอะซิติกและไฮโดรคลอริก ที่ pH 4 สามารถลดระยะเวลาในการผลิตน้ำปลาลงเหลือ 2 เดือน อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่มีกลิ่นรสของน้ำปลา แต่มีปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้ (Soluble nitrogen) สูง ในปัจจุบันมี

รายงานว่าการใช้กรดไฮโดรคลอริกเพื่อเร่งการย่อยสลายโปรตีนจากถั่วเหลืองภายใต้อุณหภูมิและความดันสูงในการผลิตซอสปรุงรส ส่งผลให้เกิดสาร 3-Monochloro propane-1,2-diol (3-MCPD) ซึ่งมีหลักฐานบ่งชี้ว่าเป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง ดังนั้นแนวทางในการใช้กรดในกระบวนการผลิตน้ำปลาจึงอาจไม่เหมาะสม ส่วนการเติมเอนไซม์เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเร่งกระบวนการผลิตน้ำปลา Beddows and Ardeshir (1979) พบว่าการใช้โพรมิเลนสามารถลดระยะเวลาในการผลิตน้ำปลาลงเหลือ 18-21 วัน อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์โปรตีนสกัดจากถั่วเพียงอย่างเดียว ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างไปจากน้ำปลาที่หมักแบบธรรมชาติและยังเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิต ส่วนการใช้จุลินทรีย์นั้นยังไม่มีการศึกษาเลือกสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งที่แน่นอนและยังไม่มีการศึกษาในลักษณะของกล้าเชื้อ (Starter culture) เพื่อให้สามารถนำไปใช้ได้จริงในระดับอุตสาหกรรม

เพื่อให้การย่อยสลายโปรตีนเกิดเร็วขึ้น จำเป็นต้องเพิ่มโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมัก โดยชนิดและปริมาณที่เพิ่มนั้นจะต้องเหมาะสม การเพิ่มกิจกรรมของโปรตีนสกัดใช้แนวทางการผสมผสานระหว่างโปรตีนสกัดจากถั่วปลา และ/หรือโปรตีนสกัดจากถั่วร่วมกับโปรตีนสกัดจากจุลินทรีย์ในลักษณะกล้าเชื้อ ซึ่งเอนไซม์จากปลากระดูกมีบทบาทสำคัญต่อการย่อยโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา โดยพบว่าเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายทริปซิน (Trypsin-like proteinase) แสดงกิจกรรมสูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส และ pH 8.5 (Siringan et al., 2006b) แสดงกิจกรรมตลอดระยะเวลาหมัก 12 เดือน แสดงว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีเสถียรภาพสูงแม้ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% นอกจากนี้เอนไซม์ในกลุ่มทริปซิน ยังเป็นเอนไซม์ที่อาจมีบทบาทต่อการย่อยสลายโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักอีกด้วย จะเห็นได้ว่าแนวทางหนึ่งในการเร่งกระบวนการหมักน้ำปลาคือการเร่งกิจกรรมของ Trypsin-like proteinase ให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนตลอดระยะเวลาการหมัก อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาที่ศึกษาบทบาทของโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาอย่างเป็นระบบ ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นพื้นฐานสำคัญต่อการพัฒนากระบวนการผลิตน้ำปลาในอนาคต

แบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria) เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักน้ำปลา ซึ่งช่วยทำให้เกิดสี กลิ่นรส และรสชาติที่ดีในผลิตภัณฑ์น้ำปลา (Saisithi, 1994) อย่างไรก็ตามการศึกษาระบวนการเกิดกลิ่นรสและสารระเหยที่เกิดจากแบคทีเรียกรดแล็กติกในกระบวนการหมักน้ำปลายังไม่ทราบแน่ชัด มีรายงานว่า เอนไซม์ Aminopeptidases ในแบคทีเรียกรดแล็กติกมีผลเพิ่มกรดอะมิโนในผลิตภัณฑ์ (Christensen et al., 1999) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ทำให้เกิดกลิ่นรสในกระบวนการหมัก (Peralta et al., 1996; Smit et al., 2005) Intracellular aminopeptidases เป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่ทำให้เกิดกลิ่นรสจากกระบวนการหมักที่ใช้แบคทีเรียกรดแล็กติก เช่น *Lactobacillus sake*, *Lb. plantarum* และ *Lb. curvatus* ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นรสในกระบวนการหมักไส้กรอก และเนยแข็ง Leucyl aminopeptidase จาก

Lb. curvatus มีกิจกรรมสูงทำให้ได้กรดอะมิโนลูซีน (Leucine) (Magboul and McSweeney, 1999) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายของลูซีนคือ 2-Methylbutanal, 3-Methylbutanal และ 3-Methylbutanol ซึ่งเป็นสารระเหยที่ช่วยทำให้เกิดกลิ่นเนยแข็ง (Cheesy) และ กลิ่นเนื้อ (Meaty) (Masson et al., 1999) ดังนั้นแบคทีเรียกรดแล็กติกจึงมีบทบาทต่อการเกิดกลิ่นรสของน้ำปลา

ในการเร่งกระบวนการหมักอาจสามารถทำได้โดยการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ในตัวปลา ร่วมกับกลิ่นเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ทำให้เกิดกลิ่นรส ปลาจะตากเป็นปลาที่มีกิจกรรมเอนไซม์โปรตีนสลายสูงตามธรรมชาติ แต่กระบวนการหมักที่ความเข้มข้นของเกลือที่สูงมีผลจำกัดกิจกรรมของโปรตีนเนส ดังนั้นการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งกิจกรรมของเอนไซม์จากตัวปลาในระหว่างกระบวนการหมัก จะทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ได้สูงสุด ซึ่งอาจทำให้สามารถลดระยะเวลาการย่อยสลายโปรตีนได้ จากนั้นจึงเติมกลิ่นเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียกรดแล็กติกเพื่อเพิ่มกลิ่นรส นอกจากนี้การผสมผสานเทคโนโลยีทางด้านเอนไซม์และกลิ่นเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกใน กระบวนการผลิตน้ำปลา จะทำให้เกิดการปฏิวัติอุตสาหกรรมน้ำปลาดังเช่นในอุตสาหกรรมซีอิ๊วญี่ปุ่น ในระยะยาวต้นทุนการผลิตจะลดลงเนื่องจากสามารถใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบได้อย่างคุ้มค่า คือเกิดการย่อยสลายได้สูงสุดจากเอนไซม์และจากกลิ่นเชื้อ นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมและปรับปรุงกระบวนการผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายตัวเอง (Autolysis) ของปลาทะตัก และกลุ่มของโปรตีนเนสที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายตัวเอง
2. คัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแล็กติกที่สร้าง โปรตีนเนสได้สูง และสร้างสารระเหยที่ให้กลิ่นรสที่ดีในน้ำปลา
3. ศึกษาการใช้เอนไซม์ทางการค้า และแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกได้ในการผลิตน้ำปลาในระดับห้องปฏิบัติการ
4. ศึกษาการใช้กลิ่นเชื้อจากแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกได้จากน้ำปลาร่วมกับการใช้เอนไซม์จากปลาทะตักในกระบวนการหมักน้ำปลาในระดับห้องปฏิบัติการ

ขอบเขตงานวิจัย

1. ตัวอย่างที่ศึกษาคือปลาทะตัก (*Stolephorus* spp.) โดยศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 15 % และอุณหภูมิ 35, 50 และ 65 องศาเซลเซียส ต่อการย่อยสลายตัว

เองของปลากระดูก (Autolysis) สุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ที่ 0, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

2. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ สมบัติทางชีวเคมีและการสร้างแก๊สจากการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแล็กติก วิเคราะห์สารพันธุกรรมของแบคทีเรียในส่วนของ 16S rRNA gene พร้อมทั้งวิเคราะห์องค์ประกอบของสารระเหยด้วยวิธี Purge and trap ควบคู่กับการแยกสารและระบุชนิดของสารด้วยเทคนิค Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS)
3. ศึกษาการใช้ประโยชน์จากกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกคือ *T. halophilus* MCD 10-5-10 และ *T. halophilus* MS33 ร่วมกับการใช้เอนไซม์ทางการค้า คือ อัลคาเลส (Alcalase 2.4L) และเฟโวไซม์ (Flavozyme 500L) โดยศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์และเคมีของการหมักน้ำปลาเป็นระยะเวลา 6 เดือน
4. ศึกษาการใช้ประโยชน์จากกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกในการหมักน้ำปลาคือ *T. halophilus* MCD 10-5-10 และ *T. halophilus* MS33 วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมักคือ ปลากระดูกสด และปลากระดูกที่ผ่านการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส ที่มีเกลือ โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์และเคมีของการหมักน้ำปลาเป็นระยะเวลา 7 เดือน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ทราบปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายตัวเอง (Autolysis) ของปลากระดูก และกลุ่มของโปรตีนที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายตัวเอง ได้สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแล็กติกที่สร้างโปรตีนสได้สูง และสร้างสารระเหยที่ให้กลิ่นรสดีในน้ำปลา พร้อมทั้งได้ทราบกระบวนการเร่งการผลิตน้ำปลาที่สามารถประหยัดต้นทุน พลังงาน และเวลา ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ คือ ผู้ประกอบการน้ำปลา กรมประมง สถาบันวิจัย และสถานศึกษาที่ค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับน้ำปลา

บทที่ 2

การทบทวนเอกสาร

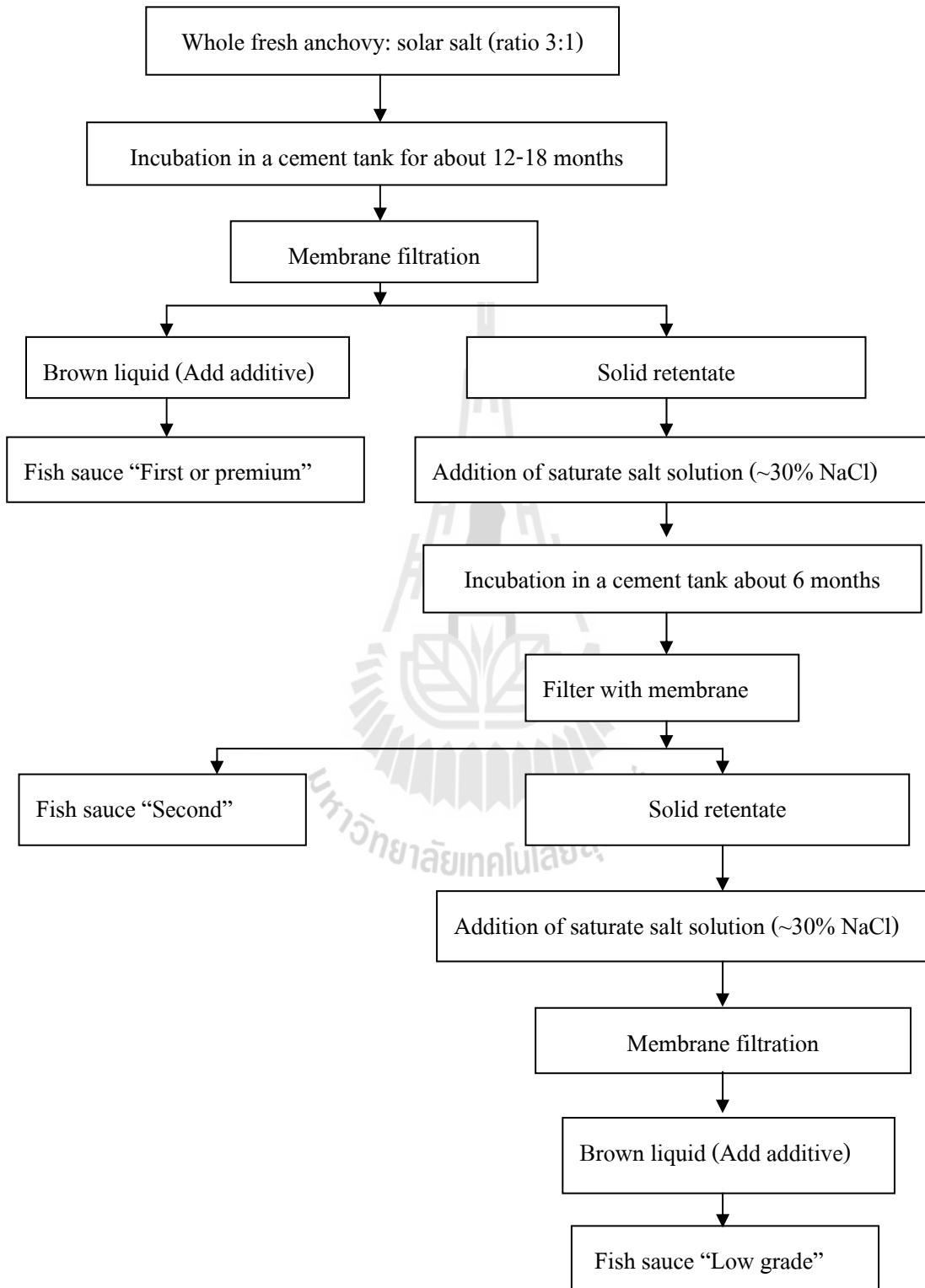
2.1 น้ำปลา

น้ำปลาเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมัก ซึ่งใช้เป็นเครื่องปรุงที่รู้จักกันมานานผลิตในแถบทวีปเอเชีย โดยมีชื่อที่แตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ เช่น ประเทศไทยและลาว เรียกว่า น้ำปลา ประเทศมาเลเซีย เรียกว่า บูดู (Budu) ประเทศอินโดนีเซีย เรียกว่า เคทจาบอิกาน (Ketjap-ikan) ประเทศเวียดนาม เรียกว่า นอคนัม (Nouc-mam) ประเทศกัมพูชา เรียกว่า ตีกตริย (Teuk trei) ประเทศญี่ปุ่น เรียกว่า อิชิรุ (Ishiru) ประเทศพม่า เรียกว่า งมยาयी (Ngam-ya-ye) ประเทศฟิลิปปินส์ เรียกว่า พาทิส (Patis) เป็นต้น (Lopetcharat et al., 2001) น้ำปลาเป็นของเหลวใส สีน้ำตาล มีรสชาติเค็ม ปลาที่นิยมใช้ในการผลิต ได้แก่ ปลาไส้ตัน หรือ ปลาเกะตัก (*Stolephorus* spp.) โดยนำปลาผสมกับเกลือในอัตราส่วน 3:1 นำไปบรรจุในถังหมักและใช้เวลาหมักเป็นเวลา 12-18 เดือน ในสภาวะที่มีอากาศแบบจำกัด จากนั้นกรองเพื่อแยกส่วนตะกอนออกแล้วนำส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งไว้ให้ตกตะกอนเป็นระยะเวลา 2-12 สัปดาห์ ได้น้ำปลาเกรดเอ หรือเกรดที่ 1 ขั้นตอนการผลิตน้ำปลาแสดงในรูปที่ 2.1 ส่วนกากปลาที่เหลือจากการผลิตน้ำปลาเกรดที่ 1 จะนำมาใช้ผลิตน้ำปลาเกรดรองลงมาโดยการเติมน้ำเกลือ (Lopetcharat et al., 2001) น้ำปลามีลักษณะพิเศษเฉพาะตัว เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพทางเคมี และจุลินทรีย์ระหว่างการผลิต เช่น กลิ่นของน้ำปลาเกิดจากการย่อยโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติเอสจากตัวปลา และจากแบคทีเรียทำให้ได้เปปไทด์ และอาจถูกย่อยต่อไปได้อีกเป็นเอมีน คีโต-เอซิด แอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนไขมันจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ทำให้เกิดกรดไขมันทั้งที่ระเหยได้และระเหยไม่ได้ รวมทั้งสารประกอบคีโตน และอัลดีไฮด์ (Raksakulthai and Haard, 1992; Beddows et al., 1979)

2.2 เอนไซม์จากตัวปลา

เอนไซม์จากปลา (Endogenous proteinases) พบทั้งในเครื่องใน (Viscera) และในกล้ามเนื้อปลานชนิดต่างๆ (ตารางที่ 2.1) ซึ่งเครื่องในปลาเป็นแหล่งสำคัญของเอนไซม์ Endopeptidase และ Exopeptidase เช่น Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin, Aminopeptidases และ Carboxypeptidases (Haard, 1994) นอกจากนี้ยังพบโปรตีนในส่วนของโปรตีนซาร์โคพลาสซึม (Sarcoplasmic protein) และมายโอไฟบริลลาร์ (Myofibrillar protein) Shahidi and Kamil (2001) รายงานว่าเอนไซม์ในกล้ามเนื้อปลาที่พบได้แก่ Trypsin-like, Chymotrypsin-like, Cathepsin B และ L, Calpain, Alkaline proteinase, Aminopeptidase, Carboxypeptidase-like และ Myofibril-bound serine proteinase

(MBSP) อื่นๆ Ohkubo et al. (2004b) พบเอนไซม์ Serine proteinase ในกล้ามเนื้อปลาปากคม (Lizardfish, *Saurida micropectoralis*)



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการผลิตน้ำปลา

ที่มา : Lopetcharat et al. (2001)

2.2.1 เอนไซม์ Trypsin และ Trypsin-like

เอนไซม์ Trypsin เป็นเซอรินโปรตีนเอส (Serine proteinase) ที่พบในระบบการย่อย ส่วน Trypsin-like พบในกล้ามเนื้อปลา สามารถทำปฏิกิริยาได้จากส่วนซาร์โคพลาสมิกของกล้ามเนื้อปลา เช่น ปลา Hake (Martone et al., 1991) และ ปลา White croaker (Cao et al., 2005) นอกจากนี้ยังสามารถแยกได้จากปลาของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (Inaba et al., 1997) มีรายงานวิจัยถึงคุณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์ Trypsin และ Trypsin-like โดย pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin อยู่ในช่วง pH ที่เป็นค่า Trypsin บริสุทธิ์จากเครื่องในของปลาแอนโชวี (*Engraulis encrasicolus*) แสดงกิจกรรมที่ pH 8-9 เมื่อวิเคราะห์ด้วย N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) เป็นสารตั้งต้น อย่างไรก็ตาม Trypsin แสดงกิจกรรมที่เหมาะสมที่ pH 9.5 เมื่อวิเคราะห์โดยเคซินและมัยโอไฟบริลลาร์โปรตีนเป็นสารตั้งต้น (Martinez et al., 1988) นอกจากนี้สามารถแยกเอนไซม์ Trypsin จากปลาแอนโชวีญี่ปุ่น (*E. japonica*) ซึ่งแสดงกิจกรรมสูงสุดที่ pH 9.0 เมื่อวิเคราะห์ด้วยเคซิน และ ที่ pH 8.0 เมื่อวิเคราะห์ด้วย BAPNA (Heu et al., 1995) Kristjansson (1991) รายงานว่าการทำปฏิกิริยา Trypsin จากไส้ปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ซึ่งแสดงกิจกรรมสูงสุดที่ pH 9.0-10.0 เมื่อวิเคราะห์ด้วย BAPNA มีรายงานว่าเอนไซม์ Trypsin A และ B ที่ทำปฏิกิริยาจากตับและตับอ่อนของปลาในแสดงกิจกรรมที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ในกลุ่ม Trypsin-like ที่ได้จากกล้ามเนื้อปลา Milkfish (*Chanos chanos*) (Jiang et al., 1990) ปลาทรายแดง (*Nemipterus bathybius*) (Kinoshita et al., 1990) และปลา กะตัก (*Stolephorus indicus*) (Siringan et al., 2006b) คือ 60 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่ากิจกรรมของ Trypsin-like ในปลากะตักถูกกระตุ้นที่ 50-60 องศาเซลเซียส และ pH 8.5 (Siringan et al., 2007) อย่างไรก็ตาม Choi et al. (2004) รายงานว่ากิจกรรมของ Trypsin ของเนื้อปลากะตักมีกิจกรรมสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส และ pH 8.0

2.2.2 เอนไซม์ Chymotrypsin และ Chymotrypsin-like

เอนไซม์ Chymotrypsin เป็นเซอรินโปรตีนเอส (Serine proteinase) สามารถย่อยพันธะเพปไทด์โดยที่กรดอะมิโนด้านกลุ่มคาร์บอกซิล (Carboxyl) ของพันธะเพปไทด์ ซึ่งเป็นกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) เช่น ไทโรซีน ทริฟโตแฟน ฟีนิลอะลานีน และลูซีน Heu et al. (1995) รายงานว่า Chymotrypsin ที่ทำปฏิกิริยาจากปลาแอนโชวี (*E. japonica*) แสดงกิจกรรมที่ pH 8.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่า Chymotrypsin-like ในเครื่องในปลากะตักมีเสถียรภาพลดลง 80% ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และกิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งที่อุณหภูมิ 45 และ 60 องศาเซลเซียส Siringan et al. (2006b) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Chymotrypsin-like ของปลากะตักมีความคงทนที่เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นสูงที่ 25-30%

ตารางที่ 2.1 เอนไซม์โปรตีนในกล้ามเนื้อปลานชนิดต่างๆ

Type group	Proteinase	Fish	Source	Reference
Cysteine proteinase	Cathepsin L	Red bulleye	Muscle	Hu et al. (2007)
		Walleye pollock	Muscle	Hu et al. (2008)
		Sea bass	Muscle	Che'ret et al. (2007)
		Anchovy	Muscle	Choi et al. (2004)
	Cathepsin B	Anchovy	Whole fish	Siringan et al. (2006b)
		Carp	Hepatopancrease	Aranishi et al. (1997)
		Arrowtooth	Muscle	Visessanguan et al. (2003)
		Silver carp	Muscle	Liu et al. (2008)
Serine proteinase	Trypsin and trypsin-like	Monterey sardine	Pyloric ceca	Castillo-Yanez et al. (2005)
		Japanese sandfish	Whole fish	Klomklao et al. (2009)
		Anchovy	Whole fish	Siringan et al. (2006b)
		Anchovy	Muscle	Choi et al. (2004)
		Skipjack tuna	Spleen	Klomklao et al. (2006)
		True sardine	Viscera	Kishimura et al. (2006b)
	Alkaline proteinase	Nile tilapia	Intestine	Bezerra et al. (2005)
		Bigeye snapper	Muscle	Benjakul et al. (2003)
		Striped Seabream	Viscera	Ali et al. (2011)
		Sailfin catfish	Viscera	Villalba-Villalba et al. (2011)
	Chymotrypsin and chymotrypsin - like	Anchovy	Whole fish	Siringan et al. (2006b)
		Sardine	Muscle	Lugo-Sanchez et al. (1997)
		Anchovy	Muscle	Choi et al. (2004)
	MBSP*	Carp	Muscle	Osatomi et al. (1997); Cao et al. (1999a, 1999b); Cao et al. (2006)
		Lizardfish	Muscle	Cao et al. (2000); Ohkubo et al. (2004a)
Aspartic proteinase	Cathepsin D	Alaska pollack	Muscle	Weng et al. (2007)
		Sea bass	Muscle	Che'ret et al. (2007)
		Herring	Muscle	Neilsen and Neilsen (2001)
	Pepsin	Sardine	Viscera	Castillo-Yanez et al. (2004)
Metallo proteinase	Calpain	Salmon	Muscle	Geesink et al. (2000)
		Sea bass	Muscle	Che'ret et al. (2007)
	Carboxypeptidase A, B	Sardine	Muscle	Lugo-Sanchez et al. (1997)
		Starfish	Pyloric ceca	Kishimura and Hayashi (2002)
	Cathepsin A	Milkfish	Muscle	Jiang et al. (1990)
	Leu-aminopeptidase	Anchovy	Whole fish	Siringan et al. (2006b)

* MBSP = Myofibril-bound serine proteinase

2.2.3 เอนไซม์ Cathepsin L และ B

เอนไซม์ Cathepsin L และ B เป็นซิสเตอินโปรตีนเอส (Cysteine proteinases) พบในไลโซโซม (Lysosome) เอนไซม์นี้เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายกล้ามเนื้อของปลาชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เด่นในกล้ามเนื้อปลา Pacific whiting และเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายมายโอซิน (Myosin) ในระหว่างกระบวนการให้ความร้อนของเนื้อปลาและซูริมี (An et al., 1994) Aoki and Ueno (1997) รายงานว่า Cathepsin L ในปลา Mackerel สามารถย่อยมายโอซิน โทรโปนินที (Troponin T) โทรโปนินไอ (Troponin I) และโทรโปมายโอซิน (Tropomyosin) ส่วน Cathepsin B ไม่สามารถย่อยมายโอไฟบริลลาร์โปรตีนของปลา Mackerel ได้

Cathepsin L จากกล้ามเนื้อปลา Pacific whiting มี 2 ไอโซฟอร์ม ซึ่งแสดงกิจกรรมที่ pH 5.5-6.0 และที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส (Seymour et al., 1994) Visessanguan et al. (2003) รายงานว่า Cathepsin L ที่ทำบริสุทธิ์จากกล้ามเนื้อปลา Arrowtooth flounder แสดงกิจกรรมได้สูงสุดที่ pH 5.5 และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นอกจากนี้มีรายงานที่ Cathepsin L ที่ทำบริสุทธิ์จากตับและตับอ่อนของปลาในแสดงกิจกรรมสูงสุดที่ pH 5.5-6.0 และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Aranishi et al., 1997) Choi et al. (2004) พบว่ากิจกรรมของ Cathepsin L-like ของเครื่องในและเนื้อปลากะตักสูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส และ pH 6.0 เช่นเดียวกันกับ Heu et al. (1997) ที่รายงานว่า Cathepsin L-like บริสุทธิ์จากเนื้อปลาแอนโชวี (*E. japonica*) แสดงกิจกรรมที่ 50 องศาเซลเซียส

Cathepsin B ที่ทำบริสุทธิ์จากกล้ามเนื้อปลา Chum salmon และกล้ามเนื้อขาวของปลา Mackerel (Yamashita and Konagaya 1990; Jiang et al., 1994) แสดงกิจกรรมที่ pH 6.5 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นอกจากนี้มีรายงานที่ Cathepsin B ที่ทำบริสุทธิ์จาก Pacific whiting แสดงกิจกรรมสูงสุดในช่วงอุณหภูมิ 20-37 องศาเซลเซียส (An et al., 1994)

2.2.4 โปรตีนเอสที่แสดงกิจกรรมในสภาวะกรด (Acid proteinases)

Pepsin เป็นแอสปาร์ติกโปรตีนเอส (Aspartic proteinase) ที่พบในกระเพาะอาหารของปลา เอนไซม์แสดงกิจกรรมที่ pH 2.0-4.0 สารยับยั้งเอนไซม์คือ Pepstatin, Diazoketones และ Phenylacryl bromides (Beynon and Bond, 2001) เอนไซม์ Pepsin ที่ทำบริสุทธิ์จากปลา Monterey sardine แสดงกิจกรรมที่ pH 2.5 และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Castillo-Yanez et al., 2004) Pepsin ที่ทำบริสุทธิ์จากเครื่องในปลานิล (*Tilapia nilotica*) มีเสถียรภาพ (Stability) ที่ pH 3-6 และไม่แสดงกิจกรรมที่ pH เป็นกลางและด่าง (El-Beltagy et al., 2004)

Cathepsin D เป็นไลโซโซมอลโปรตีนเอส (Lysosomal proteinase) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มโปรตีนเอสที่แสดงกิจกรรมในสภาวะกรด (Aspartic proteinase) พบในกล้ามเนื้อปลา โดยทำบริสุทธิ์จากกล้ามเนื้อปลา Herring และปลาในมีมวดโมเลกุลประมาณ 36-39 กิโลดาลตัน (Nielsen and Nielsen, 2001; Goldman-Levkontz et al., 1995) อย่างไรก็ตาม Cathepsin D ทำบริสุทธิ์จากกล้ามเนื้อปลานิลมี

มวลโมเลกุลประมาณ 55 กิโลดาลตัน (Jiang et al., 1991) ซึ่งแสดงกิจกรรมที่ pH 2.5-3.7 และที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Nielsen and Neilsen, 2001; Goldman-Levkontz et al., 1995; Jiang et al., 1991)

2.2.5 โปรตีนที่จับยึดกับมายโอไฟบริล (Myofibril-bound proteinase, MBSP)

MBSP จัดเป็นเซอรินโปรตีนเอส (Serine proteinase) ที่จับยึดกับส่วนของโปรตีนมายโอไฟบริลาร์ โปรตีนเอสสามารถแยกจากมายโอไฟบริลาร์ด้วยสารละลายกรดและเกลือ เอนไซม์ MBSP ทำปฏิกิริยากับกล้ามเนื้อปลาโดยใช้สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) เข้มข้น 0.6 โมลาร์ pH 4.0 (Osatomi et al., 1997) นอกจากนี้ Osatomi et al. (1997) รายงานว่าเอนไซม์ MBSP ทำปฏิกิริยาจากกล้ามเนื้อปลากอม (Lizardfish) แสดงกิจกรรมสูงสุดที่ pH 8.0 และอุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส

2.2.6 โปรตีนที่แสดงกิจกรรมในสภาวะด่าง (Alkaline proteinases)

Alkaline proteinases มีความสำคัญในการย่อยสลายกล้ามเนื้อของปลา Atlantic menhaden และ ปลา Atlantic salmon (Boye and Lanier, 1988; Choi et al., 1999) ซึ่งพบในซาร์โคพลาสซึม (Sarcoplasmic) ไมโครโซมอล (Microsomal) และส่วนที่ยึดติดอยู่กับมายโอไฟบริล (Shahidi and Kamil, 2001) มวลโมเลกุลของ Alkaline proteinases ที่ทำปฏิกิริยาจากกล้ามเนื้อปลา Atlantic menhaden มีค่าประมาณ 707 และ 450 กิโลดาลตัน (Choi et al., 1999) เอนไซม์นี้แสดงกิจกรรมที่ pH 7.5-8.0 และที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส (Boye and Lanier, 1988; Choi et al., 1999)

2.2.7 โปรตีนอื่นๆ

Aminopeptidase และ Carboxypeptidase เป็นเมทาโลเอกโซโปรตีนเอส (Metallo exoproteinases) เอนไซม์กลุ่มนี้จำเป็นต้องมีไอออนโลหะที่ตำแหน่งกระตุ้น (Active sites) Carboxypeptidase A และ B ในซาร์โคพลาสซึมของปลา Monterey sardine จะถูกกระตุ้นด้วย Cu^{2+} และถูกยับยั้งด้วย Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (Lugo-Sanchez et al., 1997) นอกจากนี้มีรายงานว่า Carboxypeptidase B ที่ทำปฏิกิริยาจากปลาดาว (Starfish) แสดงกิจกรรมที่ pH 7.5 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (Kishimura et al., 2006a) Leucine-aminopeptidase (LAP) ที่พบในปลา Monterey sardine และปลาแอนโชวีไม่ถูกยับยั้งด้วย EDTA (Martinez and Serra, 1989) Liu et al. (2008) รายงานว่า Leucine aminopeptidase จากเนื้อปลาใน (*Cyprinus carpio*) แสดงกิจกรรมสูงสุดที่ 35 องศาเซลเซียส และ pH 7.0 Siringan et al. (2006b) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Leucine-aminopeptidase ลดลงที่เกิดคือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูง 25-30% Cathepsin A-like (หรือ Carboxypeptidase A) ทำปฏิกิริยาจากกล้ามเนื้อปลา Milkfish สามารถย่อยสารตั้งต้น Z-Gly-Phe สูงสุดที่ pH 7.0 และที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส และไม่แสดงกิจกรรมที่อุณหภูมิสูงและถูกยับยั้งด้วย Pepstatin A และ Hg^{2+} (Jiang et al., 1990)

Calpains หรือโปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยไอออน Ca^{2+} (Ca^{2+} -activated proteinases) จัดเป็นโปรตีนที่แสดงกิจกรรมที่ pH เป็นกลาง (Neutral proteinases) พบในกล้ามเนื้อปลา Calpain ที่พบในส่วนของซาร์โคพลาสมิกจะถูกละลายออกจากเส้นใยกล้ามเนื้อ (Myofilament) โดยการย่อยส่วน Z-disk Ladrat et al. (2000) รายงานว่า Calpain เร่งการย่อยโปรตีนกล้ามเนื้อหลังภาวะการตาย นอกจากนี้มีรายงานว่าการทำงานริสโทธีเอนไซม์ 2 ชนิด จากกล้ามเนื้อปลาแอนโชวี (*E.japonica*) คงเกลือซึ่งมีบทบาทในการย่อยกล้ามเนื้อระหว่างการบ่ม โดยเอนไซม์ชนิดแรกมีมวลโมเลกุล 25 กิโลดาลตัน และแสดงกิจกรรมสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส และ pH 6.8 ในขณะที่เอนไซม์อีกชนิดหนึ่งมีมวลโมเลกุล 37 กิโลดาลตัน และแสดงกิจกรรมสูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส และ pH 7.0-7.5 (Ishida et al., 1994; Ishida et al., 1995)

2.3 จุลินทรีย์ในกระบวนการหมักน้ำปลา

Thongthai and Sutinanalert (1991) ได้แยกจุลินทรีย์ *Halobacterium* จากน้ำปลาและพบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถสร้างโปรตีนได้สูง นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *Bacillus* และ *Coryneform* ในน้ำปลาซึ่งสามารถสร้างโปรตีนได้สูงเช่นกัน ต่อมา Thongthai et al. (1992) ได้รายงานการแยก *Halobacterium salinarium* จากน้ำปลา ซึ่งเชื้อดังกล่าวสามารถสร้างเอนไซม์โปรตีนที่ยังคงแสดงกิจกรรม (Activity) ที่ความเข้มข้นของเกลือ 4 โมลาร์ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานว่าโปรตีนดังกล่าวเป็นประเภทใดและเชื้อดังกล่าวเกิดขึ้นช่วงใดของการหมักน้ำปลา Chaiyanan et al. (1999) แยกแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ *Halobacillus thailandensis* sp. nov. จากน้ำปลา เชื้อดังกล่าวสามารถสร้างโปรตีนในกลุ่ม Serine proteinase และ Metalloproteinase ซึ่งคาดว่าเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายโปรตีนในน้ำปลา Pornaveewat et al. (2002) ได้ศึกษาโปรตีนจาก *Halobacterium* ที่แยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา และพบว่าเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Serine proteinase โดยเอนไซม์ที่ทำริสโทธีสามารถแสดงกิจกรรมได้สูงสุดที่ pH 6.0, 55 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของเกลือ 25% วิไลลักษณ์ (2538) พบว่าการใช้เชื้อ *H. salinarium* ร่วมกับ *S. saprophyticus* และ *B. pantothenicus* ในการหมักน้ำปลา ทำให้ได้ค่าการละลายของโปรตีนสูง จากงานวิจัยดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่สร้างโปรตีนนั้นมีหลากหลายสายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม ไม่มีข้อมูลที่ระบุชัดเจนว่าจุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์เหล่านั้นเจริญในช่วงระยะเวลาใดบ้างของการหมัก ซึ่งกระบวนการหมักน้ำปลาที่อาศัยจุลินทรีย์จากธรรมชาติเกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์หลายชนิดที่อาจเจริญร่วมกันหรือต่อเนื่องกัน

Sinsuwan et al. (2010) ได้ศึกษาโปรตีนจาก *Virgibacillus* sp. SK33 ที่แยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลาในเดือนที่ 2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Serine proteinase โดยเอนไซม์ที่ทำริสโทธีสามารถแสดงกิจกรรมได้สูงสุดที่ pH 7.5 และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส Phrommao et al.

(2011) พบกิจกรรมของเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 ที่แยกได้จากน้ำปลา ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Subtilisin-like proteinases แสดงกิจกรรมสูงสุดที่ pH 8.0 อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25-30% และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 70-100 มิลลิโมล/ลิตร เอนไซม์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ต่างๆข้างต้น เป็น Endoproteinase แต่เอนไซม์ในกลุ่ม Exoproteinase มีความสำคัญต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสของน้ำปลาเช่นกัน เนื่องจากเอนไซม์ในกลุ่มนี้ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนอิสระซึ่งมีผลโดยตรงต่อรสชาติ Vo-Van et al. (1984) พบกิจกรรมของ Aminopeptidase ที่ค่อนข้างสูงในระยะ 2 เดือนแรกของการหมักน้ำปลาจากปลาซาร์ดีน (Sardine) เอนไซม์ดังกล่าวมีมวลโมเลกุล 370 กิโลดาลตัน เมื่อวิเคราะห์โดย Gel filtration และมีค่า pI เท่ากับ 4.1 เอนไซม์ยังคงกิจกรรมได้สูงที่ความเข้มข้นเกลือ 15% ซึ่งแตกต่างจาก Aminopeptidase จากปลาซาร์ดีนซึ่งสูญเสียกิจกรรมอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้นของการหมัก แต่คณะผู้วิจัยไม่ได้ระบุแน่ชัดว่า Aminopetidase ในน้ำปลานั้นมาจากจุลินทรีย์หรือไม่

นอกจาก *Halobacterium* แล้ว Tanasupawat and Komagata (1995) ได้พบ *Tetragenococcus halophilus* ในน้ำปลา ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Saisithi (1994) ซึ่งสรุปว่าพบ *T. halophilus* มีจำนวนมากในวันที่ 13 ของการหมักจนกระทั่งเดือนที่ 3 Satomi et al. (1997) พบ *T. muriaticus* sp. nov. จากเครื่องในปลาหมักหมักซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูง ต่อมา Kimura et al. (2001) ได้รายงานว่ แบคทีเรียดังกล่าวสามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงถึง 1,153.4 ppm ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด นอกจากนี้ Thongsanit (1999) พบ *T. halophilus* และ *T. muriaticus* ในน้ำปลาไทย ซึ่งบางสายพันธุ์สามารถสร้างฮีสตามีนในช่วง 0.36-522.9 ppm อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานว่า เชื้อดังกล่าวสร้างไบโอจีนิกเอมีนหรือไม่ และเชื่อดังกล่าวมีบทบาทสำคัญต่อคุณลักษณะของน้ำปลาหรือไม่อย่างไร นอกจากนี้ปัจจัยในการสร้างโปรตีนแล้ว จุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการพัฒนาเป็นกล้าเชื้อจะต้องไม่ผลิตฮีสตามีนและไบโอจีนิกเอมีนอื่นๆ หรือผลิตในปริมาณที่น้อยมากอย่างไม่มีนัยสำคัญ

2.4 แบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียกรดแล็กติกมีความสามารถทนกรดที่ผลิตขึ้นมาเอง ปกติแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิค่อนข้างกว้างคือตั้งแต่ 5-45 องศาเซลเซียส แบคทีเรียกรดแล็กติกอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก มีทั้งที่เซลล์มีรูปร่างกลมและเป็นท่อน บางชนิดที่มีเซลล์มีรูปร่างกลมมีการเรียงตัวกันสี่เซลล์ ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส (Catalase) ต้องการอากาศน้อย (Microaerophile) หรือ Facultative anaerobe ต้องการอาหารในการเจริญอย่างซับซ้อน ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน มีความสามารถในการทนกรด อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส pH 5.5-6.2 นิยมใช้ในกระบวนการผลิตอาหารและผลิตภัณฑ์

เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในกระบวนการหมัก (du Toit et al., 1998) เป็นแบคทีเรียชนิดแรกที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตก้อนนมหมัก ผักดอง และเนื้อหมัก (Konings, 2002)

แบคทีเรียกรดแล็กติกประกอบด้วยแบคทีเรียสกุลต่างๆ คือ *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Camobacterium*, *Leuconostic*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* และ *Weissella* โดยสามารถแบ่งตามการใช้น้ำตาลได้ 2 กลุ่ม ดังนี้ (Axelsson, 1993; Kandler and Weiss, 1989)

(1) โฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (Homofermentative) เป็นแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลกลูโคสผ่าน Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMP) ได้กรดแล็กติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก 85% หรือมากกว่าจากการหมักคาร์โบไฮเดรต เจริญที่อุณหภูมิ 15-45 องศาเซลเซียส ได้แก่ *L. sake*, *L. acidilactici*, *L. casei* เป็นต้น

(2) เฮเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ (Heterofermentative) เป็นแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านวิถี Phosphogluconate pathway หรือ Phosphoketolase pathway ได้ผลิตภัณฑ์กรดแล็กติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ จากการหมักคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis* เป็นต้น

Tetragenococcus เป็นแบคทีเรียที่ต้องการเกลือ โซเดียมคลอไรด์ในการเจริญ มีความสามารถทนเกลือในระดับสูง (>18%) (Collins et al., 1990; Holt et al., 1994; Hozapfel et al., 2006) ความแตกต่างระหว่าง *Pediococci* และ *Tetragenococci* แสดงดังตารางที่ 2.2 *Tetragenococcus* มีรูปร่างเซลล์กลม (0.5-1.0 ไมครอน) ดิคส์แกรมบวก มีการจัดเรียงเซลล์ทั้งเป็นคู่ (Pairs) และแบบสี่เซลล์ (Tetrads) โคโลนี่เป็นทรงกลม ขาว ความหนืดต่ำ เรียบ และไม่มีเม็ดยีส ผลการทดสอบเอนไซม์ คตาเลส (Catalase) เป็นลบ โดยทั่วไป *Tetragenococcus* พบในผลิตภัณฑ์อาหารหมักหลากหลายชนิด เช่น น้ำปลา (Thongsanit et al., 2002) ถั่วเหลืองหมักของอินโดนีเซีย (Roling and Verseveld, 1996) ซอสถั่วเหลืองของญี่ปุ่น (Nakagawa and Kitahara, 1959) ปลากระดองเกลือ (Villar et al., 1985) กะปิ (Terasi) ของอินโดนีเซีย (Kobayashi et al., 2003) กิมจิและแฮม (Lee et al., 2005)

แบคทีเรีย *Tetragenococcus* ที่สำคัญได้แก่

(1) *Tetragenococcus halophilus* ซึ่งพบในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เช่น น้ำปลาและซอสถั่วเหลือง มีรูปร่างทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมครอน เซลล์ไม่มีการเคลื่อนที่ โคโลนี่เจริญบนอาหาร MRS agar มีลักษณะเป็นทรงกลม ความหนืดต่ำ และไม่มีเม็ดยีส (Thongsanit et al., 2002) เป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกประเภทโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (Homofermentative) ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเพื่อการเจริญเติบโต (Microaerophile) *T. halophilus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการเจริญคือ 5-10% และ pH 5.0-9.0 *T. halophilus* ไม่สามารถเปลี่ยนรูปของไนเตรทได้ บางชนิดสามารถย่อยอาร์จินีนได้ (Lee

et al, 2005; Thongsanit et al., 2002) โดยส่วนใหญ่สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 2.3 Kobayashi et al. (2000) คัดแยก *T. halophilus* จากกะปิ (Terasi) ของอินโดนีเซีย ซึ่งสามารถใช้ L-Arabinose, D-Mannitol, Maltose, D-Melizitose, Maltotriose, Glycerol และ Sucrose เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดได้ *T. halophilus* มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์ที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ โดยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการเจริญคือ 3-7%, pH 7.5 และ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นอกจากผลิตภัณฑ์กะปิของอินโดนีเซียแล้ว *T. halophilus* ยังคัดแยกได้จากกระบวนการหมักซอสถั่วเหลือง (Soy mash) (Roling and Verseveld, 1996)

ตารางที่ 2.2 ความแตกต่างทางสรีรวิทยาาระหว่างสกุล *Tetragenococcus* และ *Pediococcus*

Characteristics	<i>Pediococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>
Growth tolerance to 18% NaCl	-	+
Growth at pH 5.0	+	-
pH 9.0	-	+
Facultative anaerobes	+	+
Gas from glucose fermentation	-	-
Configulation of lactic acid from glucose	DL/L(+)	L(+)
Starch fermentation	-	-
Peptidoglycan type	Lys-D-Asp	Lys-D-Asp

Source: Holzapfel et al. (2006)

(2) *Tetragenococcus muriaticus* เป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกที่แยกจากน้ำปลาที่หมักจากเครื่องในปลาหมึก (Satomi et al., 1997) เซลล์มีรูปร่างกลม (0.5-0.8 ไมครอน) และไม่เคลื่อนที่ โคโลนีเป็นสีขาว มีความหนืด เรียบ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 1.5 มิลลิเมตร สามารถเจริญได้ที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1-25% โดยค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 7-10% ไม่พบการเจริญในสภาวะที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25-30 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 15-40 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมคือ 7.5-8.0 และสามารถเจริญได้ที่ pH ในช่วง 5.0-9.6 *T. muriaticus* สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (Facultatively anaerobic) และไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนโตรที่ทำได้ แต่ผลิตฮีสตามีนได้ 44 มิลลิกรัม/100 กรัม (Thongsanit et al., 2002) ซึ่งแบคทีเรียกรดแล็กติกชนิดนี้สามารถใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 2.3 ผนังเซลล์ของเพปไทด์ประกอบด้วย Lys-D-Asp ส่วน DNA มีปริมาณ G+C เท่ากับ 36.5 mol%

(Satomi et al., 1997) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้แยกความแตกต่างระหว่าง *T. muriaticus* และ *T. halophilus* คือการเจริญที่อุณหภูมิที่ต่างกัน โดย *T. muriaticus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่ *T. halophilus* ไม่เจริญ นอกจากนี้ยังพบว่า *T. halophilus* เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ แต่ *T. muriaticus* ต้องมีเกลืออย่างน้อย 1% จึงสามารถเจริญได้ (ตารางที่ 2.3) ในกระบวนการหมัก *T. muriaticus* ย่อย L-Arabinose, Sucrose และ Lactose ได้น้อยกว่า *T. halophilus* และสามารถผลิตฮีสตามีนได้ (Satomi et al., 1997) อย่างไรก็ตาม ความต่างของลักษณะทางสัณฐานและการใช้น้ำตาลระหว่างเชื้อทั้งสองชนิดไม่สามารถใช้ในการจำแนกเชื้อทั้งสองได้ (Abe and Uchida, 1989; Roling and Verseveld, 1996) วิธีที่มีความน่าเชื่อถือในการจำแนกสายพันธุ์คือการวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของ 16S rRNA gene (Satomi et al., 1997)

(3) *Tetragenococcus koreensis* เป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกอีกหนึ่งชนิดที่แยกได้จากกิมจิ (Lee et al., 2005) มีความคล้ายคลึงของ 16S rRNA gene เมื่อเทียบกับ *T. muriaticus* และ *T. halophilus* เท่ากับ 97.8% และ 95.9% ตามลำดับ แต่ DNA-DNA hybridization ของ *T. koreensis* มีความคล้ายคลึงเพียง 9.7% เมื่อเทียบกับ *T. halophilus* และ 39.0% เมื่อเทียบกับ *T. muriaticus* โดย *T. koreensis* สามารถผลิตกรดได้ดังตารางที่ 2.3 *T. koreensis* มีรูปร่างเซลล์กลม (1 ไมครอน) ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีสปอร์ ผลทดสอบเอนไซม์อะเลส และออกซิเดสเป็นลบ *T. koreensis* เจริญได้ที่อุณหภูมิ 15-30 องศาเซลเซียส ไม่เจริญที่ 4 องศาเซลเซียส หรือมากกว่า 37 องศาเซลเซียส โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญคือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ pH 9.0 พบการเจริญที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-8% โดยความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสม คือ 2-5% *T. koreensis* เป็นแบคทีเรียประเภทโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (Homofermentative) ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์และไนโตรเจน นอกจากนี้ยังพบว่า *T. koreensis* สามารถผลิต Rhamnolipid biosurfactant ได้

(4) *Enterococcus solitarius* เปลี่ยนชื่อสกุล (Genus) เป็น *Tetragenococcus* โดย Ke et al. (1999) *T. solitarius* แยกได้จากจี๋หมูนุญญ์ (Colline et al., 1990) ลำดับความคล้ายคลึงของ 16S rRNA gene คือ 93.8% และ 93.7% เมื่อเทียบกับ *T. halophilus* และ *T. muriaticus* ตามลำดับ (Ennahar and Cai, 2005) แต่ค่า DNA-DNA hybridization ของ *T. solitarius* มีความคล้ายคลึงเพียง 25.7- 28.6% เมื่อเทียบกับ *T. halophilus* และ 25.4 - 27.2% เมื่อเทียบกับ *T. muriaticus* (Ennahar and Cai, 2005) ความสามารถในการย่อยน้ำตาลแสดงดังในตารางที่ 2.3 *T. solitarius* ไม่สามารถย่อย Lactose ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันกับ *Tetragenococcus* ชนิดอื่นๆ ในขณะที่ *Enterococcus* สามารถผลิตกรดจาก Lactose ได้ (Ennahar and Cai, 2005) *T. solitarius* แสดงความสามารถในการหมักน้ำตาลเหมือนกับ *T. halophilus* ซึ่งทั้งสองชนิดนี้สามารถผลิตกรดได้จากน้ำตาลหลากหลายชนิด เช่น Galactose, Cellobiose, Sucrose และ Maltose (ตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3 สมบัติทางสรีรวิทยาและการใช้น้ำตาลของแบคทีเรียกรดแล็กติกในสกุล *Tetragenococcus* ชนิด

Characteristics	<i>T. halophilus</i> ^a ATCC 33315	<i>T. muriaticus</i> ^b JCM 10006	<i>T. koreensis</i> ^c DSM 16501	<i>T. solitarius</i> ^d JCM 8736
Optimum temperature (°C)	30	25-30	15-30	NA
Growth at 40 °C	-	+	-	+
45 °C	-	-	-	+
Growth range of pH	5.0-9.0	5.0-9.6	NA	NA
Optimum pH	NA	7.5-8.0	9.0	6.5
Range of NaCl (%)	0-25	1-25	0-8	NA
Optimum NaCl (%)	5-10	7-10	2-5	NA
Gas from D-glucose	-	-	-	NA
Amygdalin	+	-	+	+
L-Arabinose	-	-	-	+
D-Cellobiose	+	-	-	+
D-Galactose	+	-	-	+
Glucose	+	+	+	NA
Glycerol	+	-	NA	-
D-Lactose	-	-	-	-
D-Maltose	+	-	+	+
D-Raffinose	-	-	NA	-
L-Rhamnose	-	-	NA	-
D-Mannitol	-	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+
D-Melibiose	-	-	NA	-
Sucrose	+	-	+	+
D-Melezitose	+	-	+	+
α-Methyl-D-glucoside	+	-	-	+
D-Ribose	+	+	+	-
D-Sorbitol	-	-	NA	-
Sorbose	+	-	-	-
D-Trehalose	+	-	+	+
D-Xylose	+	-	-	-
Xylitol	NA	-	+	-
Turanose	NA	-	+	+
D-Tagatose	NA	-	-	+
D-Arabitol	NA	-	+	+
Gluconate	NA	-	+	+

NA = Not available. ^aThongsanit et al. (2002), ^bSatomi et al. (1997), ^cLee et al. (2005), ^dEnnahar and Cai (2005).

2.5 องค์ประกอบของสารระเหยในน้ำปลา

กลิ่นรสเป็นปัจจัยคุณภาพที่สำคัญของน้ำปลา (Sanceda et al., 2001) กลิ่นในน้ำปลาสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มหลัก คือ กลิ่นแอมโมเนีย (Ammoniacal) กลิ่นเนยแข็ง (Cheesy) และกลิ่นเนื้อ (Meaty) (Dougan and Howard, 1975) ซึ่งเกิดจากกระบวนการย่อยสลายโปรตีน ออกซิเดชันของไขมัน และกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ (Beddows et al., 1980) Saisithi et al. (1966) รายงานว่ากิจกรรมของจุลินทรีย์ซึ่งแยกได้จากน้ำปลาที่หมักเป็นเวลา 9 เดือน สามารถผลิตสารระเหยชนิดกรดและสารประกอบอื่นๆ เช่น คีโตน (Ketone) และอัลดีไฮด์ (Aldehy) ซึ่งมีส่วนทำให้ได้กลิ่นรสและกลิ่นหอมของน้ำปลา โดยสารประกอบแอมโมเนีย (Ammonia) เอมีน (Amines) และสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ จะให้กลิ่นแอมโมเนีย (Ammoniacal) ส่วนสารประกอบ Volatile fatty acids จะให้กลิ่นเนยแข็ง (Cheesy) และสารประกอบอัลดีไฮด์จะให้กลิ่นเนื้อ (Meaty) ในน้ำปลา (Dougan and Howard, 1975; Fukami et al., 2002; Sanceda et al., 1992) Peralta et al. (1996) จำแนกสารระเหยในน้ำปลาได้ 124-155 ชนิด โดยแบ่งเป็นกรด สารประกอบไนโตรเจน (Nitrogen-containing compounds) สารประกอบซัลเฟอร์ (Sulfur-containing compounds) อัลดีไฮด์ (Aldehydes) คีโตน (Ketones) และสารประกอบอะโรมาติก (Aromatic hydrocarbons) Fukami et al. (2004) รายงานว่า 2-Methylpropanal, 2-Methylbutanal, 2-Pentanone, 2-Ethylpyridine, Dimethyl trisulfide, 3-(Methylthio) propanal และ 3-Methylbutanoic acid จะให้กลิ่นคาวปลา (Fishy) สารประกอบที่ให้กลิ่นอับเหงื่อ (Sweaty) ได้แก่ 2-Methylpropanal, 2-Methylbutanal, 2-Ethylpyridine และ Dimethyl trisulfide สารประกอบที่ให้กลิ่นเนื้อ (Meaty) ได้แก่ 2-Ethylpyridine, 2-Methylpropanal และ 2-Methylbutanal นอกจากนี้ Shimoda et al. (1996) รายงานว่า Dimethyl sulfide, Dimethyl disulfide และ Dimethyl trisulfide เป็นสารระเหยที่ให้กลิ่นอุจจาระ (Fecal) ซึ่งเป็นกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในน้ำปลา

สารประกอบ Volatile fatty acids เกิดจากกระบวนการออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว และกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ (Dougan and Harward, 1975) Butanoic acid, 3-Methylbutanoic acid, Pentanoic acid และ 4-Methylpentanoic acid ให้กลิ่นเนยแข็ง (Cheesy) ในน้ำปลา (Devos et al., 1995; Peralta et al., 1996; Shimoda et al., 1996) กลิ่นเนื้อ (Meaty) เกิดจากกระบวนการออกซิเดชันของไขมัน Glutamic acid ให้รสเนื้อ (Meaty) ในน้ำปลา (Devos et al., 1995) Michihata et al. (2002) รายงานว่าสารระเหยหลักในน้ำปลาญี่ปุ่น (Ishiru) คือ อัลดีไฮด์ สารประกอบไนโตรเจน สารประกอบซัลเฟอร์ และคีโตน โดยสารประกอบอัลดีไฮด์เกิดจากกระบวนการออกซิเดชันไขมันในระหว่างกระบวนการหมัก และสารประกอบอัลดีไฮด์ (Aldehyde) ที่มีโครงสร้างแบบกิ่งก้าน อะโรมาติก และอัลดีไฮด์สายสั้น เกิดจากปฏิกิริยา Deamination ของกรดอะมิโน Cha and Cadwallader (1998) รายงานว่าสารประกอบอัลดีไฮด์ที่ให้กลิ่นรสที่ดีในน้ำปลาที่ผลิตจากปลาทูน่า เกิดจากปฏิกิริยาเคมี และกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ที่ย่อยกรดอะมิโน

กรดอะมิโน และเพปไทด์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักมีผลต่อกลิ่นรสในน้ำปลา (Peralta et al., 1996) โปรตีนจากจุลินทรีย์ (Microbial proteinases) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Intracellular aminopeptidases เป็นเอนไซม์ที่สำคัญของกระบวนการเกิดกลิ่นรส เนื่องจาก Intracellular aminopeptidases สามารถย่อยเพปไทด์ และ/หรือโอลิโกเพปไทด์ให้เป็นกรดอะมิโน (Smit et al., 2005) กรดอะมิโนจะถูกเปลี่ยนให้เป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสโดยแบคทีเรียกรดแล็กติก สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ (1) กรดอะมิโนในกลุ่มอะโรมาติก เช่น ไทโรซีน (Tyrosine) ทริปโตเฟน (Tryptophan) และฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) (2) กรดอะมิโนที่มีกิ่งก้าน เช่น ลูซีน (Leucine) ไอโซลูซีน (Isoleucine) และวาเลีน (Valine) และ (3) กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ เช่น เมไธโอนีน (Methionine) (Marilley and Casey, 2004) Smit et al. (2005) รายงานว่าลูซีนถูกเปลี่ยนให้เป็น 2-Methylpropanoic acid และ Methionine ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับกลิ่นเนยแข็ง (Cheesy) และ ถูกเปลี่ยนให้เป็น Methional ให้กลิ่นคล้ายมันฝรั่งต้ม Marilley and Casey (2004) รายงานว่าวาเลีน และเมไธโอนีน ถูกเปลี่ยนให้เป็น 3-Methylbutanol และ Dimethyl disulfide ตามลำดับ ดังนั้นกรดอะมิโนจึงเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในกระบวนการเกิดสารระเหยที่ให้กลิ่นรส

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การย่อยสลายตัวเองของปลากระตัก

3.1.1 วัสดุและสารเคมี

ตัวอย่างปลากระตัก (*Stolephorus* spp.) สด ซึ่งมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 2.60 ± 0.45 กรัม และมีความยาวประมาณ 7.60 ± 0.32 เซนติเมตร ขนส่งจากอ่าวไทยโดยเก็บปลาในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งภายใน 6 ชั่วโมงหลังการจับ จากนั้นเปลี่ยนถ่ายน้ำแข็งและขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมาทันที

สารเคมีจากบริษัท Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.) ได้แก่ 2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), bovine serum albumin (BSA), dimethyl sulfoxide (DMSO), Brij 35, leucine และ L-leucyl-4-nitroaniline (4-NA) สารเคมีจากบริษัท Bachem AG (Bubendorf, Switzerland) ได้แก่ Boc-Asp (oBzl)-Pro-Arg-AMC, succinyl (Suc)-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC, Z-Phe-Arg-AMC และสารเคมีอื่นๆ ที่ใช้ในการวิจัยเป็นคุณภาพที่ใช้ในงานวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการ (Analytical grade)

3.1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายตัวเองของปลากระตัก

ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์และอุณหภูมิต่อการย่อยสลายตัวเองของปลากระตัก (Autolysis) เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายตัวเองได้สูงสุดโดยไม่เกิดการเน่าเสีย นำปลากระตักสด 400 กรัม เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0, 5, 10 และ 15 % บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 35, 50 และ 65 องศาเซลเซียส ติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณ โอลิโกเปปไทด์ในรูปของปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α -Amino group) และกิจกรรมโปรตีนเอสจากปลา สุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ที่ 0, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

3.1.3 วิเคราะห์ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α -Amino group)

ผสมตัวอย่างกับสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acetic, TCA) เข้มข้น 5% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ในอัตราส่วน 1:9 (โดยน้ำหนัก) เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ $8,000 \times g$ (Legend™ MACH 1.6/R, Thermo Electron LED GmbH, Lengensellbold, Germany) ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และกรองสารละลายส่วนใสด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (Whatman International Ltd., Oxfordshire, UK) นำสารละลายส่วนใส (Supernatant) ไปวิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเปปไทด์โดยทำปฏิกิริยากับ 2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic

acid (TNBS) ตามวิธีของ Adler-Nissen (1979) โดยใช้ลูซีน (Leucine) เป็นสารมาตรฐาน คุณตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร เจือจางด้วยสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) เข้มข้น 1% หรือน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) เติมสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 0.2125 โมลาร์ ที่ pH 8.2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติม TNBS เข้มข้น 0.05% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทันที เพื่อหยุดปฏิกิริยา เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (SmartSpec™ Plus, Bio-Rad Laboratories, CA., U.S.A.) แสดงค่าการย่อยสลายของโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักในหน่วยมิลลิโมล/กรัมตัวอย่างของกลุ่มอะมิโนแอลฟาเทียบกับลูซีน

3.1.4 การวิเคราะห์กิจกรรมโปรตีนเนส

สกัดเอนไซม์จากตัวปลา (Crude proteinase) โดยนำตัวอย่างปลาที่ตัดกับสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl (pH 7.0) ที่แช่เย็นเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1:9 ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000×g (Legend™ MACH 1.6/R, Thermo Electron LED GmbH, Lengensellbold, Germany) ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และกรองสารละลายส่วนใสด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บสารละลายส่วนใสสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมโปรตีนเนสโดยดัดแปลงตามวิธีของ Siringan et al. (2006a) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์คล้ายทริปซิน (Trypsine-like) โดยในสารผสม 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วยสารตั้งต้น Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl (pH 8.5) เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร และเอนไซม์สกัดที่เจือจางอย่างเหมาะสม ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารผสมบิวทานอล เมทานอล และน้ำกลั่นปราศจากไอออน ในสัดส่วน 30: 35: 35 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร วัดค่าความเข้มของการเรืองแสง (Fluorescence intensity) ด้วยเครื่อง Spectrofluorometer (RF-1501, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) ที่ค่าความยาวคลื่นกระตุ้น (Excitation wavelength) 380 นาโนเมตร และความยาวคลื่นของการคายพลังงาน (Emission wavelength) 460 นาโนเมตร กำหนดให้หน่วยกิจกรรม (Unit) คือ นาโนโมลของ AMC ต่อนาที แสดงค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) ในหน่วยกิจกรรม (Unit) ต่อกรัมตัวอย่าง

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์คล้ายไคโมทริปซิน (Chymotrypsin-like) ใช้สารตั้งต้น Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ (Tris-HCl (pH 9.0) เข้มข้น 0.2 โมลาร์ และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร

และเอนไซม์สกัดที่เจือจางอย่างเหมาะสม ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และวิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) ในหน่วยกิจกรรม (Unit) ต่อกรัมตัวอย่าง ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์คล้ายคาเทปซิน-แอล (Cathepsin L-like) โดยสารละลายผสมประกอบด้วย สารตั้งต้นสังเคราะห์ Z-Phe-Arg-AMC เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์ (0.2 M Tris-HCl (pH 9), 4 mM EDTA, 8 mM DTT, pH 5.5) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร และเอนไซม์สกัดที่เจือจางอย่างเหมาะสม ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร วิเคราะห์กิจกรรมที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที กำหนดให้หนึ่งหน่วยกิจกรรม (Unit) คือ นาโนโมลของ AMC ต่อนาที และแสดงค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) ในหน่วยกิจกรรม (Unit) ต่อกรัมตัวอย่าง ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ลูซีนอะมิโนเปปติเดส (Leucine aminopeptidase) โดยในสารผสม 1 มิลลิลิตร ใช้สารตั้งต้น L-Leucine-*p*-nitroaniline (pNA) เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl (pH 8.0) เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 0.85 มิลลิลิตร และเอนไซม์สกัด ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 80% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 402 นาโนเมตร กำหนดให้หน่วยกิจกรรม (Unit) คือ นาโนโมลของ pNA ต่อนาที แสดงค่ากิจกรรมจำเพาะในหน่วยกิจกรรม (Unit) ต่อกรัมตัวอย่าง

3.1.5 วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการทดลองสองซ้ำโดยทุกการทดลองวัดอย่างน้อย 2-3 replication วางแผนการทดลองแบบ Split-split plot design in Randomized Completely Block Design (RCBD) โดยกำหนดให้โซเดียมคลอไรด์เป็นพล็อตหลัก (Main plot) อุณหภูมิเป็นพล็อตย่อย (Sub plot) และเวลาเป็นพล็อตย่อยของพล็อตย่อย (Sub-sub plot) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS for Windows (Version 14.0; SPSS Inc., Chicago, IL., U.S.A.) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

3.2 การระบุชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา และการใช้ประโยชน์กล้าเชื้อในการหมักน้ำปลา

3.2.1 การเตรียมไอโซเลทในอาหาร Fish broth

คัดแยกไอโซเลทของแบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria) จากกระบวนการหมักน้ำปลา ในช่วง 1-12 เดือน โดยใช้ De Man, Rogosa, และ Sharpe (MRS) agar ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์

เข้มข้น 5 และ 15% และ MRS agar มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์ 5 หรือ 15% และแคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5% โดยใช้เทคนิค Spread plate บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน โดยใช้ Anaerobic chamber (SHEL LAB, Sheldon Manufacturing Inc., IA., U.S.A.) คัดแยก 2 ไอโซเลท ที่ทดสอบแล้วว่ามีความสามารถในการสร้างโปรตีนได้แก่ ไอโซเลท MS33 และ MCD10-5-10

เลี้ยงไอโซเลทในอาหาร Fish broth ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% เตรียมอาหาร Fish broth ตามวิธีของ Yongsawatdigul et al. (2007) โดยใช้ปลากระดูก (*Stolephorus* spp.) 1 ส่วนผสมกับน้ำกลั่น 2 ส่วน ต้มให้เดือด เป็นเวลา 20 นาที กรองส่วนผสมด้วยผ้าขาวบาง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใส ที่ 8,000×g (Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg, Germany) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้กรองผ่านผ้าขาวบางอีกครั้ง และปรับระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็น 25% ปรับ pH เป็น 7.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบตามที่กำหนด นำ Fish broth ที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ถ่ายไอโซเลทบริสุทธิ์จำนวน 5 มิลลิลิตร จากอาหาร MRS broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^5 - 10^6 CFU/มิลลิลิตร ลงในอาหาร Fish broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในสัดส่วน 2% นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน วัดการเจริญของแบคทีเรียโดยใช้ MRS agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 และ 15% และแคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5% โดยใช้เทคนิค Spread plate บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน

3.2.2 การระบุชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติก

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ สมบัติทางชีวเคมีและการสร้างแก๊สจากการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ตาม Holt et al. (1994)

ก. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์

ศึกษาลักษณะ รูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีย้อมแกรมของเซลล์แบคทีเรีย โดยเตรียม Smear ของแบคทีเรียที่มีอายุ 48 ชั่วโมง ที่เจริญบน MRS agar ตรึงเซลล์ให้ติดแผ่นแก้วสไลด์ด้วยความร้อน หยดสี Crystal violet (ภาคผนวก ก2) ให้ทั่วรอย Smear เป็นเวลา 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำเบาๆ หยด Gram's iodine (ภาคผนวก ก4) เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยแอลกอฮอล์ (95%) หรือ Acetone alcohol (ภาคผนวก ก1) จนไม่มีสีม่วงของ Crystal violet ออกมา แต่ไม่ควรเกิน 20 วินาที ล้างด้วยน้ำทันที ย้อมทับด้วยสี Safranin (ภาคผนวก ก5) เป็นเวลา 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ ทิ้งให้แห้ง ตรวจสอบรูปร่าง โครงสร้าง การเรียงตัวของเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope, Olympus, Olympus Optical Co., Ltd., Japan)

ข. การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี

ทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดเลือก โดยเตรียมแบคทีเรียบริสุทธิ์อายุ 48 ชั่วโมง ที่เจริญบน MRS agar และทดสอบสมบัติทางชีวเคมีดังนี้

(1) การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase)

วางแผ่นกระดาษกรอง Whatman No. 4 ลงในงานเลี้ยงเชื้อเปล่าที่สะอาด หยดสารละลาย Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (1%) (ภาคผนวก ก6) ลงบนกระดาษกรอง ใช้ลูป (Loop) เชี่ยแบคทีเรียบริสุทธิ์ป้ายลงบนกระดาษกรองที่เปียกสารละลายสำหรับทดสอบ ตรวจสอบการเปลี่ยนสีของเชื้อที่ป้ายบนกระดาษกรอง ซึ่งถ้าเป็นผลบวกของการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส เชื้อที่ป้ายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มภายใน 1 นาที

(2) การสร้างเอนไซม์คะตาเลส (Catalase)

ใช้ลูปเชี่ยแบคทีเรียบริสุทธิ์ป้ายบนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลาย Hydrogen peroxide (3%) (ภาคผนวก ก3) ลงบนเชื้อที่ป้ายไว้ ตรวจสอบการเกิดฟองแก๊ส ซึ่งเป็นผลบวกของการสร้างเอนไซม์คะตาเลส

(3) การทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรตีนเอส (Proteinase) อะไมเลส (Amylase) และไลเปส (Lipase)

ทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรตีนเอส อะไมเลส และไลเปส โดยใช้อาหาร MRS agar ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 หรือ 10 % ที่เติม Skim milk, Soluble starch และ Tween 80 ตามลำดับ ในระดับความเข้มข้น 1% โดย Point inoculation เชื้อลงบนผิวหน้าอาหารที่บรรจุในงานเลี้ยงเชื้อ ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้เชื้อเจริญในสภาพที่ไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจสอบผลการสร้างโปรตีนเอสโดยตรวจสอบบริเวณใสรอบโคโลนี (Clear zone) ตรวจสอบผลการสร้างอะไมเลสโดยหยดสารละลายไอโอดีนบนโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร ตรวจสอบบริเวณใสรอบโคโลนี (ควรรอ่านผลภายใน 2 นาที) และตรวจสอบผลการสร้างไลเปสจากการเกิดตะกอนขุ่นขาวของเกลือแคลเซียมของกรดไขมันรอบโคโลนี

ค. การทดสอบการสร้างแก๊สจากการหมักน้ำตาล

เชี่ยเชื้อบริสุทธิ์อายุ 48 ชั่วโมง ที่เจริญบน MRS agar ลงในอาหาร MRS broth (ภาคผนวก ข7) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 10% และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5% ที่บรรจุหลอดดักแก๊ส บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน ตรวจสอบการสร้างแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดดักแก๊ส

ง. การทดสอบปัจจัยทางเคมีและกายภาพที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย

ปัจจัยทางเคมีและกายภาพที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทดสอบเพื่อช่วยจัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรีย มีดังนี้

(1) ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์

ศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญ โดยเตรียมแบคทีเรีย อายุ 3 วัน ที่เจริญใน MRS broth (ภาคผนวก ข7) ถ่ายเชื้อลงใน MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 3, 6.5, 10, 15, 18, 20 และ 25% ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2% ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 1-7 วัน ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียโดยตรวจนับเชือบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 และ 10% และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5% บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน

(2) อุณหภูมิ

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ โดยใช้อาหาร MRS broth (ภาคผนวก ข7) ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 10% ตามที่แต่ละไอโซเลทที่คัดเลือกเจริญได้ดี ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการศึกษาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 10, 15, 25, 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรีย

(3) ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ศึกษาผลของ pH ต่อการเจริญ โดยใช้อาหาร MRS broth (ภาคผนวก ข7) ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 10% ตามที่แต่ละไอโซเลทที่คัดเลือกเจริญได้ดี ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 และ 9.0 ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการศึกษาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรีย

จ. การวิเคราะห์ Stereoisomer กรดแล็กติก

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหาร MRS broth ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ $10,000 \times g$ ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สารละลายส่วนใสที่ได้นำไปกรองผ่านเยื่อกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร และเจือจางเป็น 100 เท่า ด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) แยกกรดแล็กติกในรูปดีและรูปแอลโดยใช้เครื่อง HPLC (Water2487, Waters Inc., Midford, MA., U.S.A.) ที่ต่อกับคอลัมน์ Chiral Astec CLC-L column (5 ไมโครเมตร, 4.6 มิลลิเมตร \times 15

เซนติเมตร, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., U.S.A.) ฆะด้วยสารละลาย Mobile phase (CuSO₄ เข้มข้น 0.005 โมลาร์) ด้วย Isocratic ที่อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดแบคทีเรียเล็กตัก ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (Manome et al., 1998)

ฉ. การวิเคราะห์สารพันธุกรรมของแบคทีเรีย

วิเคราะห์สารพันธุกรรมในส่วนของ 16S rRNA gene ตามขั้นตอนดังนี้

(1) การสกัด Genomic DNA จากเซลล์แบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร MRS broth ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน เก็บเกี่ยวเซลล์ในช่วงปลายของระยะ Log phase นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000×g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (Multispeed refrigerated centrifuge PK121R, ALC, Princeton, NJ., U.S.A.) และล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-ethylenediamine เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 8.0) และล้างเซลล์อีกครั้งด้วยสารละลายไลซิสบัฟเฟอร์ (Lysis buffer, pH 8.0) ซึ่งประกอบด้วยซูโครสเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ EDTA เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 480 ไมโครลิตร จากนั้นเติมไลโซไซม์ (Lysozyme) เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 60 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (SDS) เข้มข้น 20% ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเติมสารละลาย RNase เข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำสารผสมไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,500×g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (Multispeed refrigerated centrifuge PK121R, ALC, Princeton, NJ., U.S.A.) เก็บส่วนใส จากนั้นเติมสารละลายไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ลงในสารละลายส่วนใส ตกตะกอน DNA ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,500×g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (Multispeed refrigerated centrifuge PK121R, ALC, Princeton, NJ., U.S.A.) แล้วเติมเอทานอลเข้มข้น 70% ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,500×g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทเอทานอลทิ้ง จากนั้นทำแห้ง DNA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-ethylenediamine เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 8.0) และบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Vassu et al., 2002) ตรวจหา Genomic DNA ที่สกัดได้ด้วย Agarose gel electrophoresis โดยใช้อะกาโรสเข้มข้น 0.9% (Low EEO Agarose, BIO 101, Inc., La Jolla, CA., U.S.A.) ในสารละลาย Tris-Borate buffer (TBE) (ภาคผนวก ก7) และใช้ 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ life technologies, Rockville, MD., U.S.A.) เป็นสารมาตรฐาน (DNA Molecular

weight markers) แยกชิ้นของ DNA ตามขนาดด้วยค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลท์ ตรวจสอบตำแหน่งของแถบ DNA โดยย้อม Agarose gel ด้วย Ethidium bromide (1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 15 นาที และตรวจดูการเรืองแสงของแถบ DNA ด้วย UV Transilluminator และเก็บ DNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

(2) การเพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene

เพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ด้วย Primers fD1 และ rP2 (ตารางที่ 3.1) เพื่อเพิ่มจำนวนของ DNA fragment ขนาดประมาณ 1,500 bp ของ 16S rRNA gene (Weisburg et al., 1991) โดยเตรียมส่วนผสม (PCR reaction mixture) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM KCl; Invitrogen™ Life Technologies, Foster, CA., U.S.A.) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร Nucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Promega) ความเข้มข้นชนิดละ 2 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร Primer (fD1 และ rP2; Sigma Proliigo, Helios, Singapore) ความเข้มข้น 10 พิโคโมล ปริมาตร 2 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™ life technologies, Foster, CA., U.S.A.) เข้มข้น 5 หน่วย ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ Genomic DNA เข้มข้น 10-150 นาโนกรัม ปริมาตร 4 ไมโครลิตร และใช้กระบวนการเพิ่มปริมาณ DNA ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Thermal Cycler (Thermo electron corporation Px2 Thermal Cycler, U.S.A.) จำนวน 35 รอบ โดยตั้งค่าอุณหภูมิและเวลาตามลำดับดังนี้ (1) Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที (2) รอบที่ 1-35 โดยแต่ละรอบประกอบด้วย Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และ (3) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วย Agarose gel electrophoresis โดยใช้ Agarose (BIO 101, Inc., La Jolla, CA., U.S.A.) เข้มข้น 1 % ในสารละลาย TBE ใช้ 1 Kb Plus DNA Ladder (Fermentas life sciences, EU) เป็น DNA Molecular weight markers แยกชิ้นของ DNA และตรวจสอบตำแหน่งของ DNA ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการตรวจหา Genomic DNA ดังรายละเอียดข้างต้น

(3) การต่อชิ้นของ DNA เข้ากับ Plasmid vector และการเพิ่มจำนวน (Clone)

Vector ใน *E. coli* DH5 α

ทำบริสุทธิ์ DNA โดยแยกชิ้น DNA ด้วย Agarose gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้นของอะกาโรส 1% ตัดชิ้นส่วนของ Agarose gel ที่มี DNA ภายใต้อาสง UV โดยใช้ Wizard Gel/PCR Product Purified kit (Promega, Promega corporation, Madison, WI., U.S.A) จากนั้นทำการ

เชื่อมต่อ (ligation) ชิ้นส่วนของ DNA เข้ากับ pGEM-T Easy Vector (Promega, Promega corporation, Madison, WI., U.S.A) ด้วยสารละลายผสมที่ประกอบด้วย 2X Rapid ligation buffer (Promega) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร pGEM-T Easy Vector (50 นาโนกรัม) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผลผลิต PCR 3 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase (3 Units) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำสารละลายผสมบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน และเก็บสารละลายผสม ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำเข้า *E. coli* DH5 α

ตารางที่ 3.1 Universal primers สำหรับเพิ่มจำนวน 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction

Primer	Primer sequence (5' to 3')	Target region	Reference
16S rRNA gene Amplification			
fd1	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	8-27	Weisburg et al. (1991)
rP2	5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'	1490-1511	Weisburg et al. (1991)
Nucleotide sequencing			
T7	5'-TAATACGACTCACTATAG GG -3'	53-72	Hans et al. (2002)
SP6	5'-TAATACGAC TCACTATAG GG -3'	2896-2916	Hans et al. (2002)
Forward	5'-TAACTACGTGCCAGCAGCC-3'	515-533	Design from nucleotide sequencing results of this research project
Reverse	5'-CGACAACCATGCACCACCTG-3'	1008-1027	Design from nucleotide sequencing results of this research project

(3.1) การเตรียม Competent cell

โดยดัดแปลงวิธีจาก Sambrook and Russell (2001) ซึ่งมีวิธีการเตรียม ดังนี้ เลี้ยง *E. coli* DH5 α ใน Luria-Bertani broth (LB broth) (ภาคผนวก ข2) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200×g เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 100 ไมโครลิตร ลงใน LB

broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 3 ชม. (ให้ได้ค่า $O.D._{600} = 0.4$) ถ่ายเชื้อลงในหลอด Polypropylene tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่แช่เย็น ปั่นเหวี่ยงที่ $4,000 \times g$ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (RC 28S; Sorvall Co., Newtown, Conn., U.S.A.) เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์สองครั้งด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ที่แช่เย็น 30 มิลลิลิตร จากนั้นล้างเซลล์สองครั้งด้วยสารละลายกลีเซอรอลเข้มข้น 10% ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ $4,000 \times g$ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (RC 28S; Sorvall Co., Newtown, Conn., U.S.A.) เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ GYT (ภาคผนวก ข1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดขึ้น-ลง แบ่ง Competent cell 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด Centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แช่แข็งในไนโตรเจนเหลวทันทีแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

(3.2) การนำ Vector เข้าใน *E. coli* DH5 α (Transformation)

นำ Competent cell มาละลายในน้ำแข็งโดยใช้เวลาประมาณ 3-5 นาที เติม Vector ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร บ่มในน้ำแข็งประมาณ 15 นาที จากนั้นถ่าย Competent cell ลงใน Cuvett ขนาด 100 ไมโครลิตร จ่ายกระแสไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง Electroporator (Electroporator 2510, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) ที่ตั้งค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,800 โวลต์ ถ่าย Competent cell ลงใน LB broth ปริมาตร 450 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 45 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ $3,000 \times g$ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (RC 28S; Sorvall Co., Newtown, Conn., U.S.A.) เทส่วนใสทิ้งบางส่วนเพื่อให้เหลือส่วนใสในหลอด Centrifuge ประมาณ 100 ไมโครลิตร จากนั้น Spread เชื้อลงบน LB agar ที่เติม Ampicillin เข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal) เข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเลือกเก็บโคโลนีที่มีสีขาวโดย Streak บน LB agar (ภาคผนวก ข3) ที่เติม Ampicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยา Plasmid เพื่อตรวจสอบผลการเชื่อมต้อ (Ligation) โดยใช้ Wizard DNA Purified kit (Promega) จากนั้นตัด DNA fragment ออกจาก Plasmid vector ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ตรวจสอบ DNA fragment และ plasmid โดยใช้ Agarose gel electrophoresis เข้มข้น 2% โดยใช้ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas life sciences, EU) เป็น DNA Molecular weight markers

(4) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S RNA gene

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ที่เชื่อมอยู่กับ pGEM-T Easy Vector โดยใช้ Primer T7/SP6 (ตารางที่ 3.1), Terminator Ready Reaction kit version 2.0 (Perkin

Elmer, Applied Biosystems, Inc., Torrance, CA., U.S.A.) และ ABI3730xl DNA analyzer (Model 373, Foster, CA., U.S.A.) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรีย ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล Nucleotide sequence database ของ GenBank หรือ National Center for Biotechnological Information (NCBI) ประเทศสหรัฐอเมริกา (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) โดยใช้ Blast version 2.2.9 program และตรวจสอบเพื่อให้ได้ Alignment ของ DNA sequence ที่เหมาะสมด้วย BioEdit Program (North Carolina State University, U.S.A.) และสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum Parsimony โดยใช้ MEGA version 4.0 (Kumar et al., 2004)

3.2.3 การวิเคราะห์สารระเหยในอาหาร Fish broth ด้วยวิธี Purge and trap

ถ่ายไอโซเลทที่แยกได้บนอาหาร MRS broth agar ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% และแคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5% บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาพไร้ออกซิเจน จำนวน 1 หลบ ลงในอาหาร Fish broth ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000×g (Legend™ MACH 1.6/R, Thermo Electron LED GmbH, Lengensellbold, Germany) ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สารละลายส่วนใสที่แยกได้นำไปวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการของสารระเหยด้วยวิธี Purge and trap (Texmar velocity XPT™, Teledyne Tekmar, Mason, OH., U.S.A.) ควบคู่กับการแยกสารและระบุชนิดของสารด้วยเทคนิค Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) ใช้ตัวอย่างในอาหาร Fish broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม Cyclohexanol ซึ่งเป็นสารมาตรฐานภายใน (Internal standard) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ Purge ตัวอย่าง คือ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ภายใต้ก๊าซฮีเลียมเป็นเวลา 20 นาที ในอัตราการไหลของตัวอย่าง 40 มิลลิลิตร/นาที สารระเหยจะถูกดักจับด้วยใช้คอลัมน์ Tenax TA และทำให้ระเหยออก (Desorbed) ที่ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที แยกสารระเหยโดยใช้ Gas chromatography-mass spectrometry (Varian Inc., Walnut Creek, CA., U.S.A.) ต่อกับ Capillary column (DB-WAX, 60 เมตร×0.25 มิลลิเมตร×0.25 ไมโครเมตร Agilent Technologies, Redwood, CA., U.S.A.) ตั้งค่าการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ (Oven temperature) จาก 25 จนถึง 250 องศาเซลเซียส ในอัตราการไหล 15 องศาเซลเซียส/นาที ระบุสารระเหยโดยใช้ Quadrupole mass detector (Mass spectrometer 1200L quadrupole, Varian Inc., Walnut Creek, CA., U.S.A.) วิเคราะห์มวลสารด้วย Ionization energy ที่ 70 eV คำนวณปริมาณสารระเหยเชิงสัมพัทธ์จากพื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่าง ต่อพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานภายใน (Cyclohexanol) คำนวณค่า Kovats Index และเปรียบเทียบ Mass spectra กับฐานข้อมูลของ National Institute of Standards:NIST data (Shimoda et al., 1996)

3.2.4 การใช้แบคทีเรียกรดแล็กติกในการหมักน้ำปลา

ก. การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมเชื้อแบคทีเรียสำหรับหมักน้ำปลาโดยถ่ายไอโซเลท MS33 และ MCD10-5-10 ประมาณ 1 หลบ ลงในอาหาร Fish broth (pH 7.0) ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 25% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 7 วัน จำนวนแบคทีเรียก่อนนำไปใช้มีค่าเท่ากับ $10^5 - 10^6$ CFU/มิลลิลิตร

ข. การเตรียมวัตถุดิบและการหมักน้ำปลาด้วยเอนไซม์ทางการค้าร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก

ชั่งตัวอย่างปลากระตักสด 1 กิโลกรัม ใส่โหลแก้วที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.7 เซนติเมตร และสูง 17 เซนติเมตร ให้ความร้อนตัวอย่างจนอุณหภูมิจุดศูนย์กลางของขวดแก้วอยู่ที่ 65 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase 2.4L) ในระดับ 0.25% บ่มต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นลดอุณหภูมิของตัวอย่างลงที่ 50 องศาเซลเซียส แล้วเติมเอนไซม์ฟลาวูไซม์ (Flavozyme 500L) ในระดับ 0.5% บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมเกลือสมุทร 25% ปล่อยให้อุณหภูมิของตัวอย่างลดลงจนถึง 35 องศาเซลเซียส เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก (ที่เตรียมตามวิธีข้างต้น) ในปริมาณ 10% ของตัวอย่าง เตรียมตัวอย่างควบคุมเหมือนข้างต้น ยกเว้นเติม Fish broth ในระดับ 10% แทนการเติมกล้าเชื้อเริ่มต้น เตรียมตัวอย่าง 2 ขี้ บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่าง 10 กรัมต่อครั้ง ในวันที่ 0, 14, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 เพื่อบันทึกจำนวนจุลินทรีย์ ตรวจวิเคราะห์ค่า pH โดยใช้เครื่อง pH meter (Mettler-Toledo MP220, Schwerzenbach, Switzerland) ตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มแอลฟากรดอะมิโน (α -Amino group) ตามวิธีของ Adler-Nissen (1979) ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 18% คือ Plate count agar (PCA) JCM 168 และ MRS agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5% อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ JCM 168 บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส ในสภาวะมีออกซิเจน เป็นเวลา 7-10 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 7-10 วัน หลังบ่มตัวอย่างจนครบ 6 เดือน กรองตัวอย่างน้ำปลาเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนตามวิธีของ Adler-Nissen (1979) โดยใช้ลูซีนเป็นสารมาตรฐาน ดังระบุในหัวข้อ 3.1.3 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนตามวิธี AOAC (2000) วิเคราะห์ปริมาณเกลือด้วยหลักการ Volhard ตามวิธี AOAC (2000) วิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนโดยเครื่อง HPLC (Eerola et al., 1993) วัดสีโดยเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3 แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (GBC UV/VIS 916; GBC Scientific Equipment PTY, Ltd., Australia) และวิเคราะห์สารให้กลิ่นรสในเดือนที่ 6 ตามวิธีในข้อ 3.2.3

ค. การวิเคราะห์ Amino acid profile

เตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนทั้งหมด (Total amino acids) ตามวิธีของ Tungkawachara et al. (2003) โดยย่อยตัวอย่างน้ำปลาที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionized distilled water) ในอัตราส่วน 1:10 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 12 นอร์มอล ที่ประกอบด้วยสารละลายฟีนอลเข้มข้น 1% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหม้อนึ่ง (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เข้มข้นด้วย Vacuum rotary evaporator ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้จากการระเหยแห้งมาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 20 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านด้วยแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร โดยคำนวณปริมาณของกรดอะมิโนด้วยเครื่อง Amino acid analyzer (Biochrom 30, Pharmacia-Biotech, Buckinghamshire, UK) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรท (Sodium citrate) ที่ pH 3.2-4.9 เป็น Mobile phase

เตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนอิสระ (Free amino acid) ตามวิธีของ Tungkawachara et al. (2003) โดยตกตะกอนโปรตีนของตัวอย่างน้ำปลาปริมาตร 2 มิลลิลิตร ด้วย 5'-sulfolysalicylic acid (SSA) จำนวน 100 มิลลิกรัม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuged ที่ 1,500×g เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระ แสดงปริมาณกรดอะมิโนในหน่วยของมิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร

ง. การวิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีน

เตรียมอนุพันธ์ของตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน โดยนำตัวอย่างน้ำปลาหรือสารละลายมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของสารมาตรฐานภายใน (Internal standard) ไดอะมิโนเฮปแทน (Diaminoheptane) เข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร สารละลายอิมมัวโซเดียมไบคาร์บอเนตปริมาตร 300 ไมโครลิตร และแดนซิลคลอไรด์ (Dansyl chloride) เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มสารผสมที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา Dansylation อย่างสมบูรณ์ จากนั้นเติมแอมโมเนียเข้มข้น 30% ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เพื่อการกำจัดแดนซิลคลอไรด์ที่คงเหลือจากปฏิกิริยา ปรับปริมาตรสารละลายผสมให้ครบ 5 มิลลิลิตร ด้วยอะซิโตนไตรล์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2500×g เป็นเวลา 5 นาที (Legend™ MACH 1.6/R, Thermo Electron LED GmbH, Lengensellbold, Germany) กรองสารละลายส่วนใสด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร

วิเคราะห์ปริมาณไบโอเจนิกเอมีนด้วยเครื่อง HPLC (HP 1100, Agilent Technologies, CA., USA) โดยใช้คอลัมน์ Hypersil BDS C18 (3 ไมโครเมตร, 100×4 มิลลิเมตร, Agilent Technologies, CA., USA) ตรวจวัดอนุพันธ์โดย Diode array detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เป็นความยาวคลื่นอ้างอิง สารชะประกอบด้วยส่วนผสมของ Mobile phase A และ B โดย Mobile phase A ประกอบด้วย อะซิโตนไนไตรล์ และกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:9 ส่วน Mobile phase B ประกอบด้วย กรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์:อะซิโตนไนไตรล์:เมทานอล ในอัตราส่วน 1:4.5:4.5 ใช้การชะแบบ Gradient ด้วยอัตราส่วนของ Mobile phase A และ B ดังรายละเอียดข้างล่างนี้ ด้วยอัตราการไหลที่ 1 มิลลิลิตร/นาที โดยควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 28 องศาเซลเซียส

เวลา (นาที)	Mobile phase A	:	Mobile phase B
0	50%	:	50%
5	50%	:	50%
10	40%	:	60%
15	30%	:	70%
20	20%	:	80%
25	10%	:	90%

จ. การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ผู้ทดสอบทำการประเมินความชอบ (Hedonic test) ของคุณลักษณะทางด้านสี (Color) กลิ่น (Odor) กลิ่นรส (Flavor) และความชอบโดยรวม (Overall acceptance) ของตัวอย่างน้ำปลาที่หมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรีย เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างน้ำปลาทางการค้า (หมัก 12 เดือน) รวมจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 4 ตัวอย่าง โดยใช้ผู้ทดสอบจากสถานประกอบการจำนวน 10 คน เสรีฟตัวอย่างแบบสุ่มให้กับผู้ทดสอบ เพื่อประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยให้เป็นช่วงคะแนน 1-7 คะแนน

3.2.5 วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการทดลองสองซ้ำโดยทำการทดลองตัวอย่างน้อย 2-3 replication ผลของการใช้กล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD 10-5-10 และ *T. halophilus* MS33 ร่วมกับเอนไซม์ต่อปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน และลักษณะทางเคมีของตัวอย่างน้ำปลาใช้การทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม

วิเคราะห์ทางสถิติ SPSS for Windows (Version 14.0; SPSS Inc., Chicago, IL., U.S.A.) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

3.3 การใช้กล้าเชื้อจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำปลา และการย่อยสลายตัวเองในกระบวนการหมักน้ำปลา

จากการทดลองเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายตัวเองของปลากระตัก พบว่าสภาวะที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 15 % บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ผลงานวิจัยหัวข้อ 3.1) เป็นสภาวะที่เหมาะสม เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสามารถประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม จึงศึกษาผลของการลดอุณหภูมิการบ่ม ดังนี้

นำปลากระตักสด 600 กรัม เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10 และ 15 % บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ติดตามปริมาณโอลิโกเปปไทด์ในรูปกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α -Amino group) ตามวิธีของ Adler-Nissen (1979) โดยใช้ลูซีนเป็นสารมาตรฐาน ดังระบุในหัวข้อ 3.1.3 และวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายตัวเองของปลากระตัก โดยนำตัวอย่าง 3 กรัม บ่มผสมกับ Trichloroacetic acid (TCA) ที่เข้มข้นเข้มข้น 5% (w/v) ปริมาตร 27 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ $10,000 \times g$ ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Universal 16R, Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, Germany) นำสารละลายส่วนใส (Supernatant) ไปวิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ที่เกิดจากการย่อยสลายตัวเองด้วยวิธี Lowry (Lowry et al., 1951) โดยใช้ไทโรซีนเป็นสารละลายมาตรฐาน แสดงค่าการย่อยสลายตัวเองในหน่วยนาโนโมลของไทโรซีนต่อกรัมตัวอย่าง

3.3.1 ผลการเติมกล้าเชื้อในกระบวนการหมักน้ำปลา

กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ใช้ในการทดสอบคือ *T. halophilus* MCD 10-5-10 และ *T. halophilus* MS33 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในกระบวนการหมักคือ ปลากระตักสด และปลากระตักที่ผ่านการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง การทดลองนี้เตรียมตัวอย่างโดยใช้สภาวะการเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองแทนการใช้เอนไซม์ทางการค้า

กระตุ้นการเจริญของกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD 10-5-10 และ *T. halophilus* MS33 ในอาหาร MRS ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% เตรียมอาหารน้ำคาวปลา โดยเจือจางน้ำคาวปลาด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาณเกลือ 15% ปรับ pH ให้ได้ 7 จำนวนแบคทีเรียก่อนนำไปใช้มีค่าเท่ากับ 10^5 - 10^6 CFU/มิลลิลิตร เติมห้าเชื้อในระดับ 1% บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อ (10%) ลงในปลากระตักสด และปลากระตักที่ผ่านการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ปริมาณ 1 กิโลกรัม คลุกเคล้าด้วยเกลือสมุทร 250 กรัม เตรียมชุดควบคุมคือปลากระตักสดหมัก

ด้วยเกลือ 25% โดยไม่เติมกลูต้าเซื่อ ติดตามการเจริญของ *T. halophilus* MCD 10-5-10 และ *T. halophilus* MS33 ทุก 1 เดือน โดยเทคนิค Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15% คือ Plate count agar (PCA) และ MRS agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5% อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส ในสภาวะมีออกซิเจน เป็นเวลา 7-10 วัน และอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 7-10 วัน วิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ในรูปของไทโรซีน (Tyrosine) ตามวิธี Lowry (Lowry et al., 1951) และปริมาณแอลฟาอะมิโน (α -Amino group) ตามวิธีของ Adler-Nissen (1979) ดังระบุในหัวข้อ 3.1.3 ทุกเดือน เมื่อหมักเป็นเวลา 7 เดือน นำตัวอย่างน้ำปลาที่กรองแล้วมาทำวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมด (TN) ด้วยวิธี AOAC (2000) ปริมาณเกลือด้วยหลักการ Volhard ตามวิธี AOAC (2000) วัดค่าสีโดยตัวอย่างน้ำปลาเจือจางด้วยน้ำปราศจากอิออนในอัตราส่วน 1:3 (w/w) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (GBC UV/VIS 916; GBC Scientific Equipment PTY, Ltd., Australia) ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร วัดค่า pH โดยใช้เครื่อง pH meter (Mettler-Toledo MP220, Schwerzenbach, Switzerland) และวิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนโดยเครื่อง HPLC (Eerola et al., 1993) ดังระบุในหัวข้อ 3.2.4 (ค)

3.3.2 วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการทดลองสองซ้ำโดยทุกการทดลองวัดอย่างน้อย 2-3 replication ศึกษาผลของกลูต้าเซื่อ (*T. halophilus* MCD 10-5-10 และ *T. halophilus* MS33) และสภาวะเหนี่ยวนำการย่อยสลาย (บ่มและไม่บ่ม) ต่อปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน และลักษณะทางเคมีของตัวอย่างน้ำปลา โดยใช้ในการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS for Windows (Version 14.0; SPSS Inc., Chicago, IL., U.S.A.) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ผลการศึกษาการย่อยสลายตัวเองของปลากระตัก

4.1.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ โอลิโกเปปไทด์

รายงานวิจัยของ Siringan et al. (2006b) พบกิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin-like, Chymotrypsin-like และ Cathepsin L-like จากปลากระตัก ตลอดระยะเวลาการหมัก 1 ปี แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์สูง และตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ Leucine-aminopeptidase ได้ในเดือนที่ 1 อย่างไรก็ตาม สภาพการหมักน้ำปลา (35-40 องศาเซลเซียส, pH 5.2-5.8 และ โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25-30%) นั้นไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว จึงอาจเป็นเหตุผลหนึ่งทำให้กระบวนการย่อยสลายโปรตีนปลาในระหว่างการหมักเกิดขึ้นต่ำ ดังนั้นแนวทางหนึ่งในการเร่งกระบวนการหมักน้ำปลาคือเพิ่มการย่อยสลายตัวเองของปลากระตัก ซึ่งเป็นแนวทางที่ใช้ประโยชน์จากสิ่งที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติให้เต็มประสิทธิภาพ

ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ในรูปของกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α -Amino group) ซึ่งแสดงถึงการย่อยสลายของโปรตีนมีค่าเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการบ่มในทุกตัวอย่าง ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.1a-c) การบ่มปลากระตักที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในสถานะไม่มีเกลือมีผลให้ค่ากลุ่มแอลฟาอะมิโนสูงสุด (0.97 มิลลิโมล/กรัมตัวอย่าง, รูปที่ 4.1a, $p < 0.05$) รองลงมาคือที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5, 10 และ 15% ซึ่งมีค่า 0.76, 0.64 และ 0.60 มิลลิโมล/กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ การเพิ่มความเข้มข้นของเกลือมีแนวโน้มลดการทำงานของเอนไซม์ในตัวอย่าง ส่งผลให้การย่อยสลายโปรตีนลดลง อย่างไรก็ตาม เมื่อบ่มในระยะเวลาที่นานขึ้นถึง 120 ชั่วโมง พบว่าตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% มีค่าการย่อยสลายสูงสุด (6.01 มิลลิโมล/กรัมตัวอย่าง) รองลงมาคือตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15% (3.27 มิลลิโมล/กรัมตัวอย่าง) ส่วนตัวอย่างที่ไม่มีและมีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% เกิดการเน่าเสีย เนื่องจากเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งตามปกติจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส โดยจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ มีจำนวนสูงเกิน 10^6 CFU/มิลลิลิตร เมื่อบ่มเกิน 4 ชั่วโมง

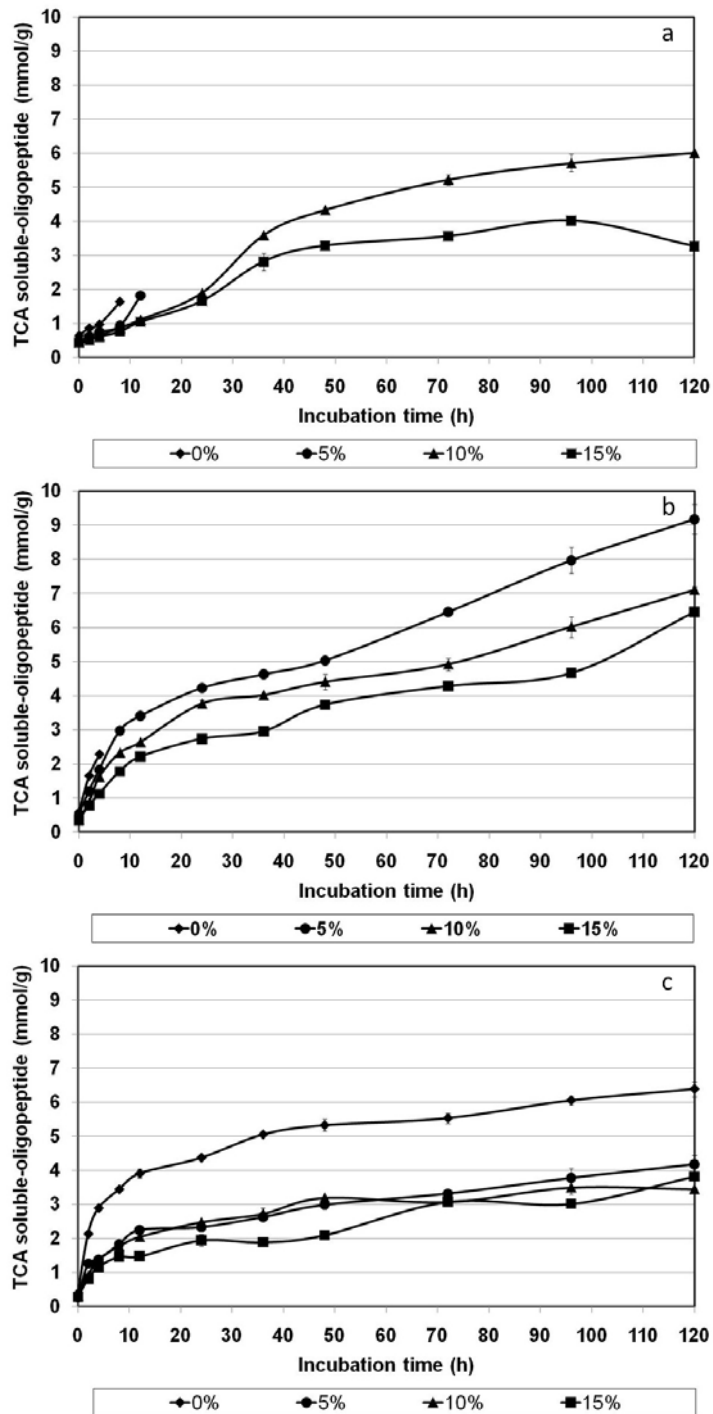
การบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ไม่มีเกลือมีค่าแอลฟาอะมิโนสูงสุด (2.28 มิลลิโมล/กรัมตัวอย่าง) รองลงมาคือตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5, 10 และ 15% ซึ่งมี 1.83, 1.62 และ 1.12 มิลลิโมล/กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ (รูปที่ 4.1 b, $p < 0.05$) ซึ่งเป็นผลเช่นเดียวกับการบ่ม

ที่ 35 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม เมื่อบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่าการย่อยสลายสูงสุด (9.18 มิลลิโมล/กรัมตัวอย่าง) รองลงมาคือตัวอย่างที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% (7.10 มิลลิโมล/กรัมตัวอย่าง) และ 15% (6.45 มิลลิโมล/กรัมตัวอย่าง) ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างที่ไม่มีเกลือเกิดการเน่าเสียหลังจากการบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ไม่มีเกลือเกิดการย่อยสลายสูงสุด รองลงมาคือที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5, 10 และ 15% ตามลำดับ (รูปที่ 4.1 c) ไม่พบตัวอย่างเน่าเสียที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ที่ทุกสภาวะเกลือและสภาวะที่ไม่มีเกลือ เนื่องจากเป็นช่วงที่อุณหภูมิสูงเกินกว่าที่เชื้อจะสามารถเจริญได้

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบในแต่ละอุณหภูมิการบ่มที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมงแรก พบว่าที่ 65 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีเกลือสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายสูงสุด ลำดับถัดมาคือ การบ่มที่ 50 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนที่ระยะเวลาบ่ม 120 ชั่วโมง พบว่าที่ 50 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายสูงสุด รองลงมาคือการบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีเกลือ และที่ 35 องศาเซลเซียส ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% (รูปที่ 4.1 a-c, $p < 0.05$) Ishida et al. (1994) รายงานว่า Serine proteinase จากเนื้อปลากระดูกงูเกลือมีกิจกรรมสูงสุดที่ 55 องศาเซลเซียส Siringan et al. (2006b) รายงานว่ากิจกรรมการย่อยสลายสูงสุดของปลากระดูก (Stolephorus indicus) คือที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนที่พบในปลาทรายแดง (Kinoshita et al., 1990) ปลาแอนโชวี (*Engraulis japonica*) (Heu et al., 1995) และ Atlantic menhaden (Boy and Lanier, 1988) มีกิจกรรมสูงที่อุณหภูมิประมาณ 45-65 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองนี้ บ่งชี้ว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายตัวเองสูงสุด เมื่อบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

3.1.2 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของโปรตีนเอส

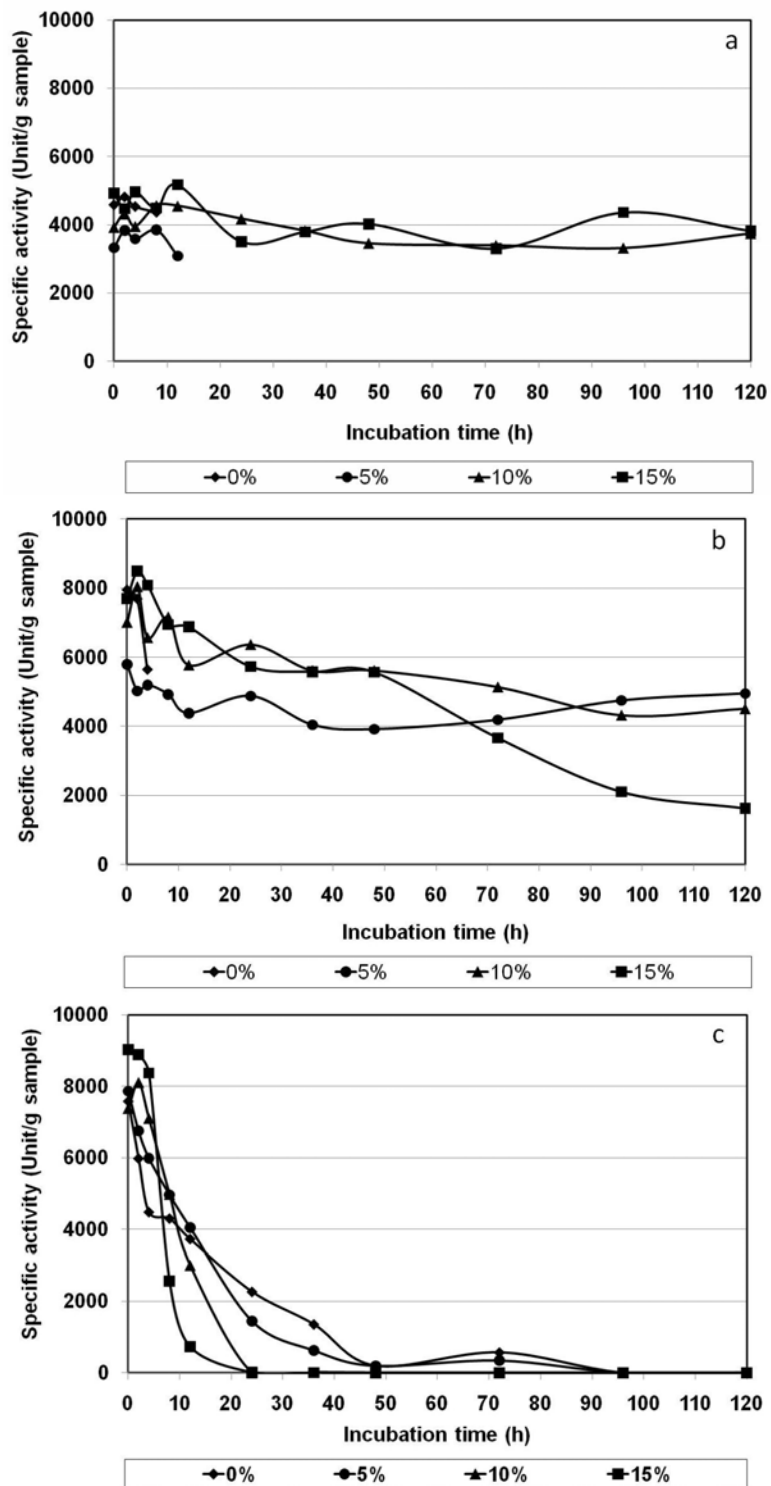
เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin-like ซึ่งเป็นโปรตีนเอสเด่นที่พบภายในปลากระดูก พบว่าเมื่อบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (รูปที่ 4.2 a) ตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15% แสดงค่ากิจกรรมสูงสุด (4967.5 หน่วย/กรัมตัวอย่าง) และตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% แสดงกิจกรรมต่ำสุด (3590.5 หน่วย/กรัมตัวอย่าง) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาเสถียรภาพของเอนไซม์ในระยะยาว พบว่าตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15% มีเสถียรภาพสูงสุด (3815.0 หน่วย/กรัมตัวอย่าง) ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่มีและที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% เกิดการเน่าเสีย เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (รูปที่ 4.2b) กิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin-like ในตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15% แสดงค่ากิจกรรมสูงสุด (7097.9 หน่วย/กรัมตัวอย่าง) ส่วนตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์



รูปที่ 4.1 ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ในรูปของปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α -Amino group) ในตัวอย่างปลากระตักที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อต้มที่อุณหภูมิ 35 (a), 50 (b) และ 65 องศาเซลเซียส (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ

เข้มข้น 5 % แสดงค่ากิจกรรมต่ำสุด (5196.8 หน่วย/กรัมตัวอย่าง) อย่างไรก็ตาม เมื่อบ่มเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% แสดงค่ากิจกรรมสูงสุด (4954.2 หน่วย/กรัมตัวอย่าง) แสดงว่าที่ความเข้มข้นของเกลือสูงมีผลต่อเสถียรภาพของเอนไซม์เมื่อบ่มเป็นระยะเวลาานาน ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.2c) กิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin-like ลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะในตัวอย่างที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูง โดยตรวจพบกิจกรรมเพียงเล็กน้อยที่เกลือ 10-15% เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

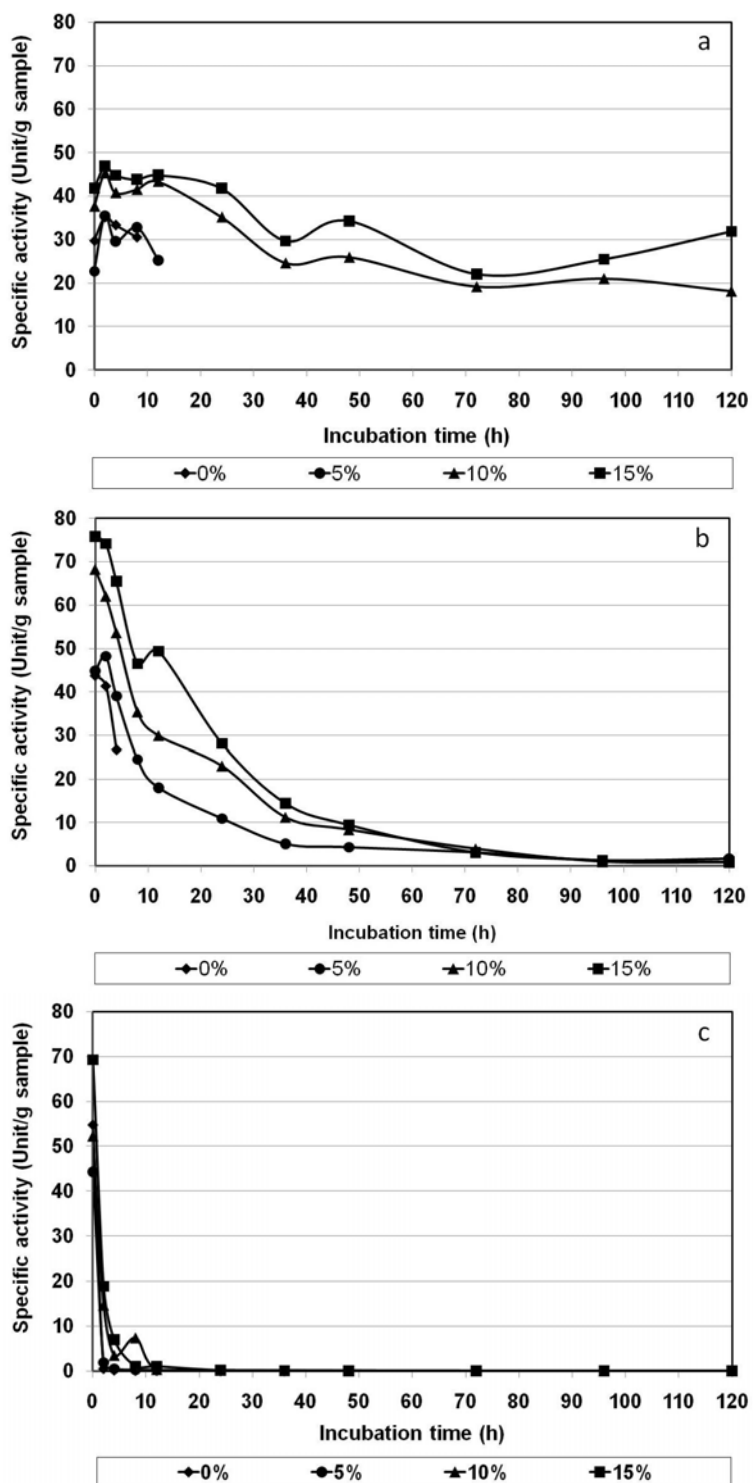
เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบในแต่ละอุณหภูมิการบ่ม (รูปที่ 4.2 a-c) พบว่าที่ระยะเวลาการบ่มสั้น (4 ชั่วโมง) กิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin-like มีค่าสูงที่อุณหภูมิสูง ที่ทุกความเข้มข้นของเกลือแสดงกิจกรรมต่ำสุด ส่วนการบ่มระยะยาว (120 ชั่วโมง) เอนไซม์แสดงกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5-10% แสดงค่ากิจกรรมสูงสุด การบ่มที่อุณหภูมิสูง (65 องศาเซลเซียส) มีผลเร่งการย่อยสลายตัวเอง (รูปที่ 4.2b-c) เนื่องจากเป็นการกระตุ้นกิจกรรมของโปรตีนในตัวปลา แต่มีผลลดเสถียรภาพของเอนไซม์ โดยเฉพาะเอนไซม์ในกลุ่ม Trypsin-like ซึ่งอาจไม่เป็นผลดีในกระบวนการหมักในระยะยาว เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์จากปลาจะตกก็อาจมีบทบาทสำคัญในระหว่างกระบวนการหมัก การลดลงของกิจกรรมโปรตีนอาจส่งผลให้การย่อยสลายโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักเกิดช้ากว่าตัวอย่างที่บ่มที่อุณหภูมิต่ำ เสถียรภาพต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ Trypsin-like ของปลากะตักลดลงที่ 55-60 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม กิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin-like จะถูกกระตุ้นที่ 50-60 องศาเซลเซียส และ pH 8.5 (Siringan et al., 2007) ในขณะที่ Heu et al. (1995) รายงานว่าเอนไซม์ Trypsin ที่ทำบริสุทธิ์จากเครื่องในปลาแอนโชวีบ่มที่ 45 และ 55 องศาเซลเซียส มีเสถียรภาพลดลง 20% และ 60% ตามลำดับ และสูญเสียกิจกรรมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส Choi et al. (2004) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin ของเนื้อปลากะตักมีกิจกรรมสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส และ pH 8.0 Siringan et al. (2006b) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin-like มีความคงทนที่สถานะเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูง (25-30%) จนกระทั่งการหมัก 12 เดือน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และกิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin-like จะลดลงในเดือนแรกของการหมัก (Orejana and Liston, 1982) Ishida et al. (1995) รายงานว่าโปรตีนในกลุ่ม Neutral serine ที่พบในเนื้อปลาแอนโชวี (*Engraulis japonica*) แสดงกิจกรรมสูงสุดที่ pH 7.5 ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์นี้จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์มากกว่า 10% นอกจากนี้กิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin ที่ทำบริสุทธิ์จากเนื้อปลากะตักจะมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (Choi et al., 2004) ผลการวิจัยนี้บ่งชี้ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ Trypsin-like ในปลากะตักบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15% และระยะเวลาการบ่มที่ 4 ชั่วโมง



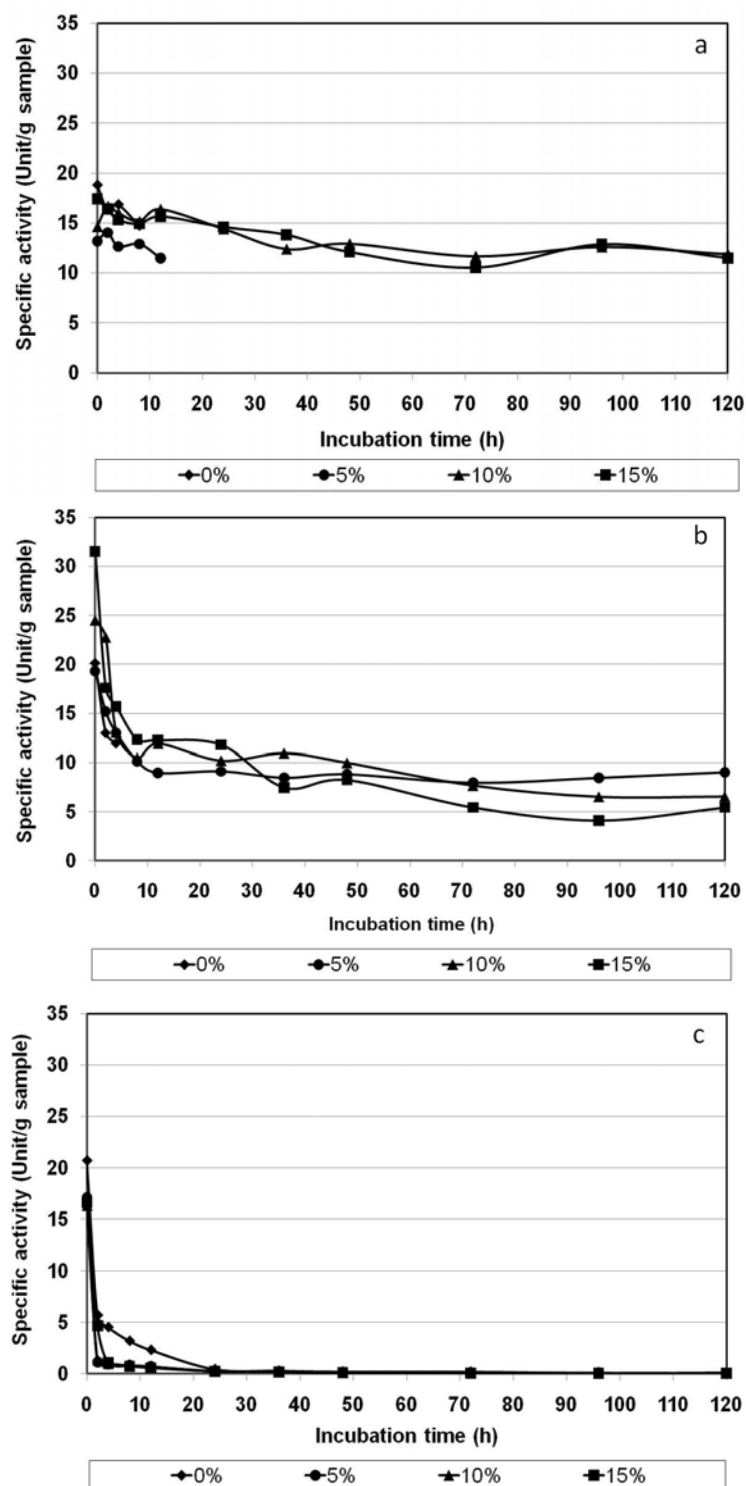
รูปที่ 4.2 กิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่ม Trypsin-like ในตัวอย่างปลากระตักที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อป้อนที่อุณหภูมิ 35 (a), 50 (b) และ 65 องศาเซลเซียส (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ

กิจกรรมของเอนไซม์ Chymotrypsin-like มีค่าน้อยกว่า Trypsin-like ประมาณ 100 เท่า (รูปที่ 4.3 a-c) ทั้งเอนไซม์ Chymotrypsin-like, Cathepsin L-like และ Leucine aminopeptidase มีค่ากิจกรรมลดลงเมื่อระยะเวลาบ่มนานขึ้นเช่นเดียวกับเอนไซม์ Trypsin-like (รูปที่ 4.3, 4.4, 4.5) ในระยะต้นของการบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ Chymotrypsin-like เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับเอนไซม์ Trypsin-like (รูปที่ 4.3 a-c, $p < 0.05$) แต่เมื่อบ่มเป็นเวลานาน (120 ชั่วโมง) เกลือไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ Chymotrypsin-like การบ่มที่อุณหภูมิสูง (50 และ 65 องศาเซลเซียส) ส่งผลให้กิจกรรมลดลงอย่างรวดเร็ว ที่ทุกความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ถึงแม้อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส มีผลช่วยเพิ่มการย่อยสลายโปรตีนในปลากระตัก แต่มีผลลดเสถียรภาพของเอนไซม์ Chymotrypsin-like เช่นเดียวกับเอนไซม์ Trypsin-like ซึ่งสอดคล้องกับ Heu et al. (1995) ซึ่งรายงานว่ากิจกรรมของ Chymotrypsin-like จากเครื่องในปลาแอนโชวีบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส มีเสถียรภาพลดลง 80% และถูกยับยั้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แต่ที่ 45 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 นาที ไม่มีผลต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ Chymotrypsin-like นอกจากนี้ Siringan et al. (2006b) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Chymotrypsin-like ของปลากระตักมีความคงทนที่สภาวะเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูง (25-30%) จนกระทั่งการหมัก 12 เดือน จากผลการศึกษาพบว่ากิจกรรมของโปรตีนเอสจาก Crude extract มีความไวต่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์มากกว่ากิจกรรมการย่อยสลายตัวเอง เอนไซม์ย่อยสลายกล้ามเนื้อ โปรตีนและเซลล์จากผิวหนังใน (Cell matrix) ซึ่งปัจจัยแวดล้อมภายนอกมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของเอนไซม์น้อยกว่าในสภาวะที่เป็นเอนไซม์อิสระ ผลการวิจัยนี้บ่งชี้ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของ Chymotrypsin-like ในปลากระตักบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15% และระยะเวลาการบ่มที่ 4 ชั่วโมง

กิจกรรมของเอนไซม์ Cathepsin L-like มีค่าน้อยกว่าเอนไซม์ในกลุ่ม Trypsin-like ประมาณ 200 เท่า และน้อยกว่าเอนไซม์ Chymotrypsin-like ประมาณ 2 เท่า (รูปที่ 4.4 a-c) ที่ 35 และ 50 องศาเซลเซียส เกลือไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ Cathepsin L-like เมื่อระยะเวลาการบ่มสั้น (4 ชั่วโมง) อย่างไรก็ตาม เมื่อบ่มเป็นเวลานาน (120 ชั่วโมง) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งสอดคล้องกับ Choi et al. (2004) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Cathepsin L-like ของเครื่องในและเนื้อปลากระตักลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น ซึ่งมีกิจกรรมสูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส และ pH 6.0



รูปที่ 4.3 กิจกรรมของเอนไซม์ Chymotrypsin-like ในตัวอย่างปลากระดักที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อต้มที่อุณหภูมิ 35 (a), 50 (b) และ 65 องศาเซลเซียส (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ



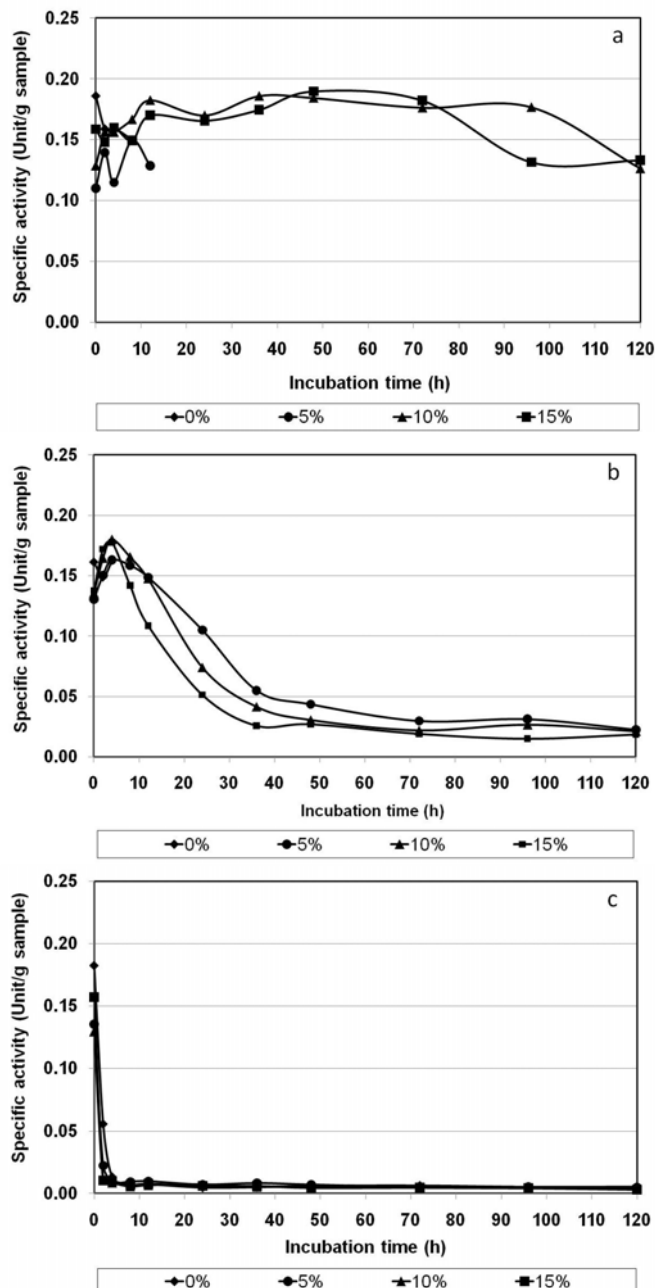
รูปที่ 4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ Cathepsin L-like ในตัวอย่างปลากะตักที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อป้อนที่อุณหภูมิ 35 (a), 50 (b) และ 65 องศาเซลเซียส (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ

นอกจากนี้ตัวอย่างบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส กิจกรรมลดลงอย่างรวดเร็วที่เวลาการบ่ม 2 ชั่วโมงแรก และมีเสถียรภาพต่ำที่อุณหภูมิสูง (65 องศาเซลเซียส) ซึ่งสอดคล้องกับ Heu et al. (1997) ที่รายงานว่า เอนไซม์ Cathepsin L-like บริสุทธิ์จากเนื้อปลาแอนโชวีมีกิจกรรมที่เหมาะสมที่ 50 องศาเซลเซียส Siringan et al. (2006b) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Cathepsin L-like จะลดลงเมื่อเวลาการบ่มยาวนานขึ้น ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ Chymotrypsin-like มีเสถียรภาพจนกระทั่งเดือนที่ 12 ซึ่งเอนไซม์ Cathepsin L เป็นไลโซโซมอลโปรตีนเอส (Lysosomal proteinase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยกลูตามีนของปลาชนิดต่างๆ เช่น Pacific whiting, Mackerel และ ปลาแอนโชวี (An et al., 1994; Aoki and Ueno, 1997; Heu et al., 1997) Tungkawachara et al. (2003) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Cathepsin L-like จะสูงสุดในน้ำปลา Pacific whiting ในช่วงการหมักของเดือนที่ 1 แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ Cathepsin L-like เป็นเอนไซม์ที่ไม่โคคเค่นในปลากะตัก

Aminopeptidases เป็นเอนไซม์ที่มีส่วนสำคัญในการช่วยทำให้เกิดกรดอะมิโนอิสระในน้ำปลา ผลการศึกษาพบว่า เกลือโซเดียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาสั้น (รูปที่ 4.5a, $p > 0.05$) ในขณะที่การบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส กิจกรรมมีค่าสูงสุดที่เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10-15% (รูปที่ 4.5b, $p < 0.05$) ซึ่งแสดงว่าเกลือมีผลกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ การบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส มีผลลดกิจกรรมของเอนไซม์ Leucine aminopeptidase อย่างรวดเร็ว เช่นเดียวกับเอนไซม์ Trypsin-like Chymotrypsin-like และ Cathepsin L-like เอนไซม์ Leucine aminopeptidase มีกิจกรรมสูงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เมื่อเทียบกับที่ 50 และ 60 องศาเซลเซียส Liu et al. (2008) รายงานว่าเอนไซม์ Leucine aminopeptidase จากเนื้อปลาไน (*Cyprinus carpio*) มีกิจกรรมที่เหมาะสมที่ 35 องศาเซลเซียส และ pH 7.0 ในการศึกษาแม้ว่าการบ่มที่อุณหภูมิสูงจะมีผลเร่งการย่อยสลายตัวเอง (รูปที่ 4.1b-c) เนื่องจากการกระตุ้นกิจกรรมของโปรตีนเอสในตัวปลา แต่มีผลลดเสถียรภาพของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Leucine aminopeptidase มีค่าน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดข้างต้น (รูปที่ 4.2-4.5) Siringan et al. (2006b) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Leucine aminopeptidase สูงสุดที่การหมักเดือนที่ 1 และลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นที่สภาวะเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูง (25-30%)

จากผลทดลองนี้จะเห็นได้ว่าปริมาณ โอลิโกเปปไทด์จากการย่อยสลายตัวเองและเสถียรภาพของโปรตีนเอสในตัวปลาเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการนำไปใช้ เนื่องจากโปรตีนเอสภายในตัวปลาทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง ซึ่งจากรายงานของ Siringan et al. (2006b) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 60 องศาเซลเซียส แต่การเพิ่มอุณหภูมิการบ่มเพื่อเร่งกิจกรรมของเอนไซม์กลับมีผลลดเสถียรภาพเอนไซม์ลง ในขณะที่เดียวกันการบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิต่ำ (35 องศาเซลเซียส) มีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการเนา

ซึ่งการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียได้ ดังนั้นสถานะที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนของปลากระตัก คือการบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง



รูปที่ 4.5 กิจกรรมของเอนไซม์ Lucine aminopeptidase ในตัวอย่างปลากระตักที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 (a), 50 (b) และ 65 องศาเซลเซียส (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ

4.2 ผลการศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติก

4.2.1 การระบุชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือก

ก. ลักษณะทางสัณฐานและสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติก

แบคทีเรียกรดแล็กติกที่แยกและคัดเลือกจากตัวอย่างจากบ่อหมักน้ำปลาเดือนที่ 1 และ 5 จำนวน 2 ไอโซเลท มีลักษณะสัณฐานของเซลล์ ปัจจัยทางเคมี/กายภาพที่มีผลต่อการเจริญ และสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น ดังตารางที่ 3.1 ไอโซเลททั้งหมดมีรูปร่างเซลล์กลม ดิคลีแกรมบวก มีการจัดเรียงตัวทั้งเป็นคู่ (Pairs) และแบบสี่เซลล์ (Tetrads) (รูปที่ 4.6) ขนาดของเซลล์ 0.59-0.88 ไมครอน (ตารางที่ 3.1) ทั้ง 2 ไอโซเลทให้ผลการทดสอบออกซิเดส (Oxidase) และคะตาเลส (Catalase) เป็นลบ ไอโซเลท MS33 สามารถย่อยเคซีน นอกจากนี้ทั้ง 2 ไม่แสดงกิจกรรมอะไมเลส (Amylase) มีเพียงไอโซเลท MS33 ที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Lipase) เท่านั้น

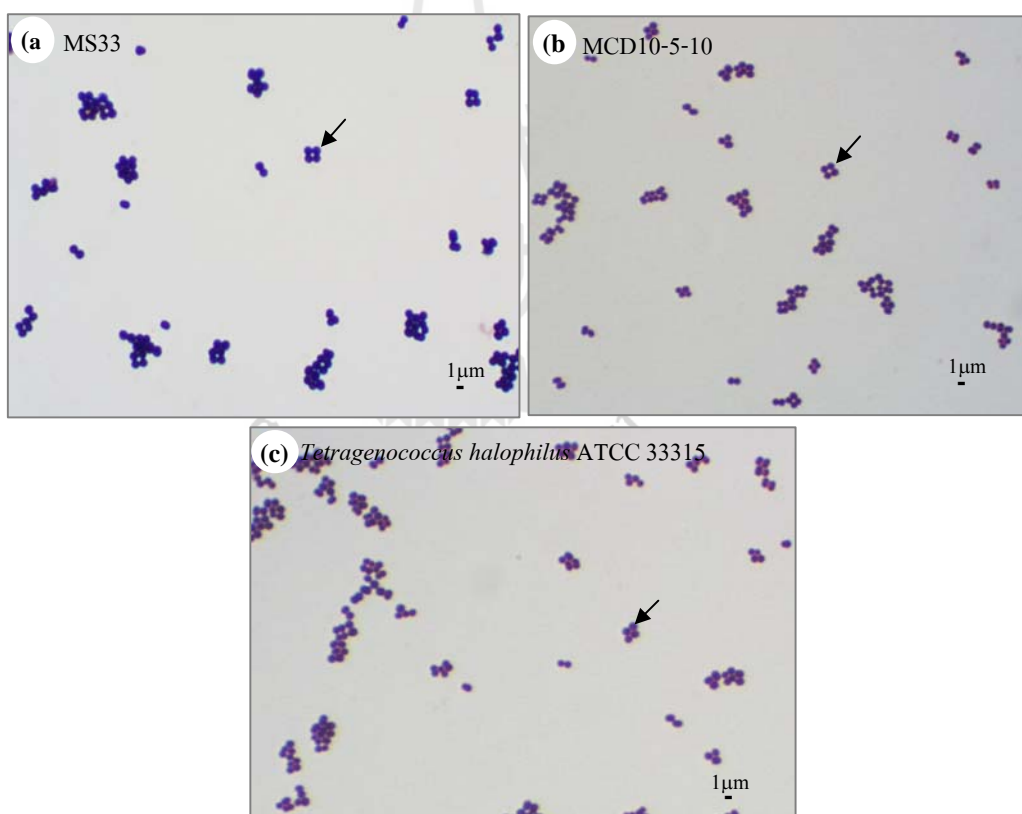
แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0-25% และ pH 4.5-9.0 ไอโซเลท MS33 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส ส่วนไอโซเลท MCD10-5-10 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-45 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.1) สำหรับทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถผลิตกรดจาก D-Mannitol, D-Sorbitol, D-Cellobiose, D-Galactose, D-Glucose, D-Maltose, D-Mannose และ D-Ribose แต่ไม่สามารถสร้างกรดจาก L-Arabinose, D-Arabinose, D-Lactose, D-Raffinose, L-Rhamnose, D-Melibiose และ D-Melezitose ได้ และยังมีความหลากหลายในการใช้น้ำตาล Glycerol และ D-Saccharose (ตารางที่ 4.1)

จากสัณฐานของเซลล์ การจัดเรียงตัวของเซลล์ และความสามารถในการเจริญที่อาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 18% แบคทีเรียกรดแล็กติกที่เลือกมาศึกษามีความเหมือนกับ *T. halophilus* (ตารางที่ 4.1) ดังนั้นลักษณะสัณฐานของเซลล์ ปัจจัยทางเคมี/กายภาพที่มีผลต่อการเจริญ และสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เลือกมานี้จะถูกนำมาเปรียบเทียบกับ *T. halophilus* ATCC 33315

ข. การวิเคราะห์สารพันธุกรรมของแบคทีเรียกรดแล็กติก

จากการวิเคราะห์สารพันธุกรรม 16S rRNA gene ของแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท ที่เพิ่มจำนวน gene ด้วย Primer fD1/ rP2 และได้ผลผลิต DNA fragment ขนาดประมาณ 1,500 bp (รูปที่ 4.7) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน 16S rRNA gene พบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติก 2 ไอโซเลท มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *T. halophilus* ATCC 33315 99% และอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *T. halophilus* ตาม Phylogenetic tree ที่สร้างด้วยวิธี Maximum Parsimony (รูปที่ 4.8)

T. halophilus สามารถพบได้ในกระบวนการหมักน้ำปลา (Thongsanit et al., 2002) ผลการวิจัยนี้จะพบ *T. halophilus* ตลอดช่วงการหมักตั้งแต่เดือนที่ 1-7 ซึ่งแบคทีเรียนี้จะพบได้บ่อยครั้งในกระบวนการหมักน้ำปลา Satomi et al. (1997) รายงานว่า *T. halophilus* ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ แต่ *T. muriaticus* เจริญได้ที่อาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นอย่างน้อย 0.5% ในผลวิจัยนี้แบคทีเรียกรดแล็กติก 2 ไอโซเลท ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งมีลักษณะที่แสดงออกคล้ายคลึงกับ *T. halophilus* ในขณะที่ *T. koreensis* เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกิมจิ ซึ่งสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-8% และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมคือ 2-5% (Lee et al., 2005) ดังนั้น *T. koreensis* จึงไม่พบในกระบวนการหมักน้ำปลาที่ความเข้มข้นของเกลือสูง ถึงแม้ว่า 16S rRNA gene ของ 2 ไอโซเลท มีความเหมือนกับ *T. halophilus* แต่ไอโซเลทที่ได้มีลักษณะบางประการแตกต่างจากพันธุ์อ้างอิง ดังตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.6 สัณฐานวิทยาของเซลล์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกจำนวน 2 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างจากบ่อหมักน้ำปลาเดือนที่ 1 (a) และ 5 (b) และ *T. halophilus* ATCC 33315 (c) ย้อมสีเชลล์ (ลูกศร) แบบแกรม ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ (Bar = 1 μm)

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานและผลทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดเกลือกติก 2 ไอโซเลท และ *T. halophilus* ATCC 33315

Characteristics	<i>T. halophilus</i> ^a ATCC 33315	<i>T. halophilus</i> ^b JCM 5888	MS33 ^c	MCD10-5-10 ^c
Cell shape/ arrangement	Cocci/Tetrads	Cocci/Tetrads	Cocci/Pairs, Tetrads	Cocci/Pairs, Tetrads
Cell size (µm)	0.5-1.0	0.5-1.0	0.68-0.88	0.59-0.78
Oxidase	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-
Proteinase	+	NA	+	-
Lipase	-	NA	+	-
Amylase	-	NA	-	-
Growth at 10 °C	NA	NA	+	+
15 °C	NA	NA	+	+
20 °C	NA	NA	+	+
25 °C	NA	NA	+	+
30 °C	NA	NA	+	+
35 °C	NA	NA	+	+
40 °C	-	+	+	+
45 °C	-	NA	-	+
Growth at pH 4.5-9.0	+	NA	+	+
Growth at 0% NaCl	+	NA	+	+
3%	+	NA	+	+
6.5%	+	NA	+	+
10%	+	NA	+	+
15%	+	NA	+	+
25%	+	NA	+	+
Optimum NaCl for growth (%)	5-10	NA	5-10	5-10

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

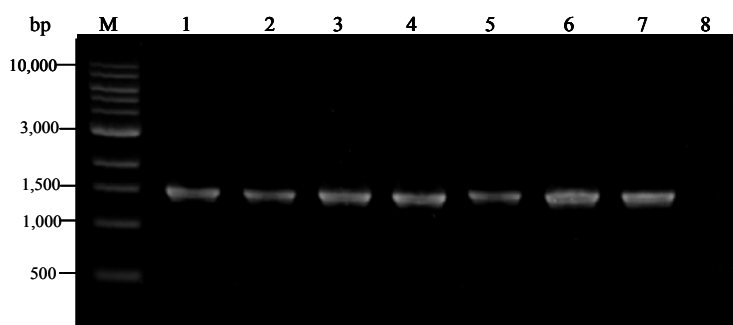
Characteristics	<i>T. halophilus</i> ^a	<i>T. halophilus</i> ^b	MS33 ^c	MCD10-5-10 ^c
	ATCC 33315	JCM 5888		
Gas from D-glucose	-	-	-	-
Acid from:				
L-Arabinose	+	+	-	-
D-Arabinose	-	NA	-	-
Glycerol	-	-	-	+
D-Mannitol	-	-	+	+
D-Sorbitol	-	-	+	+
D-Cellobiose	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+
D-Lactose	-	-	-	-
D-Maltose	+	+	+	+
D-Raffinose	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	NA	-	-
D-Mannose	+	NA	+	+
D-Melibiose	-	-	-	-
D-Saccharose	+	+	-	+
D-Melezitose	+	-	-	-
D-Ribose	+	+	+	+
Configuration of lactic acid	L	L	L	L

NA = Not available.

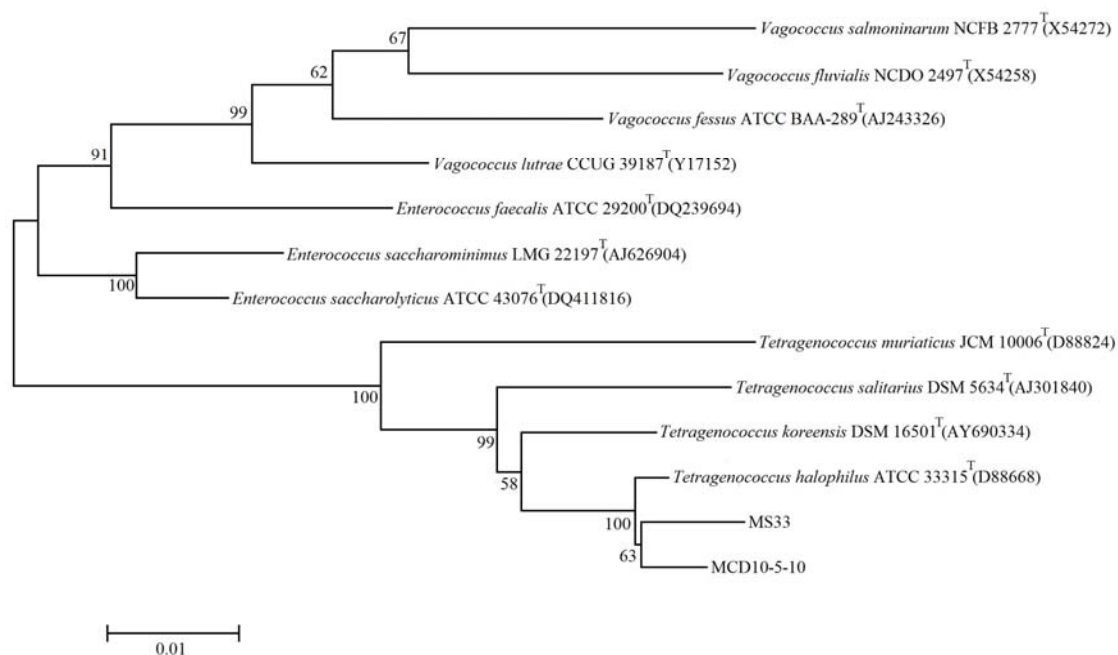
^aPhenotypic characteristics were tested in this study.

^bEnnahar and Cai (2005)

^c MS33 isolated from the 1st month fermentation; MCD10-5-10 isolated from the 5th month fermentation.



รูปที่ 4.7 ผลผลิต PCR ของ 16S rRNA gene ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย Primers fD1/rP2; Lane M คือ 1 kb DNA Ladder (Fermentas life sciences) เป็น Molecular weight markers; 2 คือ MS33; 5 คือ MCD10-5-10; 8 คือตัวอย่างควบคุมเชิงลบ



รูปที่ 4.8 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เป็นสายพันธุ์คัดเลือก 2 สายพันธุ์และสายพันธุ์จาก NCBI nucleotide sequence database (U.S.A.) ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene (Partial sequence) โดยใช้วิธี Maximum Parsimony ตัวเลขที่ Branch เป็นค่า Bootstrap จาก 1,000 replications

4.2.2 ความสามารถสร้างสารระเหยในอาหาร Fish broth

T. halophilus MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 ที่เจริญในอาหาร Fish broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% สามารถสร้างสารระเหยได้ 22 สารประกอบ ดังตารางที่ 4.2 โดยสามารถจัดกลุ่มสารประกอบได้ 4 กลุ่ม คือ แอลกอฮอล์ (Alcohol) อัลดีไฮด์ (Aldehyde) เอสเตอร์ (Ester) และ คีโตน (Ketone) สารประกอบแอลกอฮอล์ (Alcohol) ที่พบได้แก่ Isopropyl alcohol, 1-Propanol, 1-Butanol, 1-Penten-3-ol, 3-Methyl-1-butanol, 1-Pentanol และ 1-Hexanol ไอโซเลท MS33 สามารถสร้าง Isopropyl alcohol สูงกว่าตัวอย่างควบคุมหรือตัวอย่าง Fish broth ที่ไม่ได้เติมกลีเซอรอล (ตารางที่ 4.2, $p < 0.05$) ในขณะที่ไอโซเลท MCD10-5-10 สามารถสร้าง (E)-2-Penten-1-ol และ 1-Hexanol เท่านั้น โดยพบน้อยกว่าไอโซเลท MS33 ($p < 0.05$) จากผลการวิจัยนี้บ่งชี้ว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ชอบความเค็มสามารถสร้างสารประกอบแอลกอฮอล์ในอาหาร Fish broth ที่มีความเข้มข้นของเกลือในปริมาณสูง (25%) แบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถผลิตแอลกอฮอล์จากโปรตีน ไขมัน และ แลคโตส โดยผ่านวิถี Proteolysis Lipolysis และ Glycolysis ตามลำดับ (Marilley and Casey, 2004) Helinck et al. (2004) รายงานว่า *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. helveticus* และ *Streptococcus thermophilus* ผลิต 3-Methylbutanol ในปริมาณสูงจาก Phenylalanine, Valine และ Leucine กรดอะมิโนจะถูกเปลี่ยนเป็น α -Keto isocaproic acid โดยกระบวนการ Transamination (Smit et al., 2005) หลังจากนั้น α -Keto isocaproic acid จะถูกเปลี่ยนเป็น 2-Methylbutanal และ 3-Methylbutanal โดยผ่านกิจกรรม Decarboxylase และปฏิกิริยา Alcohol dehydrogenase ตามลำดับ (Smit et al., 2009)

นอกจากนี้สารประกอบอัลดีไฮด์หลักที่พบ ได้แก่ 2-Methylpropanal และ Benzaldehyde ซึ่งไอโซเลท MS33 สร้าง 2-Methylpropanal ในปริมาณที่มากกว่าตัวอย่างควบคุม ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่เติมไอโซเลท MS33 และ MCD10-5-10 มีปริมาณ 2-Methylbutanal และ 3-Methylbutanal น้อยกว่าตัวอย่างควบคุม (ตารางที่ 4.2) ซึ่งสารประกอบอัลดีไฮด์ที่มีโครงสร้างแบบกิ่งก้านเช่น 2-Methylpropanal, 2-Methylbutanal และ 3-Methylbutanal เป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสในหลากหลายผลิตภัณฑ์ อัลดีไฮด์เป็นสารสำคัญที่ให้กลิ่นรสทางอาหาร เช่น กลิ่นมอลต์ กลิ่นเนื้อ ซึ่งเป็นกลิ่นรสที่ดี (Marilley and Casey, 2004) กระบวนการสำคัญที่ทำให้เกิดสารประกอบ 3-Methylbutanal คือปฏิกิริยาที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (Non-enzymatic) ซึ่งประกอบด้วยการเหนี่ยวนำด้วยความร้อน ปฏิกิริยา Strecker degradation (Fukami et al., 2002; Sanceda et al., 1992) ส่วนสารประกอบ Benzaldehyde เกิดจากสารตั้งต้นกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างอะโรมาติก เช่น Phenylalanine ซึ่งช่วยให้เกิดรสขมในถั่วอัลมอนต์ (Curioni and Bosset, 2002) นอกจากนี้ Smit et al. (2009) รายงานว่า 2-Methylpropanal, 2-Methylbutanal และ 3-Methylbutanal ได้จากกระบวนการ Catabolism ของกรดอะมิโน โดยเริ่มต้นจากกระบวนการ Transami-

nation ของ Leucine, Valine และ Isoleucine ตามด้วยการเกิดปฏิกิริยา Decarboxylation ของอัลดีไฮด์ นอกจากนี้สารประกอบ Benzaldehyde ยังสามารถเกิดปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ ปฏิกิริยาออกซิเดชันของ α -Keto isocaproic acid จะถูกกระตุ้นโดย Mn^{2+} ได้สารประกอบ 2-Methylpropanal ซึ่งปฏิกิริยานี้สามารถทำให้เกิดน้อยลงโดยควบคุมความเข้มข้นของ Mn^{2+} และออกซิเจน (Smit and Engels, 2004)

ตัวอย่าง Fish broth ที่เติมกลูต้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 มีปริมาณ Ethyl acetate น้อยกว่าตัวอย่างควบคุม (ตารางที่ 4.2) สารประกอบอัลดีไฮด์จะถูกรีดิวซ์เป็นแอลกอฮอล์ และถูกออกซิไดซ์เป็นกรดคาร์บอกซิลิก (Carboxylic acid) ต่อไป ซึ่งสารประกอบสองกลุ่มนี้เป็นสารตั้งต้นของสารประกอบเอสเทอร์ (Marilley and Casey, 2004) ปริมาณ Acetone, 2-Butanone, 2,3-Butanedione และ Cyclohexanone ในตัวอย่างที่เติมแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 2 สายพันธุ์ มีปริมาณที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4.2) ไอโซเลท MS33 มีแนวโน้มให้กลิ่นเนื้อกับผลิตภัณฑ์หมักที่มีปริมาณเกลือสูง นอกจากนี้สารประกอบที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ เช่น Dimethyl sulfide และ Dimethyl disulfide จะทำให้เกิดกลิ่นรสไม่พึงประสงค์ในน้ำปลา (Fukami et al., 2004) ซึ่งตัวอย่างที่เติม MS33 และ MCD10-5-10 ไม่สร้างสารประกอบซัลเฟอร์ แบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 2 ไอโซเลทมีแนวโน้มที่จะไม่ทำให้เกิดกลิ่นรสไม่พึงประสงค์ในผลิตภัณฑ์หมักน้ำปลา จากผลการทดลองนี้แบคทีเรียกรดแล็กติก 2 ไอโซเลทที่เลี้ยงในอาหาร Fish broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% โดยสร้างสารระเหยที่แตกต่างกัน

4.2.3 การใช้แบคทีเรียกรดแล็กติกในการหมักน้ำปลา

ตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกลูต้าเชื้อแบคทีเรียมีปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนเพิ่มขึ้นจากวันเริ่มต้น ($p < 0.05$, ตารางที่ 4.3) ตัวอย่างที่เติมกลูต้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 มีปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนเพิ่มเป็น 704-740 มิลลิโมลาร์ ในเดือนที่ 6 (ตารางที่ 4.3) และเพิ่มขึ้นมากกว่าตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้เติมกลูต้าเชื้อ ($p < 0.05$) ผลวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเติมแบคทีเรียกรดแล็กติกทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนปลามากขึ้น การเพิ่มขึ้นของแอลฟาอะมิโนอาจมีผลต่อการสร้างสารระเหยที่ให้กลิ่นรสในน้ำปลาได้อีกด้วย เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของแอลฟาอะมิโนแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของเพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งแบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสได้ (Law and Haandrikman, 1995; Magboul and McSweeney, 1999) ถึงแม้ว่าผลจากการศึกษาความสามารถในการย่อยโปรตีนโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม Skim milk (Skim milk agar) ของไอโซเลท MCD10-5-10 จะให้ผลเป็นลบ แต่เมื่อใช้ในกระบวนการหมักพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอลฟาอะมิโนเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ซึ่งบ่งชี้ว่าในระบบการหมักน้ำปลามีผลต่อการเหนี่ยวนำการย่อยสลายโปรตีนของ *T. halophilus* MCD10-5-10 ดังนั้น *T.*

halophilus MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 น่าจะเป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาเกลือเพื่อใช้ในกระบวนการหมักน้ำปลาต่อไป

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารระเหยสัมพันธ์ในตัวอย่าง Fish broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% และเติมแบคทีเรียกรดแล็กติก บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน

RI*	Compounds	Relative peak area**		
		Control	<i>T. halophilus</i> MCD10-5-10	<i>T. halophilus</i> MS33
Alcohols				
1011	Isopropyl alcohol	0.063	ND	0.501
1041	2-Butanol	ND	ND	0.022
1049	1-Propanol	0.026	ND	0.063
1110	2-Methyl-1-propanol	ND	ND	0.024
1185	1-Butanol	ND	ND	ND
1193	1-Penten-3-ol	ND	ND	ND
1205	3-Methyl-1-butanol	ND	ND	ND
1255	1-Pentanol	ND	ND	0.033
1327	(E)-2-Penten-1-ol	0.064	0.004	0.018
1336	(Z)-2-Penten-1-ol	0.018	ND	ND
1360	1-Hexanol	ND	0.014	0.024
Aldehydes				
784	Propanal	0.030	0.001	0.004
800	2-Methylpropanal	ND	0.126	0.372
909	2-Methylbutanal	0.107	0.028	0.038
911	3-Methylbutanal	0.091	ND	0.034
1097	Hexanal	0.024	ND	ND
1459	Benzaldehyde	0.004	0.045	0.039
Ester				
863	Ethyl acetate	0.101	0.005	0.045
Ketones				
809	Acetone	0.202	0.054	0.391
888	2-Butanone	ND	ND	0.020
1028	2,3-Butanedione	ND	ND	0.011
1315	Cyclohexanone	ND	ND	0.086

Note: Bacterial cell count of all isolates were 10^7 - 10^8 cell/ml; ND= not detected.

*Retention indices calculated for DB-WAX column using n-alkanes as standards.

**The values represent the ratio of the peak area of any compound to that of internal standard (cyclohexanol).

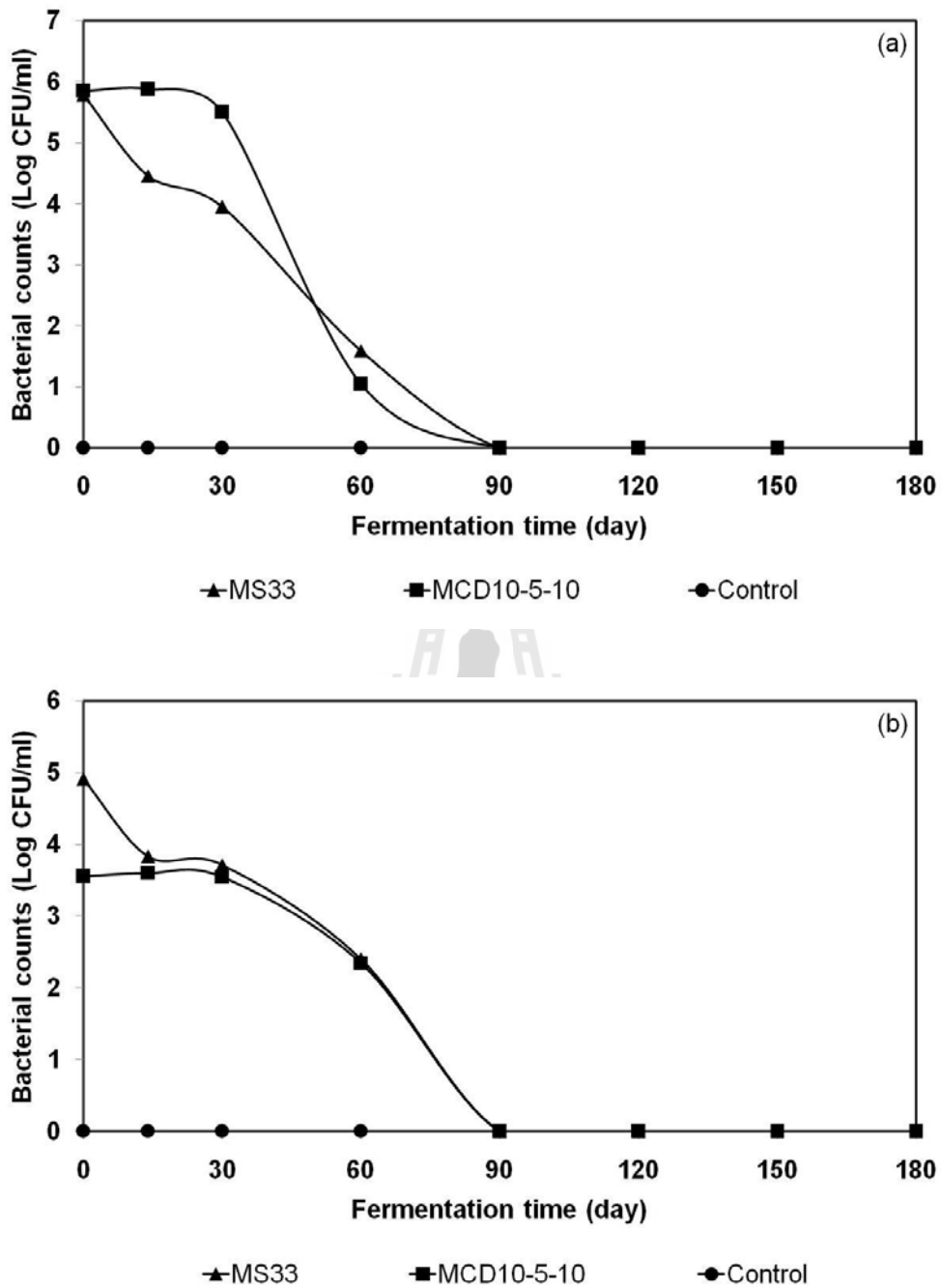
ตารางที่ 4.3 ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนของตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้ำเชื้อ บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน

Fermentation time			
(Day)	Control	<i>T. halophilus</i> MS33	<i>T. halophilus</i> MCD10-5-10
0	436.49 ± 24.11	445.87 ± 38.58	458.65 ± 42.20
14	584.08 ± 28.09 ^b	636.12 ± 32.76 ^a	691.74 ± 51.14 ^a
30	644.89 ± 40.45	684.14 ± 23.51	676.95 ± 27.80
60	611.60 ± 85.11 ^b	679.52 ± 69.84 ^a	711.51 ± 27.00 ^a
90	676.13 ± 15.55 ^b	726.92 ± 40.20 ^a	744.95 ± 38.79 ^a
120	658.64 ± 1.57 ^c	704.50 ± 8.52 ^b	740.35 ± 79.42 ^a
150	691.46 ± 12.75 ^c	724.17 ± 7.94 ^b	786.15 ± 45.81 ^a
180	707.46 ± 3.58 ^b	783.96 ± 19.18 ^a	779.65 ± 32.58 ^a

Letters indicate significant difference in the same row ($p < 0.05$).

การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียกรดแล็กติกระหว่างกระบวนการหมักโดยใช้อาหาร MRS agar ที่มีความเข้มข้นของเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 18% และแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5% พบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกในวันเริ่มต้นของการหมักมีจำนวน 10^5 CFU/มิลลิลิตร และลดลง 3-4 Log CFU/มิลลิลิตร ในเดือนที่ 2 และไม่พบการเจริญในเดือนที่ 3 (รูปที่ 4.9a) นอกจากนี้ไม่พบแบคทีเรียกรดแล็กติกในตัวอย่างควบคุม แสดงว่าแบคทีเรียที่ตรวจนับได้ในตัวอย่างเป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เติมลงไป แม้ว่าแบคทีเรียที่เติมลงไปไม่สามารถเจริญเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก แต่ก็มีผลทำให้ปริมาณแอลฟาอะมิโนเพิ่มขึ้นมากกว่าตัวอย่างควบคุม (ตัวอย่างที่ไม่มีการเติมกล้ำเชื้อ)

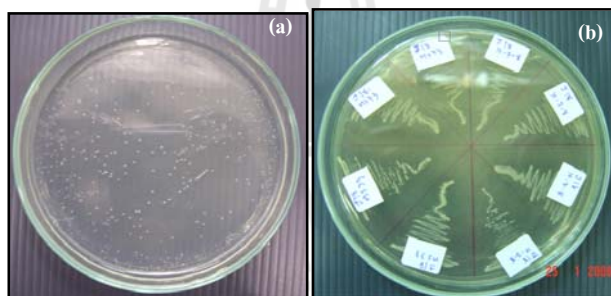
เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียในอาหาร JCM 168 ที่เติมเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 18% ไม่พบแบคทีเรียในตัวอย่างควบคุม (รูปที่ 4.9b) อาจเนื่องจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างปลาทะเลถูกทำลาย เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำให้แบคทีเรียที่ชอบเค็ม/ทนเค็มที่มีในระบบถูกทำลายด้วยความร้อน ส่วนตัวอย่างที่เติมแบคทีเรียกรดแล็กติกมีจำนวนแบคทีเรียใกล้เคียงกับจำนวนแบคทีเรียที่เติมลงไป และลดลง 3-4 Log CFU/มิลลิลิตร ในเดือนที่ 2 และไม่สามารถตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ได้ในเดือนที่ 3 (รูปที่ 4.9b) สันเกตได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ซึ่งตรวจนับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ JCM 168 มีลักษณะคล้ายกับผลที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (รูปที่ 4.9a,b)



รูปที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียที่ตรวจนับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (a) และ JCM 168 (b) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 18% ระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา

มีความเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียที่ตรวจนับได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ JCM 168 จะเป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เติมลงไปซึ่งมีความสามารถในการทนออกซิเจนได้เล็กน้อย (Aerotolerance) ทั้งนี้ได้สุ่มเก็บ

โคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดและทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อยืนยันผลว่าเป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เติมลงไปหรือไม่ โดยย้อมสีเชลล์แบบแกรมเพื่อตรวจสอบลักษณะพื้นฐาน พบว่ามีรูปร่างเชลล์กลม การเรียงตัวเป็นคู่และสี่เชลล์ เมื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์อะลาเลส ได้ผลการทดสอบเป็นลบ ตรงกับคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแล็กติก และได้้นำแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหาร JCM 168 (รูปที่ 4.10a) มาทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 18% ในสภาพไร้ออกซิเจน (รูปที่ 4.10b) พบว่าสามารถเจริญได้ดี ดังนั้นแบคทีเรียที่พบเป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เติมลงไป ซึ่งสามารถเจริญได้ทั้งในอาหาร MRS และ JCM 168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 18% ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Leisner et al. (2001) ที่รายงานว่าแบคทีเรียที่นับได้บน Plat count agar (PCA) ในกระบวนการหมักเครื่องปรุงรส (Tempoyak) คือแบคทีเรียกรดแล็กติก ซึ่งโคโลนีมีขนาดเล็ก สีเทาหรือขาว ไม่สร้างเอนไซม์อะลาเลสและสามารถเจริญได้ในสภาพไร้ออกซิเจน



รูปที่ 4.10 แบคทีเรียที่ตรวจนับได้จากกระบวนการหมักปลาในห้องปฏิบัติการ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ JCM 168 (a) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 18% และนำมาทดสอบการเจริญบนอาหาร MRS agar ที่เติมเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 18% (b)

ไบโอจีนิกเอมีนที่ตรวจพบในน้ำปลามี 4 ชนิดคือ ทริปตามีน (Tryptamine) พิวทริสซีน (Putrescine) คาดาเวอริน (Cadaverine) และ ฮีสตามีน (Histamine) โดยพบทริปตามีนในปริมาณสูงกว่าไบโอจีนิกเอมีนชนิดอื่น คือ 12.90-16.03 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร (ตารางที่ 4.4) และเนื่องจากปลาที่ใช้ในการทดลองเป็นปลาที่มีคุณภาพความสดสูง จึงตรวจไม่พบพิวทริสซีนหรือพบน้อยเพราะพิวทริสซีนเป็นไบโอจีนิกเอมีนที่พบในปลาที่ไม่สด (Yongsawatdigul et al., 2004) จากการทดสอบการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ mGYP ที่รายงานก่อนหน้านี้ (Udomsil, 2008) พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลทที่ศึกษาสามารถสร้างไบโอจีนิกเอมีนได้ ซึ่งอาจเป็นเพราะในอาหารเลี้ยงเชื้อมีสารตั้งต้นกรดอะมิ-

โนของสารไบโอจีนิกเอมีน แต่เมื่อทดสอบในระบบการหมักปลาพบว่า ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนของน้ำปลาในเดือนที่ 6 ไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุม ($p>0.05$) บ่งชี้ว่าการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 ไม่ได้ทำให้ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนเพิ่มขึ้น ซึ่งไบโอจีนิกเอมีนสามารถผลิตได้โดยผ่านกระบวนการ Decarboxylation ของกรดอะมิโน ประเทศแคนาดาได้กำหนดค่าฮีสตามีนให้มีได้สูงสุดไม่เกิน 20 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร (CFIA, 2003) ตัวอย่างที่เติมแบคทีเรียไอโซเลท MS33 และ MCD10-5-10 มีปริมาณฮีสตามีนน้อยกว่าตัวอย่างควบคุม ($p<0.05$) (ตารางที่ 3.4) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทไม่มีผลต่อการสร้างฮีสตามีนในผลิตภัณฑ์น้ำปลา

ตารางที่ 4.4 ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในน้ำปลาที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 6 เดือน

Fish sauce sample	Biogenic amine content (mg/100ml)			
	Tryptamine	Putrescine	Cadaverine	Histamine
Control	16.03 ± 1.06 ^a	ND	2.40 ± 0.50 ^b	10.24 ± 3.12 ^a
<i>T. halophilus</i> MS33	14.39 ± 1.15 ^{ab}	ND	ND	6.06 ± 0.01 ^{ab}
<i>T. halophilus</i> MCD10-5-10	12.90 ± 1.64 ^b	2.33 ± 1.76	6.12 ± 2.70 ^a	4.50 ± 1.94 ^b

Letters indicate significant difference in the same column ($p<0.05$).

ND = not detected.

ไนโตรเจนรวมทั้งหมดรวมถึงปริมาณโปรตีนไนโตรเจนและสารประกอบที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น แอมโมเนีย กรดอะมิโนอิสระ นิวคลีโอไทด์ ยูเรีย และไตรเมทิลามีน (Trimethylamine, TMA) (Shahidi et al., 1994) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้ช่วยทำให้เกิดความจำเพาะของกลิ่นรสในน้ำปลา (Dougan and Howard, 1975) Dougan and Howard (1975) รายงานว่า 80% ของไนโตรเจนรวมทั้งหมดของน้ำปลาจะอยู่ในรูปของกรดอะมิโน นอกจากนี้ปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดของน้ำปลาจะขึ้นกับปลาแต่ละชนิดและองค์ประกอบทางเคมีของปลา (Tungkawachara et al., 2003) ซึ่งปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพของน้ำปลา (Park et al., 2001) เกณฑ์มาตรฐานของน้ำปลาคูณภาพชั้นที่ 1 ของประเทศไทยจะต้องมีค่ามากกว่า 2.0% จากผลการวิจัยพบว่าปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมด (Total nitrogen) ของตัวอย่างที่เติมแบคทีเรียกรดแล็กติก *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 มีค่ามากกว่า 2.0% (ตารางที่ 4.5) ซึ่งเป็นเกณฑ์มาตรฐานของน้ำปลาคูณภาพชั้นที่ 1

เมื่อพิจารณาปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนของตัวอย่างที่ใช้กล้าเชื้อและตัวอย่างควบคุมพบว่ามีค่าประมาณ 0.1% ($p > 0.05$, ตารางที่ 4.5) การเพิ่มขึ้นของปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนเกิดจากการย่อยของสายพอลิเพปไทด์ (Tungkawachara et al., 2003) ซึ่งปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนเป็นตัวบ่งชี้ถึงสารประกอบไนโตรเจนเริ่มต้นที่ช่วยให้เกิดกลิ่นแอมโมเนียในน้ำปลา (Dougan and Howard, 1975; Beddows et al., 1976; McIver et al., 1982) อย่างไรก็ตาม การยอมรับของผู้บริโภคต่อกลิ่นที่เกิดจากแอมโมเนียยังไม่มีรายงานการศึกษา

ดัชนีสีน้ำตาลในทุกตัวอย่างไม่ต่างกัน ($p > 0.05$, ตารางที่ 4.5) ปฏิกิริยา Maillard ทำให้เกิดสารสีน้ำตาล (Melanoidin) ในน้ำปลาระหว่างกระบวนการหมัก (Lopetcharat et al., 2001) ปริมาณเกลือของตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อคือ 26 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของมาตรฐานอุตสาหกรรม (ตารางที่ 4.5) การเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 ไม่มีผลต่อปริมาณเกลือในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ pH ของตัวอย่างน้ำปลาคือ 5.43-5.46 (ตารางที่ 4.5) ซึ่งน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 มีค่า pH ต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม ($p < 0.05$, ตารางที่ 4.5) Michihata et al. (2000) รายงานว่ากรดอินทรีย์ เช่น กรดแล็กติก และกรดอะซิติกทำให้ค่า pH ของน้ำปลาลดลงระหว่างกระบวนการหมัก ถึงแม้ว่าจะมีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก แต่ไม่ได้ทำให้เกิดการลดลงของ pH อย่างมาก เนื่องจากในกระบวนการหมักน้ำปลาไม่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนประกอบ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ใช้ผลิตกรดแล็กติก

ตารางที่ 4.5 คุณสมบัติทางเคมีของน้ำปลาที่หมักโดยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 6 เดือน

Sample	Total nitrogen (%)	Ammonical Nitrogen (%)	Salt (%)	Browning index (Abs@440nm)	pH
Control	2.03 ± 0.08	0.11 ± 0.01	25.87 ± 0.41	0.441 ± 0.01	5.46 ± 0.00 ^a
<i>T. halophilus</i> MS33	2.10 ± 0.00	0.11 ± 0.01	26.38 ± 0.041	0.474 ± 0.01	5.43 ± 0.01 ^b
<i>T. halophilus</i> MCD10-5-10	2.05 ± 0.57	0.11 ± 0.00	26.20 ± 1.44	0.456 ± 0.00	5.43 ± 0.01 ^b

Letters indicate significant difference in the same column ($p < 0.05$).

ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในตัวอย่าง ซึ่งมีผลต่อรสชาติของผลิตภัณฑ์แสดงดังตารางที่ 4.6 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระรวมของตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* มีค่าสูงกว่าตัวอย่างที่หมักทางการค้าเป็นเวลา 12 เดือน ตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 2 ไอโซเลท มีปริมาณกรดอะมิโน

โพรลีน (Proline) และวาไลน์ (Valine) สูงกว่าตัวอย่างควบคุม (ไม่ได้เติมกล้าเชื้อ) และตัวอย่างทางการค้าที่หมักเป็นเวลา 12 เดือน กรดอะมิโน 2 ชนิดนี้จะเป็นผลผลิตจาก Protein metabolism ของแบคทีเรียกรดแล็กติก ตัวอย่างทางการค้ามีปริมาณกรดอะมิโนไลซีน (Lysine) และกลูตามิก (Glutamin) อีสาระมากที่สุด ส่วนตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 มีปริมาณกรดอะมิโนกลูตามิกอีสาระมากกว่าตัวอย่างควบคุม ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ให้รสชาติ Umami ในผลิตภัณฑ์ ดังนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไม่เพียงแต่เร่งกระบวนการหมักแต่ยังให้ผลผลิตเป็นกรดอะมิโนที่มีผลต่อรสชาติ Umami อีกด้วย กรดอะมิโนอีสาระอาร์จินีน (Arginine) ในตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมดมีค่าสูงกว่าในตัวอย่างทางการค้า กรดอะมิโนอาร์จินีนเป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของปลา ปลาที่มีคุณภาพความสดต่ำจะมีอาร์จินีนต่ำด้วย เนื่องจากอาร์จินีนจะถูกเอนไซม์ในจุลินทรีย์เปลี่ยนไปเป็น Ornithin และ Putrescine ในที่สุด ปลาที่ใช้ในการทดลองมีคุณภาพความสดสูงกว่าปลาที่ใช้ในโรงงาน ปริมาณอาร์จินีนอีสาระจึงมีค่าสูงกว่า

ตารางที่ 4.6 ปริมาณกรดอะมิโนอีสาระ (Free amino acid, มก./100 มล.) ในตัวอย่างน้ำปลาที่หมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 6 เดือน และหมักทางการค้าเป็นเวลา 12 เดือน

Amino acid	Control	<i>T. halophilus</i> MS33	<i>T. halophilus</i> MCD10-5-10	Commercial
Aspartic acid	550.47	592.82	592.94	590.15
Threonine	527.68	570.9	563.21	515.35
Serine	418.24	303.06	284.78	388.16
Glutamic acid	906.91	981.24	970.83	1035.50
Proline	846.64	988.08	924.43	526.80
Glycine	211.94	235.72	236.25	322.83
Alanine	362.95	714.37	705.56	698.39
Valine	701.49	756.22	744.78	649.79
Methionine	255.56	263.53	268.09	254.56
Isoleucine	405.63	433.66	416.06	376.38
Leucine	479.18	513.62	482.41	489.63
Tyrosine	89.23	96.1	86.32	81.59
Phenylalanine	398.72	427.57	417.67	354.42
Histidine	910.92	988.91	973.76	316.09
Lysine	361.78	385.26	386.13	971.35
Arginine	696.41	405.73	421.88	5.11
Total	8123.74	8656.79	8475.08	7576.10

เมื่อพิจารณาปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด (Total amino) จะพบว่าปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในตัวอย่างน้ำปลาที่เดิมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 มีค่าสูงกว่าตัวอย่างน้ำปลาที่หมักในห้องปฏิบัติการ แต่น้อยกว่าตัวอย่างทางการค้าที่หมักเป็นเวลา 12 เดือน (ตารางที่ 4.7) โดยปริมาณกรดอะมิโนอิสระมีค่าใกล้เคียงกับกรดอะมิโนทั้งหมด ซึ่งบ่งชี้ว่ากรดอะมิโนที่อยู่ในตัวอย่างที่เดิม *T. halophilus* MS33 อยู่ในรูปอิสระ ในขณะที่ตัวอย่างทางการค้าจะมีค่ากรดอะมิโนทั้งหมดสูงกว่ากรดอะมิโนอิสระ ซึ่งหมายถึงกรดอะมิโนที่อยู่ในน้ำปลาที่หมักทางการค้าจะดำรงอยู่ในรูปเพปไทด์ ซึ่งอาจไม่เป็นผลดีต่อเสถียรภาพของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากเพปไทด์มีแนวโน้มที่จะรวมตัวกันเป็นตะกอน ตัวอย่างที่เดิมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 มีปริมาณกรดอะมิโนโพรลีน (Proline) และไลซีน (Lysine) สูงกว่าตัวอย่างควบคุม

ตารางที่ 4.7 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด (Total amino acid, มก./100 มล.) ในตัวอย่างน้ำปลาที่หมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 6 เดือนและหมักทางการค้าเป็นเวลา 12 เดือน

Amino acid	Control	<i>T. halophilus</i> MS33	<i>T. halophilus</i> MCD10-5-10	Commercial
Aspartic acid	669.2	695.49	688.05	650.31
Threonine	443.05	447.28	445.62	529.48
Serine	389.92	353.65	316.32	471.46
Glutamic acid	926.77	1350.71	986.55	1244.64
Proline	570.06	729.74	575.88	510.56
Glycine	381.08	371.6	383.79	367.93
Alanine	487.07	486.01	493.93	494.35
Valine	443.92	489.23	448.6	644.88
Methionine	306.26	331.69	309.26	414.62
Isoleucine	423.46	449.31	422.94	535.57
Leucine	460.74	523.57	454.59	757.62
Tyrosine	97.06	169.44	91.3	418.08
Phenylalanine	430.05	572.8	460.13	815.78
Histidine	457.86	479.92	461.55	565.31
Lysine	607.13	752.16	738.23	778.21
Arginine	645.01	457.09	414.52	533.41
Total	7738.64	8659.68	7691.25	9732.21

นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างน้ำปลาทางการค้าที่หมักโดยวิธีแบบดั้งเดิมมีปริมาณกรดอะมิโนกลูตามิก (Glutamin) วาลีน (Valine) ลิวซีน (Leucine) ไทโรซีน (Tyrosine) และฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) สูงกว่าตัวอย่างอื่น (ตารางที่ 4.7) โดยกรดอะมิโนไทโรซีน และ ฟีนิลอะลานีน เป็นกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำและเป็นสาเหตุของการเกิดตะกอนเพปไทด์ในน้ำปลา จากการทดลองนี้พบว่าการใช้เกลือโซเดียมโดยเฉพาะในกลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถปรับปรุงคุณภาพของกรดอะมิโนในน้ำปลาได้

เมื่อวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นรสจากน้ำปลาที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติกในเดือนที่ 6 พบว่าสารระเหยที่วิเคราะห์ได้จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบของอัลดีไฮด์ คีโตน และแอลกอฮอล์ สารระเหยในกลุ่มอัลดีไฮด์ที่พบคือ 2-Methylpropanal, 2-Methylbutanal, 3-Methylbutanal, 3-(Methylthio)propanal และ Benzaldehyde (ตารางที่ 4.8) มีรายงานว่าสารประกอบ 2-Methylpropanal และ 2-Methylbutanal ให้กลิ่น “Meaty” ในน้ำปลา (Peralta et al., 1996; Fukami et al., 2002) ตัวอย่างที่เดิมกลิ่นเหมือนไอโซเลท มีปริมาณของสารประกอบ 2-Methylbutanal, 3-Methylbutanal และ Benzaldehyde ไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุม ($p > 0.05$) เมื่อพิจารณาถึงปริมาณแอลกอฮอล์ของตัวอย่างที่มีการเติมแบคทีเรียไอโซเลท MS33 พบว่ามีปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.3) ซึ่งน่าจะส่งผลถึงการเพิ่มขึ้นของสารประกอบที่ให้กลิ่นรส เนื่องจากแบคทีเรียกรดแล็กติกใช้เพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระในการผลิตสารประกอบที่ให้กลิ่นรส (Law and Haandrikman, 1995; Magboul and McSweeney, 1999) ส่วนสารระเหยในกลุ่มคีโตนที่พบได้แก่ 2-Butanone, 3-Methyl-2-butanone, 2,3-Butanedione และ Cyclohexanone ซึ่งให้กลิ่นเนยแข็ง (Cheesy) ในน้ำปลา (Peralta et al., 1996) ไม่ได้มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม และมีค่าน้อยกว่าตัวอย่างที่หมักทางการค้าเป็นเวลา 12 เดือน Shimoda et al. (1996) รายงานถึงสารประกอบ Volatile fatty acids ที่เกี่ยวข้องกับการให้กลิ่น “Cheesy” ที่พบในน้ำปลา ได้แก่ Acetic acid, Propanoic acid, 2-Methylpropanoic acid, Butanoic acid และ 3-Methylbutanoic acid โดย 2-Methylpropanoic acid เป็นสารหลักที่ให้กลิ่นดังกล่าว แต่จากการวิเคราะห์สารประกอบที่ให้กลิ่นรสของน้ำปลาที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติก ไม่พบสารประกอบในกลุ่ม Volatile fatty acids ส่วนสารประกอบแอลกอฮอล์ที่พบในตัวอย่างน้ำปลา ได้แก่ Ethanol, 1-Propanol, 2-Methyl-1-propanol, 1-Butanol, 1-Penten-3-ol, 3-Methyl-1-butanol และ 1-Pentanol แต่ยังไม่มีการรายงานถึงบทบาทของแอลกอฮอล์ต่อการให้กลิ่นรสของน้ำปลา จากการรับรู้ (Perception) ของชาวต่างประเทศหรือผู้ที่ไม่คุ้นเคยกับน้ำปลา จะให้ความเห็นว่าน้ำปลามีกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์ ซึ่งสารที่ให้กลิ่นดังกล่าว คือ Dimethyl disulfide ซึ่งให้กลิ่นอุจจาระ (Fecal note) ตัวอย่างน้ำปลาที่หมักจากโรงงานเป็นเวลา 12 เดือน มีสารดังกล่าวสูงกว่าตัวอย่างจากห้องปฏิบัติการ นอกจากน้ำปลาที่เติมแบคทีเรีย *T. halophilus* มีปริมาณ Dimethyl disulfide น้อยกว่าตัวอย่างควบคุม ($p < 0.05$, ตารางที่ 4.8) โดยไม่พบ

สารประกอบ Dimethyl disulfide ในตัวอย่างน้ำปลาที่เติมไอโซเลท MCD10-5-10 จึงเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกมีผลช่วยลดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำปลาเพื่อให้กลิ่นที่เป็นที่ยอมรับในผู้บริโภคทั้งชาวไทยและต่างประเทศมากขึ้น

ตารางที่ 4.8 ปริมาณสารระเหยสัมพันธ์กับสารมาตรฐานภายในของน้ำปลาหมักด้วยกล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 6 เดือน เทียบกับตัวอย่างทางการค้าที่หมักเป็นเวลา 12 เดือน

RI*	Compounds	Relative peak area**			
		Commercial	Control	<i>T. halophilus</i> MS33	<i>T. halophilus</i> MCD10-5-10
Alcohols					
1022	Ethanol	0.065 ^a	0.040 ^b	0.072 ^a	ND
1041	2-Butanol	0.063 ^a	0.001 ^b	0.001 ^b	0.001
1049	1-Propanol	1.094 ^a	0.011 ^b	0.006 ^b	ND
1110	2-Methyl-1-propanol	0.062 ^a	0.002 ^b	0.004 ^b	ND
1172	3-Pentanol	0.035 ^a	ND	ND	0.002 ^b
1188	2-Pentanol	0.005	ND	ND	ND
1185	1-Butanol	0.128 ^a	0.026 ^b	0.027 ^b	0.027 ^b
1193	1-Penten-3-ol	0.214 ^a	0.061 ^b	0.045 ^b	ND
1205	3-Methyl-1-butanol	0.024 ^a	0.001 ^c	0.010 ^b	ND
1255	1-Pentanol	0.014 ^a	0.007 ^b	0.004 ^b	0.003 ^b
1327	(<i>E</i>)-2-Penten-1-ol	0.010	0.004	ND	0.008
1336	(<i>Z</i>)-2-Penten-1-ol	0.027 ^a	0.003 ^b	0.005 ^b	0.009 ^b
1444	2-Ethyl-1-hexanol	0.001	0.003	0.002	0.003
Aldehydes					
784	Propanal	0.511	ND	ND	ND
830	2-Methylpropanal	0.017 ^c	ND	0.065 ^b	0.076 ^b
906	2-Methylbutanal	0.591 ^a	0.220 ^b	0.245 ^b	0.227 ^b
911	3-Methylbutanal	0.292 ^a	0.232 ^a	0.255 ^a	0.073 ^c
1104	2-Methyl-2-butenal	0.179	ND	ND	ND
1615	3-(Methylthio) propanal	0.051	0.015	0.019	0.016
1459	Benzaldehyde	0.025	0.014	0.023	0.028

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

RI*	Compounds	Relative peak area **			
		Commercial	Control	<i>T. halophilus</i> MS33	<i>T. halophilus</i> MCD10-5-10
Ketones					
888	2-Butanone	0.894 ^a	0.312 ^b	0.270 ^b	0.009 ^c
929	3-Methyl-2-butanone	0.075 ^a	0.020 ^b	0.008 ^c	ND
980	2-Pentanone	0.017	ND	ND	ND
1050	2,3-Butanedione	0.006	0.008	0.003	ND
1315	Cyclohexanone	0.117 ^a	0.046 ^b	0.043 ^b	0.046 ^b
Esters					
863	Ethyl acetate	0.146 ^a	0.006 ^b	ND	0.121 ^a
Sulfur-containing compounds					
818	Dimethyl sulfide	0.002	ND	ND	ND
1120	Dimethyl disulfide	0.075 ^a	0.038 ^b	0.013 ^c	ND
Nitrogen-containing compounds					
1176	Methylpyrazine	0.009	0.005	0.003	0.005
1377	2,6-Dimethyl pyrazine	0.008	0.001	0.002	ND

ND = Not detected.

Different superscripts indicate significant differences in the same row ($p < 0.05$).

* Retention indices calculated for DB-WAX column using n-alkanes as standards.

** The values represent the ratio of the peak area of any compound to that of internal standard (cyclohexanol).

เมื่อทดสอบความชอบ โดยผู้ทดสอบจากสถานประกอบการ พบว่าผู้ทดสอบชอบสีของน้ำปลาที่เดิมกล้าเชื้อเทียบเท่ากับน้ำปลาทางการค้าที่หมัก 12 เดือน และตัวอย่างควบคุม ($p > 0.05$, ตารางที่ 4.9) แม้ว่ากลิ่นของตัวอย่างที่เดิมกล้าเชื้อแบคทีเรียจะมีกลิ่นที่อ่อนกว่า แต่คะแนนความชอบกลิ่นรสของตัวอย่างน้ำปลาที่เดิมกล้าเชื้อไม่แตกต่างจากน้ำปลาทางการค้า และตัวอย่างควบคุม ($p > 0.05$) เนื่องจากผู้ทดสอบมีความคุ้นเคยกับกลิ่นน้ำปลาแบบดั้งเดิม (ทางการค้า) ผู้ทดสอบบางคนให้ความเห็นว่าน้ำปลาที่เดิมกล้าเชื้อแบคทีเรียมีกลิ่นที่อ่อนกว่าน้ำปลาทางการค้า เมื่อพิจารณาถึงกลิ่นรสและความชอบโดยรวม พบว่าคะแนนของกลิ่นรสและความชอบโดยรวมของตัวอย่างน้ำปลาที่เดิมกล้าเชื้อกรดแล็กติก *T.*

halophilus MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 ไม่แตกต่างจากน้ำปลาทางการค้าและตัวอย่างควบคุม ($p>0.05$)

ตารางที่ 4.9 คะแนนความชอบต่อตัวอย่างน้ำปลาเติมเกลือแบคทีเรียกรดแล็กติก *T. halophilus* ที่หมักเป็นเวลา 6 เดือน เทียบกับตัวอย่างทางการค้าที่หมักเป็นเวลา 12 เดือน

Samples	Attributes			Overall acceptance
	Color	Odor	Flavor	
Commercial	5.45 ± 1.04	4.73 ± 1.74	4.73 ± 1.35 ^a	4.91 ± 1.38
Control	4.82 ± 0.40	4.27 ± 1.01	3.55 ± 0.82 ^b	4.09 ± 0.94
MS33	4.82 ± 0.60	4.00 ± 1.18	3.64 ± 1.36 ^{ab}	4.27 ± 1.10
MCD10-5-10	4.82 ± 0.60	4.18 ± 1.08	3.91 ± 1.22 ^{ab}	4.36 ± 1.12

Acceptance score: 7 = extremely like; 4 = neither like nor dislike; 1 = extremely dislike.

Different superscripts indicate significant difference in the same column ($p<0.05$).

4.3 การหมักน้ำปลาโดยใช้เกลือจากแบคทีเรียกรดแล็กติกร่วมกับการใช้โปรตีนจากปลากระดูก

แม้ว่าการศึกษาในหัวข้อ 4.1 พบว่าการบ่มปลากระดูกที่ 50 องศาเซลเซียส ที่เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% มีผลต่อการเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองสูงสุด แต่ผลการศึกษายังชี้ว่าการบ่มที่อุณหภูมิสูงมีผลต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ในระยะยาว อีกทั้งการใช้อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นกระบวนการที่ต้องใช้พลังงานในกระบวนการผลิต หากสามารถลดอุณหภูมิลงได้แม้เพียง 1-2 องศาเซลเซียส จะทำให้ลดการใช้พลังงานลงมาก จึงได้ศึกษาเปรียบเทียบอุณหภูมิระหว่าง 40 และ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่าการย่อยสลายตัวเองของปลากระดูกที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ที่เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% ยังคงมีค่าสูงกว่าที่ 40 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.10) แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาปริมาณฮีสตามีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่าง พบว่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ส่งผลให้เกิดการสะสมของฮีสตามีนสูงกว่าที่ 40 องศาเซลเซียส โดยมีค่าฮีสตามีนในช่วง 28.78-33.47 มิลลิกรัม/100 กรัม ซึ่งเกินค่ามาตรฐาน (20 มิลลิกรัม/100 กรัม) ของประเทศแคนาดา (CFIA, 2003) ดังนั้นจึงเลือกใช้สภาวะในการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เป็นสภาวะในการเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองในการหมักน้ำปลา

ตารางที่ 4.10 ระดับการย่อยสลายตัวเองของปลากระตักเมื่อบ่มที่ 40 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

Incubation temperature (°C)	NaCl (%)	TCA-soluble oligopeptide	
		Tyrosine (μmol/g sample)	α-Amino content (μmol/g sample)
40	10	1.20 ^c	8.80 ^b
	15	0.90 ^d	6.15 ^d
50	10	1.86 ^a	10.40 ^a
	15	1.47 ^b	8.13 ^c

Letters indicate significant difference in the same column (p<0.05).

4.3.1 ผลการเติมกล้าเชื้อในกระบวนการหมักน้ำปลา

ก. การเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ที่ตรวจนับด้วยอาหาร PCA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 15% ซึ่งเป็นการตรวจนับประชากรแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง (Moderate halophiles) ที่ต้องการอากาศ พบว่าในช่วงเริ่มต้นของการหมักตัวอย่างควบคุมมีเชื้อประจำถิ่นอยู่เพียงเล็กน้อยคือ 2-3 Log CFU/มิลลิลิตร และตรวจไม่พบในตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก (ตารางที่ 4.11) นอกจากนี้ยังตรวจไม่พบประชากรแบคทีเรียกรดแล็กติกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ในตัวอย่างควบคุมไม่ว่าจะบ่มหรือไม่บ่มตัวอย่างก่อนการหมัก ส่วนตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกมีประชากรแบคทีเรียกรดแล็กติกอยู่ประมาณ 7 Log CFU/มิลลิลิตร ปริมาณเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในเดือนที่ 2 ของการหมักในทุกตัวอย่าง เนื่องจากจำนวนเชื้อที่ตรวจนับได้ด้วยอาหาร PCA ที่เติมเกลือ 15% เพิ่มขึ้นเป็น 5-6 Log CFU/มิลลิลิตร ประชากรกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกมีแนวโน้มลดลงประมาณ 2-3 Log CFU/มิลลิลิตร ในเดือนที่ 2 ของการหมักเช่นกัน นอกจากนี้ตรวจไม่พบแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียกรดแล็กติกหลังจากเดือนที่ 3-7 ในตัวอย่างที่ไม่บ่ม ส่วนตัวอย่างที่บ่มก่อนเติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD10-5-10 พบการคงอยู่ของแบคทีเรียกรดแล็กติก 5-7 Log CFU/มิลลิลิตร ในเดือนที่ 3 และไม่พบประชากรแบคทีเรียหลังจากนั้น ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าการบ่มปลาก่อนการหมักที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการคงอยู่ของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก แม้ว่าตัวอย่างดังกล่าวจะมีปริมาณเพปไทด์และกรดอะมิโนสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้บ่มก็ตาม

ตารางที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในช่วง 3 เดือนแรกของการหมัก ในตัวอย่างน้ำปลาบ่มที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และ ไม่บ่ม โดยหมักด้วยกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD10-5-10 และ *T. halophilus* MS33

Fermentation time (month)	Sample	Condition	Bacteria counts (Log CFU/mL)	
			PCA	MRS
0	Control	Incubation	2.77	ND
	MCD10-5-10	at 40°C, 10%NaCl, 4h	ND	7.11
	MS33		ND	7.00
	Control		3.22	ND
	MCD10-5-10	No incubation	ND	7.10
	MS33		ND	6.94
2	Control	Incubation	5.26	4.94
	MCD10-5-10	at 40°C, 10%NaCl, 4h	5.88	5.15
	MS33		5.46	5.15
	Control		5.34	4.63
	MCD10-5-10	No incubation	5.57	5.20
	MS33		5.57	4.80
3	Control	Incubation	1.48	1.48
	MCD10-5-10	at 40°C, 10%NaCl, 4h	ND	5.75
	MS33		ND	ND
	Control		ND	ND
	MCD10-5-10	No incubation	ND	ND
	MS33		ND	ND

ND = Not detected.

ข. การเปลี่ยนแปลงทางเคมี

เมื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณ โอลิโกเปปไทด์ในรูปไทโรซีนในตัวอย่างปลาที่ผ่านการบ่ม และ ไม่บ่มก่อนการหมักปลา พบว่าปริมาณ โอลิโกเปปไทด์รูปไทโรซีนมีแนวโน้มลดลงจาก

เดือนแรก ($p < 0.05$, รูปที่ 4.11a, 4.12a) ตัวอย่างที่เดิมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD10-5-10 ที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง มีปริมาณโพลิโกเพปไทด์สูงสุดในเดือนแรกของการหมัก ซึ่งแสดงถึงการย่อยสลายโปรตีน ($p < 0.05$, รูปที่ 3.11a) ในขณะที่ตัวอย่างที่เดิมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 ที่ไม่ผ่านการบ่ม มีปริมาณโพลิโกเพปไทด์สูงกว่าชุดทดลองที่ผ่านการบ่ม ($p < 0.05$, รูปที่ 4.12a) ปริมาณไทโรซีนของทุกตัวอย่างใกล้เคียงกันในแต่ละช่วงเวลาของการหมัก ปริมาณโพลิโกเพปไทด์ในรูปไทโรซีนอาจไม่ใช่ดัชนีที่ดีในการบ่งบอกระดับการย่อยของโปรตีนในระบบการหมัก หากเพปไทด์ที่ถูกปลดปล่อยไม่มีกลุ่มไทโรซีน ปริมาณโพลิโกเพปไทด์จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Lowry จะไม่เพิ่มขึ้น

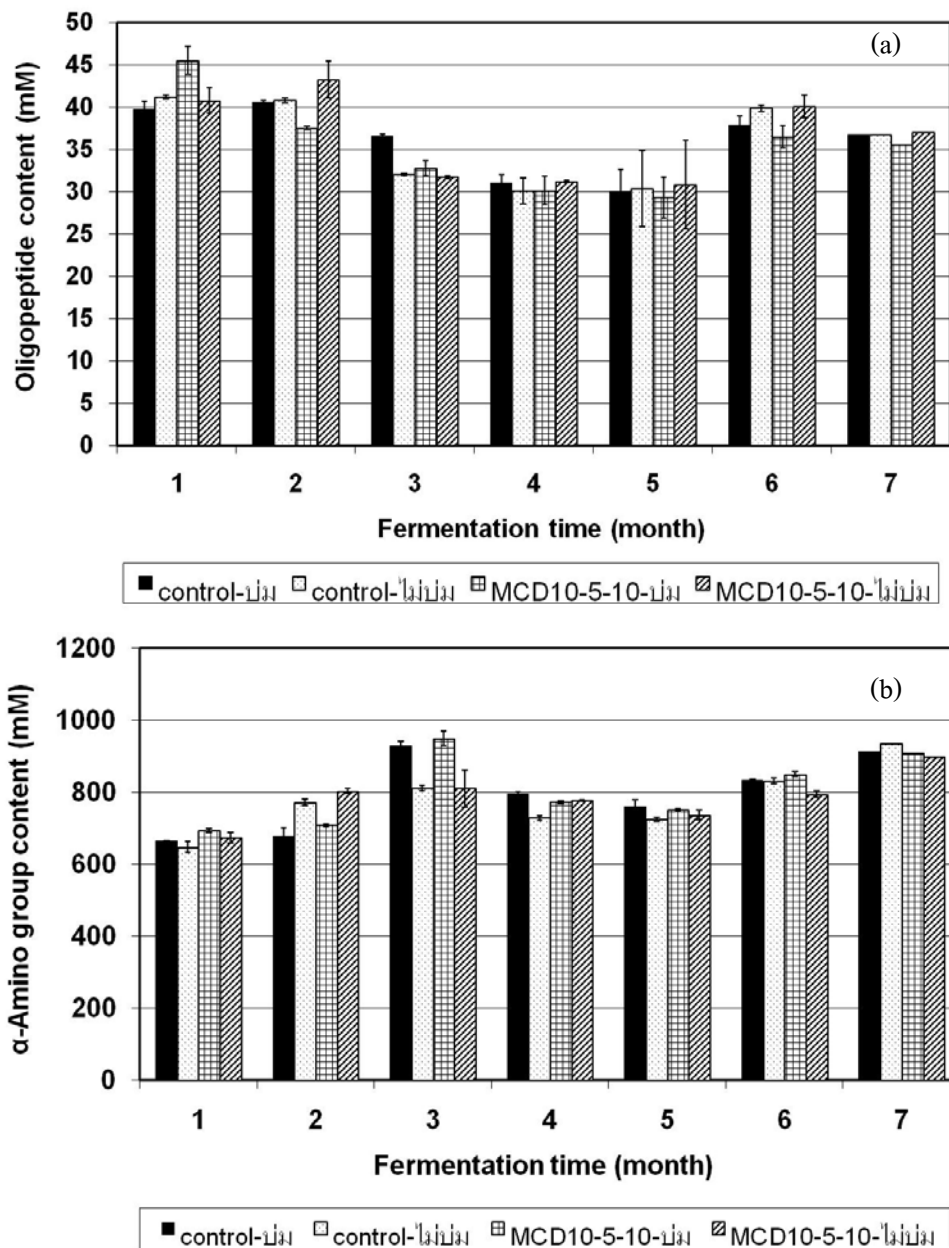
ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α -Amino group) ซึ่งแสดงถึงการย่อยสลายของโปรตีนมีค่าเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักในทุกตัวอย่างจากเดือนแรก ($p < 0.05$, รูปที่ 4.11b, 4.12b) ตัวอย่างที่เดิมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD10-5-10 (ที่ผ่านการบ่ม และไม่บ่ม) และตัวอย่างบ่มที่เดิมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 มีปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนสูงกว่าตัวอย่างควบคุมและมากกว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่ผ่านการบ่มก่อนการหมักในช่วง 3 เดือนแรก ($p < 0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเดิมกล้าเชื้อในตัวอย่างที่ผ่านการบ่มมีผลเร่งการย่อยสลายโปรตีนในช่วงต้น (3 เดือนแรก) ของการหมักมากกว่าการเดิมกล้าเชื้อในตัวอย่างที่ไม่ได้บ่ม เมื่อหมักครบ 7 เดือน ยังพบว่าตัวอย่างที่ผ่านการบ่มก่อนการเดิมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 มีค่าปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ผ่านการบ่ม ($p < 0.05$, รูปที่ 4.11b) ซึ่งยืนยันว่าการเหนี่ยวนำในปลาให้เกิดการย่อยสลายตัวเองที่ 40 องศาเซลเซียส ก่อนการเดิมกล้าเชื้อส่งผลให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนในช่วงการหมัก อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมกลับพบว่าตัวอย่างบ่มมีค่าปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนต่ำกว่าตัวอย่างที่ไม่บ่มก่อนการหมัก แสดงให้เห็นว่าการเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองก่อนการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะมีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนปลาในระบบการหมักในระยะยาว โดยการบ่มที่อุณหภูมิดังกล่าวอาจมีผลต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ ส่งผลให้ระดับการย่อยสลายโปรตีนมีค่าต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้บ่ม ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในระบบการหมักน้ำปลาของตัวอย่างที่เดิมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 สูงกว่า *T. halophilus* MCD10-5-10 เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างควบคุมที่บ่มและตัวอย่างบ่มที่เดิมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 พบว่าตัวอย่างบ่มที่เดิมกล้าเชื้อมีค่าสูงกว่า แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการย่อยโปรตีนของกล้าเชื้อนี้ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้บ่มพบว่าตัวอย่างที่เดิมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 มีค่าต่ำกว่า จากที่กล่าวมาข้างต้น การบ่มมีแนวโน้มลดกิจกรรมของโปรตีนในปลา และอาจทำลายเชื้อประจำถิ่นบางส่วน ส่งผลให้ระดับการย่อยลดลง ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าการเหนี่ยวนำปลาให้เกิดการย่อยสลายตัวเองที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อาจไม่เป็นผลดีต่อกระบวนการหมักน้ำปลาในระยะยาว แต่หากมีการเดิมกล้าเชื้อใน

กระบวนการหมัก การเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองก่อนการหมักจะส่งผลให้การย่อยสลายโปรตีนของระบบการหมักดีกว่าการไม่ได้เหนี่ยวนำ

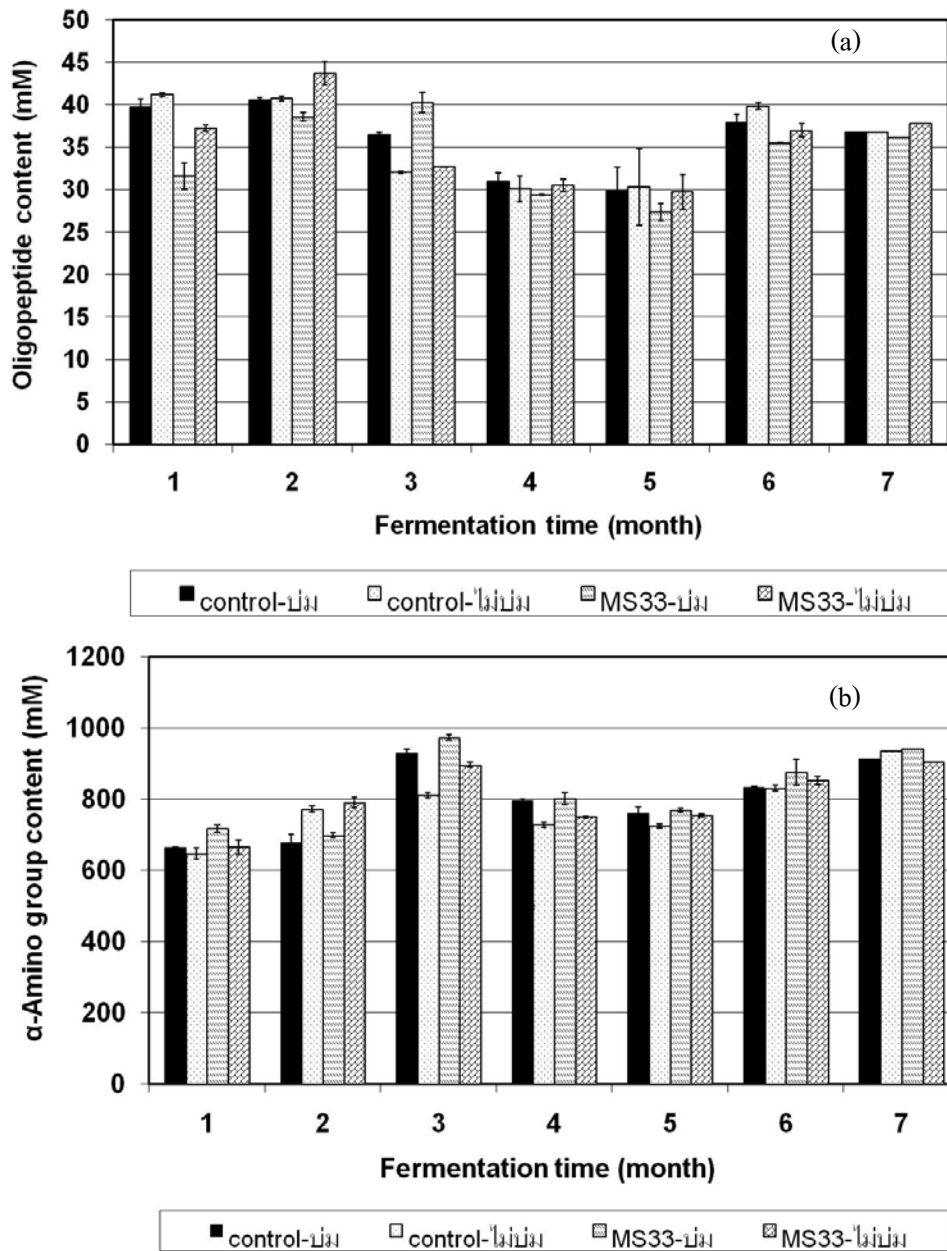
การเติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย *T. halophilus* MS33 ลงในตัวอย่างที่ผ่านการเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองก่อนการหมัก มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนได้สูงกว่า *T. halophilus* MCD10-5-10 การเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองก่อนการหมักมีผลเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายโปรตีนของกล้าเชื้อแบคทีเรีย *T. halophilus* MS33 แต่ไม่มีผลต่อการย่อยโปรตีนของกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD10-5-10 จะเห็นได้ว่าเชื้อต่างสายพันธุ์มีปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการสร้างโปรตีนที่ต่างกัน ดังนั้นการใช้ *T. halophilus* MS33 เป็นกล้าเชื้อควรจะใช้ในระบบการหมักที่ปลาได้ผ่านการย่อยมาแล้วในระดับหนึ่ง ซึ่งจะทำให้ระดับการย่อยโปรตีนของปลามีค่าสูงเมื่อการหมักเสร็จสมบูรณ์ การเพิ่มขึ้นของแอลฟาอะมิโนอาจมีผลต่อการสร้างสารระเหยที่ให้กลิ่นรสในน้ำปลาได้อีกด้วย เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของแอลฟาอะมิโนแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของเปปไทด์สายสั้น และกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นรสได้ (Law and Haandrikman, 1995; Magboul and McSweeney, 1999)

ส่วนการหมักแบบไม่เติมกล้าเชื้อนั้น การบ่มปลาเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายตัวเองก่อนการหมักไม่ได้เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายในกระบวนการหมักอย่างที่เข้าใจกัน ดังจะเห็นได้ว่าการบ่มปลาก่อนการหมักไม่ได้ส่งผลให้ปริมาณแอลฟาอะมิโนสูงในเดือนที่ 7 เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านการบ่ม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส มีผลลดเสถียรภาพของเอนไซม์ในตัวปลา ซึ่งอาจไม่เร่งกระบวนการย่อยโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักในระยะยาว Orejana and Liston (1982) พบว่า Serine proteinase ประเภท Trypsin-like proteinase จากตัวปลามีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายโปรตีน โดยเฉพาะในระยะ 1 เดือนแรกของการหมัก Gildberg and Shi (1994) รายงานว่า กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินในน้ำปลาที่หมักจากเครื่องใน (Vicera) ของปลาคอด (Cod) นั้นลดลงอย่างต่อเนื่องนับจากวันเริ่มต้นของการหมัก และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ในวันที่ 25 ของการหมัก การย่อยสลายอย่างรวดเร็วที่เกิดจากเอนไซม์ในตัวปลาในกลุ่ม Cathepsins จะเห็นได้ว่าการย่อยสลายโดยเอนไซม์ในตัวปลามีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการหมักน้ำปลา โดยเฉพาะในระยะเวลาเริ่มต้นของการหมัก

เมื่อพิจารณาคุณสมบัติทางเคมีทั่วไปของน้ำปลาในเดือนที่ 7 (ตารางที่ 4.12) ในโตรเจนรวมทั้งหมดซึ่งเป็นค่าที่บ่งชี้ปริมาณโปรตีนในโตรเจนและสารประกอบที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น แอมโมเนีย กรดอะมิโนอิสระ นิวกลิโอไทด์ ยูเรีย และไตรเมทิลามีน (Trimethylamine, TMA) ซึ่งพบว่าปริมาณในโตรเจนรวมทั้งหมดของชุดทดลองที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท ที่ผ่านการบ่มไม่ต่างกับชุดทดลองที่ไม่ผ่านการบ่ม ($p > 0.05$) นอกจากนี้ค่า pH ปริมาณเกลือ และค่าสีของชุดทดลองที่เติมกล้าเชื้อทั้ง



รูปที่ 4.11 ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ในรูป (a)ไทโรซีน และ (b)กลุ่มแอลฟาอะมิโน (α -Amino group content) ในตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD10-5-10 โดยปลาผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และปลาที่ไม่ผ่านการบ่มก่อนการหมักน้ำปลา ที่ระยะเวลาต่างๆ



รูปที่ 4.12 ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ในรูป (a)ไทโรซีน และ (b)กลุ่มแอลฟาอะมิโน (α -Amino group content) ในตัวอย่างน้ำปลาที่เดิมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 โดยปลาผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และปลาที่ไม่ผ่านการบ่มก่อนการหมักน้ำปลา ที่ระยะเวลาต่างๆ

2 ไอโซเลท ที่ผ่านการบ่มไม่ต่างกับชุดทดลองที่ไม่ผ่านการบ่ม ($p>0.05$) นอกจากนี้ค่า pH ปริมาณเกลือ และค่าสีของชุดทดลองที่เติมกล้ำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ที่ผ่านการบ่มไม่ต่างกับชุดทดลองที่ไม่ผ่านการบ่ม ($p>0.05$) เช่นกัน ดังนั้นการใช้ *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 เป็นกล้ำเชื้อในระบบการหมักอาจไม่จำเป็นต้องเหนี่ยวนำให้ลาเกิดการย่อยสลายตัวเองก่อนการหมัก

ตารางที่ 4.12 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้ำเชื้อ *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 โดยปลาผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และปลาที่ไม่ได้บ่มก่อนการหมัก

Sample	Condition	Total nitrogen (%)	pH	Salt (%)	Browning index
Control	Incubation	1.87	5.31	27.1	0.674
MCD10-5-10	at 40°C,	1.90	5.40	27.9	0.721
MS33	10%NaCl, 4h	1.90	5.33	27.6	0.682
Control		1.82	5.26	27.6	0.702
MCD10-5-10	No incubation	1.85	5.29	28.7	0.720
MS33		1.91	5.28	27.4	0.716

ไบโอจีนิกเอมีนที่ตรวจพบมี 6 ชนิดคือ ทริปตามีน (Tryptamine) พิวทริสซีน (Putrescine) คาดาเวอริน (Cadaverine) ฮีสตามีน (Histamine) สเปอรัมิดิน (Spermidine) และ สเปอรัมิน (Spermidine) ไบโอจีนิกเอมีนเหล่านี้พบได้ในผลิตภัณฑ์ปลา (Malle et al., 1996) โดยพบฮีสตามีนในช่วง 12.91-16.22 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร (ตารางที่ 4.13) ซึ่งเป็นค่าที่ไม่เกินมาตรฐานที่กำหนดไว้ที่ 20 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร (CFIA, 2003) แสดงว่าสถานะที่ใช้เพื่อเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองไม่ก่อให้เกิดการสะสมของฮีสตามีน เนื่องจากตัวอย่างที่ผ่านและไม่ผ่านบ่มมีค่าฮีสตามีนไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) และพบว่าตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้ำเชื้อ *T. halophilus* MCD10-5-10 (ที่ผ่านและไม่ผ่านการบ่มก่อนการหมัก) และ *T. halophilus* MS33 ที่ผ่านการบ่มก่อนการหมักมีปริมาณฮีสตามีนสูงกว่าตัวอย่างน้ำปลาที่เติม *T. halophilus* MS33 ที่ไม่ผ่านการบ่ม และตัวอย่างควบคุม ($p<0.05$) การปนเปื้อนของฮีสตามีนในอาหารสามารถทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษได้ (Taylor, 1986) ปริมาณฮีสตามีนต่ำ (น้อยกว่า 5 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) ถือเป็นสิ่งปกติที่พบได้ในอาหาร ส่วนปริมาณฮีสตามีนที่สูงกว่า 100 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร จะทำให้ผู้บริโภคมีอาการอาหารเป็นพิษรุนแรงได้ นอกจากนี้ยังพบว่าไบโอจีนิกเอมีนบางชนิด เช่น พิวทริสซีน และ คาดาเวอริน มีผลเสริมความรุนแรงของฮีสตามีนด้วย (Taylor, 1986) แต่พิวทริสซีน และ คาดาเวอริน ในการศึกษานี้ไม่มี

ความแตกต่างกัน ($p>0.05$) แสดงว่าสภาวะการบ่มที่เดิมและไม่เดิมกล้าเชื้อไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณไบเอเจนิกเอมีนทั้ง 2 ชนิด ปริมาณทริปตามีนพบในตัวอย่างที่เดิมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 ที่ผ่านการบ่มมีค่าน้อยที่สุด (6.49 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) ส่วนปริมาณพิวทรีสซีน สเปอรัมิดีน และ สเปอรัมีน ในทุกตัวอย่างไม่ต่างกัน ($p>0.05$)

ตารางที่ 4.13 ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนของตัวอย่างน้ำปลาที่เดิมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 โดยปลาผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และปลาที่ไม่ได้บ่มก่อนการหมัก

Sample	Condition	Biogenic amines content (mg/100 ml)					
		Tryptamine	Putrescine	Cadaverine	Histamine	Spermidine	Spermine
Control	Incubation	10.29 ^{ab}	1.95	4.15 ^b	13.43 ^b	1.45	0.29
MCD10-5-10	at 40°C,	11.67 ^a	2.52	4.27 ^b	15.91 ^a	1.45	0.36
MS33	10%NaCl, 4h	6.49 ^b	2.20	4.19 ^b	16.22 ^a	1.73	0.50
Control	No	9.37 ^{ab}	2.16	5.92 ^a	13.29 ^b	1.36	0.30
MCD10-5-10	incubation	10.96 ^{ab}	1.83	3.84 ^b	14.99 ^a	1.52	0.46
MS33		10.49 ^{ab}	1.91	4.12 ^b	12.91 ^b	1.29	0.42

Letters indicate significant difference in the same column ($p<0.05$).

บทที่ 5

บทสรุป

5.1 สรุปผลการวิจัย

สภาวะที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนของปลากระดูก คือการบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการเร่งการย่อยสลายโปรตีนในกระบวนการหมักน้ำปลา

แบคทีเรียกรดแล็กติกจำนวน 2 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำปลาหมักเดือนที่ 1 และ 5 มีรูปร่างเซลล์กลม เรียงตัวเป็นคู่ (Pairs) และแบบสี่เหลี่ยม (Tetrads) สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0-25% และเจริญได้ดีที่เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5-10% มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene เหมือนกับ *T. halophilus* ATCC 33315 99.0% จากข้อมูลที่มีใน Nucleotide sequence database ของ NCBI สรุปได้ว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 2 ไอโซเลทเป็นชนิด *T. halophilus* อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกรดแล็กติกแต่ละไอโซเลทเป็นสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันด้านศักยภาพการผลิตเอนไซม์ และสารระเหยจากการย่อยโปรตีนของปลากระดูก รวมทั้งแบบแผนการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ และความสามารถในการเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

แบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลาจำนวน 2 ไอโซเลท นำมาเลี้ยงในอาหาร Fish broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% พบสารประกอบแอลกอฮอล์ ได้แก่ Isopropyl alcohol, 1-Propanol, 1-Butanol, 1-Penten-3-ol, 3-Methyl-1-butanol, 1-Pentanol, และ 1-Hexanol ไอโซเลท MS33 สร้าง 2-Methylpropanal ในปริมาณที่มากกว่าตัวอย่างควบคุม *T. halophilus* MS มีแนวโน้มสร้างสารระเหยที่กลิ่นเนื้อมีผลึกมันท์หมักที่ปริมาณเกลือสูง และไม่ทำให้เกิดกลิ่นรสไม่พึงประสงค์ในผลิตภัณฑ์น้ำปลา

จากการทดลองหมักปลากระดูกร่วมกับการใช้แบคทีเรียกรดแล็กติกและเอนไซม์ทางการค้า น้ำปลาที่ได้มีมาตรฐานเทียบเท่ากับน้ำปลาชั้นที่ 1 หลังการหมักเป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่าจำนวนแบคทีเรียลดลงจากวันเริ่มต้น 3-4 Log CFU/ มิลลิลิตร ในเดือนที่ 1 และไม่สามารถตรวจนับแบคทีเรียได้ในเดือนที่ 3 แต่อย่างไรก็ตามปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่างที่เดิม *T. halophilus* มีค่าสูงกว่าตัวอย่างควบคุม โดยอยู่ในช่วง 704-727 มิลลิโมลาร์ ตัวอย่างน้ำปลาที่เดิมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 มีปริมาณฮีสตามีนต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม ดังนั้นกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกสองไอโซเลทนี้อาจช่วยลดฮีสตามีนในน้ำปลาได้ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดมีค่ามากกว่า

2.0% และมีปริมาณแอมโมเนียเพียงเล็กน้อย ค่าความเข้มข้นของสีน้ำตาลใกล้เคียงกับตัวอย่างควบคุม การเติมแบคทีเรีย *T. halophilus* MCD10-5-10 มีแนวโน้มช่วยลดปริมาณสาร Dimethyl disulfide ซึ่งให้กลิ่นที่ไม่ดีในน้ำปลา เมื่อทดสอบการยอมรับโดยรวมของน้ำปลาที่เติมกล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก พบว่าไม่ต่างจากตัวอย่างทางการค้าที่หมักเป็นเวลา 12 เดือน

จากการทดลองหมักปลากระต๊อร่วมกับการใช้แบคทีเรีย *T. halophilus* MCD10-5-10 และ *T. halophilus* MS33 เป็นระยะเวลา 7 เดือน โดยผ่านกระบวนการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนกระบวนการหมักน้ำปลา พบว่าการเติมกล้ำเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทในตัวอย่างปลาที่ผ่านการบ่มสามารถเร่งการย่อยสลายในช่วง 3 เดือนแรกของการหมัก และเมื่อช่วงเวลาหมักผ่านไปจนครบ 7 เดือน พบว่าการบ่มปลาก่อนการหมักไม่ได้ช่วยเร่งกระบวนการหมักในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมกล้ำเชื้อ การเติมกล้ำเชื้อแบคทีเรีย *T. halophilus* MS33 ลงในตัวอย่างที่ผ่านการเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองก่อนการหมัก ส่งผลให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักได้สูงกว่า *T. halophilus* MCD10-5-10 ปริมาณฮีสตามีนของทุกชุดการทดลองอยู่ในช่วง 12.91-16.22 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาแบคทีเรียทนเค็มหรือชอบเค็มอื่นๆ ที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา และย่อยโปรตีนปลาได้ดี เพื่อนำไปใช้เร่งกระบวนการหมักน้ำปลาร่วมกับแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ได้ศึกษาแล้ว

บรรณานุกรม

- วิไลลักษณ์ กลมกลาง. 2538. การศึกษาการหมักน้ำปลาโดยใช้เชื้อแบคทีเรียชอบเกลือร่วมกับโคจิ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Abe, K., and Uchida, K. (1989). Correlation between depression of catabolite control of xylose metabolism and a defect in the phosphoenolpyruvate: mannose phosphotransferase system in *Pediococcus halophilus*. **J. Bacteriol.** 171: 1793-1800.
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysate by trinitrobenzensulfonic acid. **J. Agric. Food Chem.** 27: 1256–1262.
- Ali, N.E-H., Hmidet, N., Ghorbel-Bellaaj, O., Fakhfakh-Zouari, N., Bougatef, A., and Nasri, M. (2011). Solvent-Stable Digestive Alkaline Proteinases from Striped Seabream (*Lithognathus mormyrus*) Viscera: Characteristics, Application in the Deproteinization of Shrimp Waste, and Evaluation in Laundry Commercial Detergents. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 164: 1096–1110.
- An, H., Seymour, T.A., Wu, J., and Morrissey, T. (1994). Assay system and characterization of pacific whiting (*Merluceius productus*) protease. **J. Food Sci.** 59: 277-281.
- AOAC. (2000). Official Method of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
- Aoki, T., and Ueno, R. (1997). Involvement of cathepsins B and L in the post-mortem autolysis of mackerel muscle. **Food Res. Int.** 30: 585- 591.
- Aranishi, F., Ogata, H., Hara, K., Osatomi, K., and Ishihara, T. (1997). Purification and characterization of cathepsin L from hepatopancreas of carp (*Cyprinus carpio*). **Comp. Biochem. Physiol.** 118B: 531-537.
- Axelsson, L.T. (1993). **Lactic acid Bacteria**. New York, Marcel Dekker. pp. 1-77.
- Bebzerra, R., Lins, E.J.F., Alencar, R.B., Paiva, P.M.G., Chaves, M.E.C., Coelho, L.C.B.B., and Carvalho, L.B. (2005). Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Proc. Biochem.** 40: 1829-1834
- Beddows, C. G., and Ardeshir, A. G. (1979). The production of soluble fish protein solution for use in fish sauce manufacture I. The use of added enzymes. **J. Food Technol.** 14: 603–612.

- Beddows, C. G., Ardeshir, A. G., and Daud, W. J. (1979). Biochemical changes occurring during the manufacture of Budu. **J. Sci. Food Agric.** 30(11): 1097-1103.
- Beddows, C. G., Ardeshir, A. G., and Daud, W. J. (1980). Development and origin of volatile fatty acid in Budu. **J. Sci. Food Agric.** 31: 86-92.
- Benjakul, S., Visessanguan, W., and Leelapongwattana, K. (2003). Purification and characterization of heat-stable alkaline proteinase from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) muscle. **Comp. Biochem. Physiol. Part B.** 134: 579–591.
- Beynon, R., and Bond, J.S. (2001). **Proteolytic enzymes** (2nd ed.). Oxford, Oxford: University Press.
- Bing-Xin Liu, Xue-Li Du, Li-Gen Zhou, Kenji Hara, Wen-Jin Su, Min-Jie Cao. (2008). Purification and characterization of a leucine aminopeptidase from the skeletal muscle of common carp (*Cyprinus carpio*). **Food Chem.** 108: 140–147.
- Boye, S.W., and Lanier, T.C. (1988). Effects of heat stable alkaline proteinase activity of Atlantic menhaden (*Brevoortia tyrannus*) on surimi gels. **J. Food Sci.** 53: 1340-1342,1398.
- Cao, M.J., Hara, K., Osatomi, K., Tachibana, K., Izumi, T., and Ishihara, T. (1999a). Myofibril-bound serine proteinase (MBP) and its degradation of myofibrillar proteins. **J. Food Sci.** 64: 644- 647.
- Cao, M.J., Hara, K., Weng, L, Zhang, N., and Su, W.J. (2005). Further characterization of a sarcoplasmic serine proteinase from skeletal muscle of white croaker (*Argyrosomus argentatus*). **Biochem Biokhimiia.** 70(10): 1163-1166.
- Cao, M.J., Jiang, X.J., Zhong H.C., Zhang, Z.J., and Su, W.J. (2006). Degradation of myofibrillar proteins by a myofibril-bound serine proteinase in the skeletal muscle of crucian carp (*Carasius auratus*). **Food Chem.** 94: 7-13.
- Cao, M.J., Osatomi, K., Pangkey, H., Hara, K., and Ishihara, T. (1999b). Cleavage specificity of myofibril-bound serine proteinase from carp (*Cyprinus carpio*) muscle. **Comp. Biochem. Physiol.** 123: 399- 405.
- Cao, M.J., Osatomi, M., Hara, K., and Ishihara, T. (2000). Identification of a myofibril-bound serine proteinase (MBSP) in the skeletal muscle of lizardfish *Saurida wanieso* which specifically cleaves the arginine site. **Comp. Biochem. Physiol.** 125B: 255-264.

- Castillo-Yanez, F.J., Pacheco-Aguilar, R., Garcia-Carreno, F.L., and Navarrete-Del Toro, M.A. (2004). Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. **Food Chem.** 85: 343-350.
- Castillo-Yanez, F.J., Pacheco-Aguilar, R., Garcia-Carreno, F.L., and Toro, M.A.N. (2005). Isolation and characterization of trypsin from pyloric ceca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. **Comp. Biochem. Phys. Part B:** 140, 91–98.
- [CFIA] Canadian Food Inspection Agency. (2003). Fish Inspection. Act. Ottawa, Canada: Dept. of Justice.
- Cha, Y.J., and Cadwallader, K.R., 1998. Aroma active compounds in skipjack tuna sauce. **J. Agric. Food Chem.** 46: 1123–1128.
- Chaiyanan, S., Mangel, T., Huq, A., Robb, F.T., and Colwell, R.R. (1999). Polyphasic taxonomy of a novel halobacillus, *Halobacillus thailandensis* sp. nov. isolated from fish sauce. **Syst. Appl. Microbiol.** 22: 360-365.
- Che´ret, R., Delbarre-Ladrat, C., de Lamballerie-Anton, M., Verrez-Bagnis, V., and Haard N.F. (2007). Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. **Food Chem.** 101: 1474–1479.
- Choi, Y.J. Heu, M.S., Kim, H.R., and Pyeun, J.H. (2004). Properties of proteases responsible for degradation of muscle proteins during anchovy sauce fermentation. In M. Sakaguchi (Ed.). **More Efficient Utilization of Fish and Fisheries Products** (pp.425-439). New York: Elsevier Ltd.
- Choi, Y.J., Lanier, T.C., Lee, H.G., and Cho, Y.J. (1999). Purification and characterization of alkaline proteinase from Atlantic menhaden muscle. **J. Food Sci.** 64: 768-771.
- Christensen, J.E., Dudley, E. G., Pederson, J.A., and Steele, J.L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. **Int. J. Gen. Mol. Microbiol.** 76: 217-246.
- Collins, M.D., Williams, A.M., and Wallbanks, S. (1990). The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. **FEMS Microbiol. Lett.** 70: 255-262.
- Curioni, P. M. G., and Bosset, J. O. (2002). Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography–olfactometry. **Int. Dairy J.** 12: 959-984.

- Devos, M., Patte, F., Roualt, J., Laffort, P., and Gemert, L. J. (1995). Standardized human olfactory thresholds. **J. Odor Res. Eng.** 26: 27-47.
- Dougan, J., and Harward, G. E. (1975). Some flavoring constituents of fermented fish sauces. **J. Sci. Food Agric.** 26: 887.
- du Toit, M., Franz, C.M., Dicks, L.M., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., Ahrens, F., and Holzapfel, W.H. (1998). Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. **Int. J. Food Microbiol.** 40: 93-104.
- Eerola, S., Hinkkanen, R., Lindfors, E., Hirvi, T. (1993). Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. **J. AOAC Int.** 76(3): 575-577.
- El-Beltagy, A.E., El-Adawy, T.A., Rahma, E.H., and El-Bedawey, A.A. (2004). Purification and characterization of an acidic proteinase from viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*). **Food Chem.** 86: 33-39.
- Ennahar, S., and Cai, Y. (2005). Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Enterococcus solitarius* Collins et al. 1989 to the genus *Tetragenococcus* as *Tetragenococcus solitarius* comb. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55: 589-592.
- Fukami, K., Funatsu, Y., Kawasaki, K., and Watabe, S. (2004). Improvement of fish sauce odor by treatment with bacteria isolated from the fish-sauce mush (moromi) made from frigate mackerel. **J. Food Sci.** 69(2): 45-49.
- Fukami, K., Ishiyama, S., Yaouramaki, H., Masuzawa, T., Nabeta, Y., Endo, K., and Shimoda, M. (2002). Identification of distinctive volatile compounds in fish sauce. **J. Agric. Food Chem.** 50: 5412-5416.
- Geesink, G.H., Morton, J.D., Kent, M.P., and Bickerstafee, R. (2000). Partial purification and characterization of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) calpains and an evaluation of their role in postmortem proteolysis. **J. Food Sci.** 65: 1318-1324.
- Gildberg, A., and Shi, X. Q. (1994). Recovery of tryptic enzymes from fish sauce. **Proc. Biochem.** 29: 151-155.
- Gildberg, A., Hermes, J.S., and Orejana, F.M. (1984). Acceleration of autolysis during fish sauce fermentation by adding acid and reducing the salt content. **J. Sci. Food Agric.** 35: 1363-1369.

- Goldman-Levkovitz, S., Rimon, A., and Rimon, S. (1995). Purification properties and specificity of cathepsin D from *Cyprinus carpio*. **Comp. Biochem. Physiol.** 112B: 147-151.
- Haard, N.F. (1994). Protein hydrolysis in seafoods. In F. Shahidi and J.R. Botta (Eds.). **Seafoods Chemistry, Processing Technology and Quality** (pp.10-26). London: Chapman & Hall.
- Hans, G. H. J., Erwin, G. Z., Elaine E. V., Marteau, P., Akkermans, A. D. L., and Willem, M. V. (2002). Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 68(1): 114-123.
- Helinck, S., Bars, D. L., Moreau, D., and Yvon, M. (2004). Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. **Appl. Environ. Microbiol.** 70: 3855-3861.
- Heu, M.S., Kim, H.R., and Pyeun, J.H. (1995). Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy (*Engraulis japonica*). **Comp. Biochem. Physiol.** 112B: 557-567.
- Heu, M.S., Kim, H.R., Cho, D.M., Godber, J.S., and Pyeun, J.H. (1997). Purification and characterization of cathepsin L-like enzymes from the muscle of anchovy (*Engraulis japonica*). **Comp. Biochem. Physiol.** 118B: 523-529.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. (1994). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins.
- Hozapfel, W. H., Franz, M. A. P., Ludwig, W., Back, W., and Dicks, M. T. (2006). The genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*. **Prokaryotes**. 4: 229-266.
- <http://fic.nfi.or.th/th/home/default.asp>
- <http://www.manager.co.th/Daily/ViewNews.aspx?NewsID=9540000063910>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>
- Hu, Y., Morioka, K., and Itoh, Y. (2008). Actomyosin nonbinding cathepsin L in walleye Pollock surimi. **J. Food Biochem.** 32: 143-152.
- Inaba, K., Buerano, C.C., Natividad, F.F., and Morisawa, M. (1997). Degradation of vitellogenins by 170 kDa trypsin-like proteinase in the plasma of the tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comp. Biochem. Physiol.** 118B: 85-90.

- Ishida, M., Niizeki, S., and Nagayama, F. (1994). Thermalstable proteinase in salted anchovy muscle. **J. Food Sci.** 59: 781-785,791.
- Ishida, M., Sugiyama, N., Sato, M., and Nagayama, F. (1995). Two kinds of neutral serine proteinases in salted muscle of anchovy, *Engraulis japonica*. **Biosci. Biotech. Biochem.** 59: 1107-1112.
- Jiang, S.T., Lee, J.J., and Chen, H.C. (1994). Purification and characterization of a novel cysteine proteinase from mackerel (*Scomber australasicus*). **J. Agric. Food Chem.** 42: 1639-1649.
- Jiang, S.T., Tsao, C.Y., Wang, Y.T., and Chen, C.S. (1990). Purification and characterization of proteinases from milkfish muscle (*Chanos chanos*). **J. Agric. Food Chem.** 38: 1458- 1463.
- Jiang, S.T., Wang, Y.T., and Chen C.S. (1991). Purification and characterization of a proteinase identified as cathepsin D from tilapia muscle (*Tilapia nilotica* X *Tilapia aurea*). **J. Agric. Food Chem.** 39: 1597-1601.
- Kandler, O., and Weiss, N. (1989). Regular, Non-Sporing Gram Positive Rods. In Sneath, P.H., Mair, N.S., Sharpe, M.E., and Holt J.G. eds.). **Bergeys Manual of Systematic Bacteriology** (Vol.2 pp. 1208-1234. Baltimore, Maryland:Williams & Wilkins.
- Ke, D., Picard, F. J., Martineau, F., Nard, C., Roy, P. H., Ouellette, M., and Bergeron, M. G. (1999). Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. **J. Clin. Microbiol.** 37: 3497-3503.
- Kimura, B., Konagaya, Y., and Fujii, T. (2001). Histamine formation by *Tetragenococcus muritaticus*, a halophilic lactic acid bacterium isolated from fish sauce. **Int. J. Food Microbiol.** 70: 71-77.
- Kinoshita, M. Toyohara, H., and Shimizu, Y. (1990). Purification and properties of a novel latent protein showing myosin heavy chain degrading activity from threadfin bream muscle. **J. Biochem.** 107: 587-591.
- Kishimura, H., and Hayashi, K. (2002). Isolation and characteristics of carboxypeptidase B from the pyloric ceca of the starfish *Asterias amurensis*. **Comp. Biochem. Phys. Part B: Biochem Mol. Biol.** 133: 183-189.
- Kishimura, H., Hayashi, K., and Ando, S. (2006a). Characteristics of carboxypeptidase B from starfish (*Asterina pectifera*). **Food Chem.**95: 264-269.

- Kishimura, H., Hayashi, K., Miyashita, Y., & Nonami, Y. (2006b). Characteristics of trypsins from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric caeca of arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*). **Food Chem.**97: 65–70.
- Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., and Simpson, B.K. (2006). Proteolytic degradation of sardine (*Sardinella gibbosa*) proteins by trypsin from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) spleen. **Food Chem.**98: 14–22.
- Klomklao, S., Kishimura, H., Benjakul, S., and Simpson, B.K. (2009). Autolysis and biochemical properties of endogenous proteinases in Japanese sandfish (*Arctoscopus japonicus*). **Int. J. Food Sci Tech.** 44: 1344–1350
- Kobayashi, T., Kajiwara, M., Wahyuni, M., Kitakado, T., Hamada-Sato, N., Imada, C., and Watanabe, E. (2003). Isolation and characterization of halophilic lactic acid bacteria isolated from terasi shrimp paste: A traditional fermented seafood product in Indonesia. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 49: 279-286.
- Kobayashi, T., Kimura, B., and Fuji, T. (2000). Differentiation of *Tetragenococcus* populations occurring in products and manufacturing process of puffer fish ovaries fermented with rice-bran. **Int. J. Food Microbiol.** 56: 211-218.
- Konings, W.N. (202). The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenkoek.** 82: 3-27.
- Kristjansson, M.M. (1991). Purification and characterization of trypsin from pyloric caeca of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Agric. Food Chem.** 39: 1738-1742.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., and Nei, M. (2004). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics.** 17: 1244-1245.
- Ladrat, C., Chaplet, M., Verrez-Bagnis, V., Noel, J., and Fleurence, J. (2000). Neutral calcium-activated proteinases from European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) muscle: polymorphism and biochemical studies. **Comp. Biochem. Physiol.** 125B: 83-95.
- Law, J., and Haandrikman, A. (1995). Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. **Int. Dairy. J.** 7: 1-11.

- Lee, M., Kim, M. K., Vancanneyt, M., Swings, J., Kim, S. H., Kang, M.S., and Lee, S. T. (2005). *Tetragenococcus koreensis* sp. nov., a novel rhamnolipid-producing bacterium. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55: 1409-1413.
- Leisner, J. J., Vancanneyt, M., Rusul, G., Pot, B., Lefebvre, K., Fresi, A., and Tee, L.K. (2001). Identification of lactic acid bacteria constituting the predominating microflora in an acid-fermented condiment (tempoyak) popular in Malaysia. **Int. J. Food Microbiol.** 63: 149-157.
- Liu, H., Yin, J., Zhang, N., Li, S., and Ma, C. (2008). Isolation of cathepsin B from the muscle of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and comparison of cathepsins B and L actions on surimi gel softening. **Food Chem.** 110: 310–318.
- Lopetcharat, K., and Park, J. W. (2002). Characteristics of fish sauce made from Pacific whiting and surimi by-products during fermentation stage. **J. Food Sci.** 67: 511-516.
- Lopetcharat, K., Choi, Y. J., Park, J. W., and Daeschel, M. A. (2001). Fish sauce products and manufacturing : a review. **Food. Rev. Int.** 17(1): 65-88.
- Lowry O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265–275.
- Lugo-Sanchez, M.E., Pacheco-Aguilar, R., and Yepiz-Plascencia, G. (1997). Catalytic Activities of crude enzyme fractions from Monterey sardine. **J. Food Sci.** 62: 976-979.
- Magboul, A. A., and McSweeney, P. (1999). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. **Int. Dairy. J.** 9: 107-116.
- Malle, P., Valle, M., and Bouquelet, S. (1996). Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. **J. AOAC Int.** 79(1): 43-49.
- Manome, A., Okada, S., Uchimura, T., and Komagata, K. (1998). The ratio of L-form to D-form of lactic acid as a criteria for the identification of lactic acid bacteria. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 44: 371-374.
- Marilley, L., and Casey, M. G. (2004). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. **Int. J. Food Microbiol.** 90: 139-159.
- Martinez, A., and Serra, J. L. (1989). Proteolytic activities in digestive tract of anchovy *Engraulis encrasicolus*. **Comp. Biochem. Phys. Part B.** 93: 61–66.

- Martinez, A., Olsen, R. L., and Serra, J. L. (1988). Purification and characterization of two trypsin-like enzymes from the digestive tract of anchovy *Engraulis encrasicolus*. **Comp. Biochem. Phys. Part B**. 91: 677–684.
- Martone, C.B., Busconi, L., Folco, E.J.E., and Sanchez, J.J. (1991). Detection of a trypsin-like serine and its endogenous inhibitor in hake skeletal muscle. **Arch. Biochem. Biophys.** 289: 1- 5.
- Masson, F., Hinrichsen, L., Talon, R., and Montel, M. C. (1999). Factors influencing leucine catabolism by a strain of *Staphylococcus carnosus*. **Int. J. Food Microbiol.** 49:173-178.
- McIver, R. C., Brooks, R. I., and Reineccius, G. A. (1982). Flavor of fermented fish sauce. **J. Agric. Food Chem.** 30: 1017.
- Michihata, T., Sado, Y., Yano, T., and Enomoto, T. (2000). Preparation of Ishiru (fish sauce) by a quick ripening process and changes in the composition of amino acids, oligopeptides and organic acids during processing. **J. Japan Soc. Food Sci. Technol.** 47(5): 369-77.
- Michihata, T., Yano, T., and Enomoto, T. (2002). Volatile compounds of headspace gas in the Japanese fish sauce ishuru. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 66: 2251-2255.
- Nakagawa, A., and Kitahara, K. (1959). Taxonomic studies on the genus *Pediococcus*. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 5: 95-126.
- Nielsen, L.B., and Nielsen, H.H. (2001). Purification and characterization of cathepsin D from the herring muscle (*Clupea harengus*). **Comp. Biochem. Physiol.** 128B: 351-363.
- Ohkubo, M., Miyagawa, K., Osatomi, K., Hara, K., Nozaki, Y., and Ishihara, T. (2004a). Purification and characterization of myofibril-bound serine proteinase from lizardfish (*Saurida undosquamis*) muscle. **Comp. Biochem. Physiol.** 137B: 139-150.
- Ohkubo, M., Miyagawa, K., Osatomi, K., Hara, K., Nozaki, Y., and Ishihara, T. (2004b). A novel serine protease complexed with α 2-macroglobulin from skeletal muscle of lizardfish (*Saurida undosquamis*). **Comp. Biochem. Physiol.** 139B: 637-647.
- Orejana, F. M., and Liston, J. J. (1982). Agents of proteolysis and its inhibition in patis (fish sauce) fermentation. **J. Food Sci.** 47: 198-209.

- Osatomi, K., Sasai, H., Cao, M.J., Hara, K., and Ishihara, T. (1997). Purification and characterization of myofibril-bound serine proteinase from carp (*Cyprinus carpio*) ordinary muscle. **Comp. Biochem. Physiol.** 116B: 183-190.
- Park J. N., Fukumoto, Y., Fujita, E., Tanaka, T., Washio, T., Otsuka, S., Shimazu, T., Watanabe, K., and Abe, H. (2001). Chemical composition of fish sauces produced in Southeast and East Asian countries. **J. Food. Comp. Anal.** 14: 113-125.
- Peralta, R., Shimoda, M., and Osajima, Y. (1996). Further identification of volatile compounds in fish sauce. **J. Agric. Food Chem.** 44: 3606-3610.
- Phrommao, E., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2011). Identification of novel halotolerant bacillopeptidase F-like proteinases from a moderately halophilic bacterium, *Virgibacillus* sp. SK37. **J. Appl. Microbiol.** 110(1): 191-201.
- Pornaveewat, W., Padongkeittiwong, P., and Chaiyana, S. (2002). Characterization of halophilic extracellular proteases of halophilic bacteria isolated from fermenting fish sauce. **Protein Research Network Symposium**, August 29-30, Bangkok: Mahidol University.
- Raksakulthai, N., and Haard, N. F. (1992). Peptides and amino acids and the flavor of fish sauce. **Asean Food. J.** 7-86.
- Roling, W. F. M and Verseveld, H. W. (1996). Characterization of *Tetragenococcus halophilus* populations in Indonesian soy mash (Kecap) fermentation. **J. Appl. Environ. Microbiol.** 62: 1203-1207.
- Saisithi, P. (1994). Traditional fermented fish: fish sauce production. In A.M. Martin (ed). **Fisheries Processing: Biotechnological Application** (pp. 111-131). London: Chapman & Hall.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** (3rd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanceda, N. G., Kurata, T., Suzuki, Y., and Arakawa, N. (1992). Oxygen effect on volatile acids formation during fermentation in manufacture of fish sauce. **J. Food Sci.** 57(5): 1120-1123.
- Sanceda, N. G., Suzuki, E., and Kurata, T. (2001). Development of normal and branched chain volatile fatty acids during the fermentation process in the manufacture of fish sauce. **J. Sci. Food Agric.** 81: 1013-1018.

- Satomi, M., Kimura, B., Mizoi, M., Sato, T., and Fuji, T. (1997). *Tetragenococcus muriaticus* sp. nov., a new moderately halophilic lactic acid bacterium isolated from fermented squid liver sauce. **Int. J. Syst. Bact.** 47: 832-836.
- Seymour, T.S., Morrissey, M.T., Peters, M.Y., and An, H. (1994). Purification and characterization of Pacific whiting proteinases. **J. Agric. Food Chem.** 42: 2421- 2427.
- Shahidi, F. and Kamil, Y.V.A.J. 2001. Enzyme from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry- a review. **Trends Food Sci.Technol.** 12: 435- 464.
- Shahidi, F., Sikorski, Z. E, and Pan, B. S. (1994). Proteins from seafood processing discards. **Seafood Protein** (pp. 171-193). New York: Chapman & Hall.
- Shimoda, M., Peralta, R., and Osajima, Y. (1996). Headspace gas analysis of fish sauce. **J. Agric. Food Chem.** 44: 3601-3605.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2010). A NaCl-stable serine proteinase from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from Thai fish sauce. **Food Chem.** 119(2): 573–579.
- Siringan, P., Raksakulthai, N., and Yongsawatdigul, J. (2006a). Autolytic activity and biochemical characteristics of endogenous proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). **Food Chem.**98: 678–684.
- Siringan, P., Raksakulthai, N., and Yongsawatdigul, J. (2006b). Source and changes of proteinase activities of Indian anchovy (*Stolephorus* spp.) during fish sauce fermentation. **J. Sci. Food Agric.** 86: 1970–1976.
- Siringan, P., Raksakulthai, N., and Yongsawatdigul, J. (2007). Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus* spp.). **Food Chem.** 101:82–89.
- Smit, B. A., and Engels, W. J (2004). Chemical conversion of alpha-keto acids in relation to flavor formation in fermented foods. **J. Agric. Food Chem.** 52(5): 1263-1268.
- Smit, B. A., and Engels, W. J. (2004). Chemical conversion of alpha-keto acids in relation to flavor formation in fermented foods. **J. Agric. Food Chem.** 52(5): 1263-1268.
- Smit, B. A., Engels, W. J. M., and Smit, G. (2009). Branched chain aldehydes: production and breakdown pathways and relevance for flavour in foods. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 81: 987-999.

- Smit, G., Smit, B. A., and Engels, W. J. M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS. Microbiol.** 29: 591-610.
- Tanasupawat, S. and Komagata, K. (1995). Lactic acid bacteria in fermented foods in Thailand. **World J. Micro. Biotech.** 11: 253-256.
- Taylor, S.L. (1986). Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. **Crit. Rev. Toxicol.** 17: 91-128.
- Thongsanit, J., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., and Jitkavanich, S. (2002). Characterization and identification of *Tetragenococcus halophilus* and *Tetragenococcus muriaticus* strains from fish sauce (Nam-pla). **Japan J. Lactic Acid Bact.** 13(1): 46-52.
- Thongthai, C., and Suintanalert, P. (1991). Halophiles in thai fish sauce (Nam pla). **General and applied aspects of halophilic microorganism.** New York: Plenum Press.
- Thongthai, C., McGenity, T. J., Suintanalert, P., and Grant, W. D. (1992). Isolation and characterization of an extremely halophilic archaeobacterium from fermented Thai fish sauce (Nam pla). **Lett. Appl. Microbiol.** 14: 111-114.
- Thongsanit, J. (1999). **DNA-DNA hybridization in the identification of *Tetragenococcus* species isolated from fish sauce fermentation**, Master Thesis, Chulalongkorn University, Bangkok.
- Tungkawachara, S., Park, J. W., and Choi, Y. J. (2003). Biochemical properties and consumer acceptance of pacific whiting fish sauce. **J. Food Sci.** 68 (3): 855-860.
- Udomsil, N. (2008). **Role of Lactic Acid Bacteria on Chemical Compositions of Fish Sauce.** Master thesis. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima.
- Udomsil, N., Rodtong, S., Tanasupawat, S., and Yongsawatdigul, J. (2010). Proteinase-producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds. **Int. J. Food Microbiol.** 141(3): 186-194.
- Vassu, T., Smarandache, D., Stoica, I., Sasarman, E., Fologea, D., Musat, F., Csutak, O., Nohit, A., Iftime, O., and Gherasim, R. (2002). Biochemical and genetic characterization of *Lactobacillus Plantarum* cmgb-1 strain used as probiotic. **Biotechnol. Lett.** 7: 585-598.
- Villalba-Villalba, A.G., Pacheco-Aguilar, R., Ramirez-Suarez, J.C., Valenzuela-Soto, E.M., Castillo-Yanez, F.J., and Ma'riquez-Ri'os, E. (2011). Partial characterization of alkaline proteases from

- viscera of vermiculated sailfin catfish *Pterygoplichthys disjunctivus* Weber, 1991. **Fish Sci.** 77: 697–705.
- Villar, M., Ruiz-Holgado, A. P., Sanchez, J. J., Trucco, R. E., and Oliver, G. (1985). Isolation and characterization of *Pediococcus halophilus* from salted anchovies (*Engraulis anchoita*). **Appl. Environ. Microbiol.** 49: 664-666.
- Vissesanguan, W., Benjakul, S., and An, H. (2003). Purification and characterization of cathepsin L in arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). **Comp. Biochem. Physiol.** 134B: 477-487.
- Vo Van, T., Kusakabe, I., and Murakami, K. (1984). The aminopeptidase activity in fish sauce. **Agric. Biol. Chem.** 48: 525-527.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol.** 173: 697-703.
- Weng, W.Y., Hamaguchi, P.Y. Osako, K., and Tanaka, M. (2007). Effect of endogenous acid proteinases on the properties of edible films prepared from Alaska pollack surimi. **Food Chem.** 105: 996–1002.
- Yamashita, M. and Konagaya, S. (1990). Purification and characterization of cathepsin B from white muscle of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). **Comp. Biochem. Physiol.** 96B: 733-737.
- Yaqin Hu, Katsuji Morioka and Yoshiaki Itoh. 2007. Existence of Cathepsin L and its Characterization in Red Bulleye Surimi. **Pakistan J. Biol.Sci.** 10(1): 78-83.
- Yongsawatdigul, J., Choi, Y.S., and Udomporn, S. (2004). Biogenic amines formation in fish sauce prepared from fresh and temperature-abused Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). **J. Food Sci.** 69(4): FCT312-319.
- Yongsawatdigul, J., Rodtong, S., and Raksakulthai, N. (2007). Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter cultures. **J. Food Sci.** 72(9): 382-390.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ก. สารละลายและสีย้อม

1. Acetone alcohol

Alcohol (95%)	700.0	มิลลิลิตร
Acetone	300.0	มิลลิลิตร

ผสมสารที่เป็นส่วนประกอบให้เข้ากัน

2. Crystal violet (Gram stain)

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethanol (95%)	20.0	กรัม

ละลายให้เข้ากัน แล้วจึงเติม

Ammonium oxalate (1% Aqueous solution)	80.0	มิลลิลิตร
--	------	-----------

3. Hydrogen peroxide (3% solution)

Hydrogen peroxide	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

4. Iodine solution (Gram's iodine)

Iodine*	1.0	กรัม
Potassium iodide*	2.0	กรัม

*ละลายสารทั้งสองชนิดในน้ำ โดยค่อยๆ เติมน้ำทีละน้อยจนกระทั่ง Iodine ละลายหมด เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 300.0 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

5. Safranin (Gram stain)

Safranin O (2.5% solution ใน 95% Ethanol)	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	90.0	มิลลิลิตร

ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนใช้ทุกครั้ง

6. Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (1%)

Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลาย Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร

สุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตรใน Volumetric flask เก็บไว้ในขวดสีชา

7. Tris-Borate buffer

Tris-Base	10.77	กรัม
EDTA (di-Sodium salt)	0.93	กรัม
Boric acid	5.54	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

8. SDS (10% w/v)

Sodium dodecylsulfate (SDS)	100.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

9. TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)

Tris-HCl	0.79	กรัม
EDTA (di-Sodium salt)	0.37	กรัม
Boric acid	5.54	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

10. Turbidity standard

1% Barium chloride

1% Sulfuric acid

เตรียม McFarland nephelometer scale ดังนี้

McFarland tube no.	Sulfuric acid 1% aqueous solution (มิลลิลิตร)	Barium chloride 1% aqueous solution (มิลลิลิตร)	Corresponding density of bacteria (10^6)
1	9.9	0.1	300
5	9.5	0.5	1500

ข. อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

1. GYT medium

Glycerol	10.0	กรัม
Yeast extract	1.25	กรัม
Tryptone	2.5	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อนช่วย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 15 นาที

2. Luria-Bertani broth (LB broth)

Tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อนช่วย นึ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส
เป็นเวลา 15 นาที

3. Luria-Bertani agar (LB agar)

เตรียมได้จาก LB broth ที่เติม Agar 15.0 กรัมต่อลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. JCM 168 broth

Casamino acids (Peptone 5, GIBCO หรือ Acidicase, BBL หรือ L41, Oxoid)	5.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Sodium glutamate	1.0	กรัม
tri-Sodium citrate	3.0	กรัม
Potassium chloride	2.0	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20.0	กรัม
Sodium chloride	250.0	กรัม
FeCl ₂ ·4H ₂ O	36.0	มิลลิกรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.36	มิลลิกรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0 ± 0.2

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อนช่วย นึ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. JCM 168 Medium

ส่วนประกอบและวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับ JCM 168 broth และเติม Agar 20 กรัมต่อลิตร

6. Plate count agar (PCA)

Tryptone	5.0 กรัม
Yeast extract	2.5 กรัม
Dextrose	1.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000 มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น นำไปให้ความร้อนเพื่อให้ Agar หลอมละลาย ปรับ pH สุดท้ายเท่ากับ 7.0 ± 0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หรืออาหารสำเร็จ Himedia (HIMEDIA LABORATORIES. PVT. LTD., India)

7. MRS broth

MRS broth เป็นอาหารสำเร็จ จากบริษัท Merck (Merck KGaA, Germany) มีการดัดแปลงโดยเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 5 และ 10% ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. MRS agar

เตรียมได้จาก MRS broth ที่เติม Agar 15.0 กรัมต่อลิตร และมีการดัดแปลงโดยเติม 5 และ 10% NaCl และอาจเติม 1% CaCO_3 หลอมให้ Agar ละลายด้วยความร้อน ทำให้ปลอดเชื้อด้วยความร้อนขึ้นที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. Rogosa agar ที่เติม 1% Soluble starch หรือ 1% Tween 80 เพื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์

Amylase หรือ Lipase ดัดแปลงจาก Rogosa SL agar (Atlas, 2004)

Tryptone	5.0 หรือ 10.0 กรัม
K_2HPO_4	6.0 กรัม
Yeast extract	3.0 กรัม
tri-Ammonium citrate	1.0 กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.57 กรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.12 กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.03 กรัม
Soluble starch หรือ Tween 80	10.0 กรัม

Agar	15.0 กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000 มิลลิลิตร

pH 7.0 ± 0.2

ละลายส่วนประกอบเข้าด้วยกัน ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. Rogosa agar ที่เติม 1% Skim milk เพื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์ Proteinase ตัดแปลงจาก

Rogosa SL agar (Atlas, 2004)

1) Rogosa agar:

K_2HPO_4	6.0 กรัม
Yeast extract	4.0 กรัม
tri-Ammonium citrate	1.0 กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.57 กรัม
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.12 กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.03 กรัม
Glucose	10.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	900.0 มิลลิลิตร

pH 7.0 ± 0.2

ละลายส่วนประกอบเข้าด้วยกัน ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2) Reconstituted skim milk (10% solids) 100.0 มิลลิลิตร

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ผสม Reconstituted skim milk (10% solids) กับ Rogosa agar ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

11. Skim milk broth (ที่เติม 25% NaCl)

1) Standard methods agar:

Tryptone	5.0 กรัม
Sodium chloride	250.0 กรัม
Yeast extract	2.5 กรัม
Dextrose หรือ Glucose	1.0 กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	900.0 มิลลิลิตร

pH 7.0 ± 0.2

ละลายส่วนประกอบโดยใช้ความร้อน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2) Reconstituted skim milk (10% solids) 100.0 มิลลิลิตร

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ผสม Reconstituted skim milk (10% solids) กับ Standard methods agar ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

12. Skim milk agar (ที่เติม 25% NaCl)

ส่วนประกอบและการเตรียมเช่นเดียวกับ Skim milk broth และเติม Agar 20 กรัมต่อลิตร

13. Skim milk salt agar

1) Salt solution

MgSO ₄ .H ₂ O	10.0	กรัม
KNO ₃	2.0	กรัม
Sodium chloride	250.0	กรัม
Ferric citrate	trace	
Neopeptone	5.0	กรัม
Glycerol	10.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	900.0	มิลลิลิตร

pH 7.0 ± 0.2

ละลายส่วนประกอบโดยใช้ความร้อน นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2) Reconstituted skim milk (10% solids) 100.0 มิลลิลิตร

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ผสม Reconstituted skim milk (10% solids) กับ Salt solution ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

14. Skim milk salt broth

ส่วนประกอบและวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับ Skim milk salt agar ยกเว้น ไม่เติม Agar

ภาคผนวก ข
แบบทดสอบทางประสาทสัมผัสน้ำปลา
QDA

ชื่อผู้ทดสอบ.....

รหัสตัวอย่าง.....

วัน

กรุณา ประเมินตัวอย่างตามคุณลักษณะที่กำหนดโดยการดูสี คมกลิ่น และชิมตัวอย่าง แล้วขีดเส้นให้ระดับตามคุณลักษณะของตัวอย่างที่ประเมินได้

ลักษณะปรากฏ

1. สี

เหลืองอ่อน ----- น้ำตาลแดงอมดำ

2. ความใส

ขุ่น ----- ใส

กลิ่น

1. กลิ่นคาวปลา

น้อย ----- มาก

2. กลิ่นทะเล

น้อย ----- มาก

3. กลิ่นน้ำปลา

น้อย ----- มาก

รส

1. รสเค็ม

น้อย ----- มาก

2. รสขม

น้อย ----- มาก

3. รสร้อย

น้อย ----- มาก

ข้อเสนอแนะ _____

ผู้ทดสอบ.....

วันที่.....

กรุณา ดูลีตมกลิ่นและชิมตัวอย่างแล้วให้คะแนนความชอบตัวอย่างตามลำดับ

1. สี	ไม่ชอบมากที่สุด	1	2. กลิ่น	ไม่ชอบมากที่สุด	1
	ไม่ชอบมาก	2		ไม่ชอบมาก	2
	ไม่ชอบ	3		ไม่ชอบ	3
	เฉยๆ	4		เฉยๆ	4
	ชอบเล็กน้อย	5		ชอบเล็กน้อย	5
	ชอบมาก	6		ชอบมาก	6
	ชอบมากที่สุด	7		ชอบมากที่สุด	7
3. รสชาติ	ไม่ชอบมากที่สุด	1	4. ความชอบโดยรวม	ไม่ชอบมากที่สุด	1
	ไม่ชอบมาก	2		ไม่ชอบมาก	2
	ไม่ชอบ	3		ไม่ชอบ	3
	เฉยๆ	4		เฉยๆ	4
	ชอบเล็กน้อย	5		ชอบเล็กน้อย	5
	ชอบมาก	6		ชอบมาก	6
	ชอบมากที่สุด	7		ชอบมากที่สุด	7

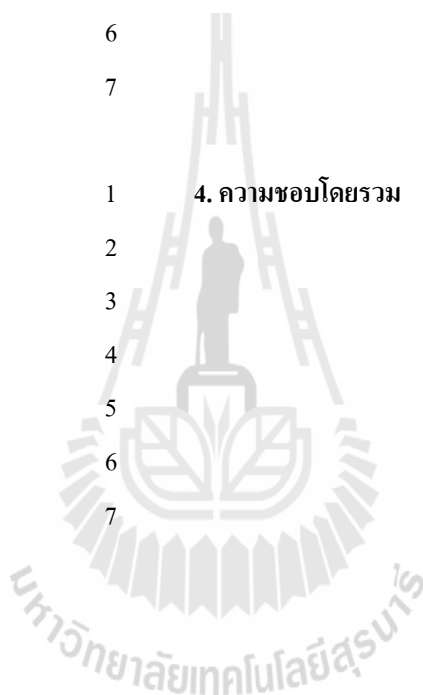
ตัวอย่าง.....

1. สี

2. กลิ่น

3. รสชาติ

4. ความชอบโดยรวม



ภาคผนวก ค

ตารางที่ ค1 ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ในรูปปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α -Amino group content) ในตัวอย่างปลากะตักที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อต้มที่อุณหภูมิ 35, 50 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆ

NaCl content (%)	Incubation time (h)	TCA soluble-oligopeptide (mmol/g.sample)		
		35 (°C)	50 (°C)	65 (°C)
0	0	0.64±0.04	0.58±0.03	0.4±0.05
	2	0.86±0.03	1.65±0.08	2.13±0.10
	4	0.97±0.04	2.28±0.03	2.89±0.09
	8	1.63±0.05	-	3.44±0.04
	12	-	-	3.90±0.13
	24	-	-	4.37±0.05
	36	-	-	5.05±0.05
	48	-	-	5.32±0.17
	72	-	-	5.53±0.15
	96	-	-	6.05±0.13
	120	-	-	6.38±0.22
5	0	0.49±0.01	0.51±0.00	0.27±0.01
	2	0.61±0.02	1.20±0.08	1.26±0.06
	4	0.76±0.01	1.83±0.03	1.38±0.04
	8	0.94±0.01	2.98±0.10	1.83±0.02
	12	1.82±0.02	3.41±0.07	2.25±0.11
	24	-	4.23±0.08	2.33±0.15
	36	-	4.62±0.06	2.63±0.01
	48	-	5.03±0.02	2.99±0.14
	72	-	6.45±0.03	3.32±0.01
	96	-	7.97±0.38	3.78±0.28
	120	-	9.18±0.44	4.18±0.27

ตารางที่ ค1 (ต่อ)

NaCl content (%)	Incubation time (h)	TCA soluble-oligopeptide (mmol/g.sample)		
		35 (°C)	50 (°C)	65 (°C)
10	0	0.47±0.01	0.38±0.01	0.31±0.01
	2	0.52±0.00	0.87±0.04	0.90±0.07
	4	0.64±0.01	1.62±0.06	1.38±0.09
	8	0.87±0.02	2.33±0.02	1.77±0.11
	12	1.11±0.03	2.63±0.00	2.05±0.01
	24	1.90±0.02	3.77±0.12	2.48±0.02
	36	3.59±0.08	4.02±0.06	2.72±0.17
	48	4.33±0.05	4.40±0.23	3.19±0.04
	72	5.23±0.16	4.92±0.18	3.07±0.02
	96	5.71±0.25	6.02±0.31	3.49±0.20
	120	6.01±0.04	7.10±0.09	3.44±0.04
15	0	0.43±0.00	0.34±0.00	0.29±0.01
	2	0.57±0.02	0.78±0.04	0.81±0.02
	4	0.60±0.00	1.12±0.02	1.16±0.06
	8	0.76±0.01	1.79±0.05	1.47±0.03
	12	1.04±0.01	2.21±0.04	1.48±0.00
	24	1.66±0.07	2.74±0.04	1.94±0.18
	36	2.82±0.25	2.95±0.13	1.89±0.01
	48	3.28±0.01	3.74±0.03	2.10±0.07
	72	3.56±0.09	4.28±0.00	3.08±0.12
	96	4.02±0.02	4.66±0.11	3.02±0.01
	120	3.27±0.02	6.45±0.03	3.82±0.04

ตารางที่ ค2 กิจกรรมโปรตีนเอนไซม์ Trypsin-like ในตัวอย่างปลากระตักที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อป้อนที่อุณหภูมิ 35, 50 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆ

NaCl content (%)	Incubation time (h)	Specific activity (Unit/g.sample)		
		35 (°C)	50 (°C)	65 (°C)
0	0	4586.1	7948.5	7573.3
	2	4814.8	7692.1	5975.3
	4	4535.0	5654.9	4478.2
	8	4369.6	-	4298.4
	12	-	-	3728.2
	24	-	-	2268.0
	36	-	-	1356.7
	48	-	-	195.5
	72	-	-	571.2
	96	-	-	0.94
	120	-	-	0.97
5	0	3330.4	5794.0	7861.7
	2	3842.2	5026.5	6750.5
	4	3590.5	5196.8	5990.4
	8	3851.7	4928.0	4967.0
	12	3088.0	4384.0	4052.3
	24	-	4882.0	1449.4
	36	-	4046.8	627.9
	48	-	3916.7	198.4
	72	-	4189.6	346.4
	96	-	4749.8	4.98
	120	-	4954.2	3.43

ตารางที่ ค2 (ต่อ)

NaCl content (%)	Incubation time (h)	Specific activity (Unit/g.sample)		
		35 (°C)	50 (°C)	65 (°C)
10	0	3930.8	7011.7	7376.1
	2	4323.5	8045.2	8099.1
	4	3958.1	6563.9	7097.9
	8	4568.2	7163.6	4972.2
	12	4556.5	5770.6	3003.7
	24	4180.7	6367.8	0.37
	36	3830.4	5612.3	14.37
	48	3463.9	5613.1	3.73
	72	3402.3	5135.7	2.53
	96	3325.0	4317.2	1.88
	120	3751.2	4507.2	1.37
15	0	4925.2	7699.0	9021.2
	2	4476.5	8494.7	8884.5
	4	4967.5	8090.0	8367.7
	8	4490.8	6944.9	2569.0
	12	5175.1	6876.3	736.8
	24	3500.3	5729.4	19.03
	36	3792.9	5580.5	7.98
	48	4025.1	5568.9	3.43
	72	3298.0	3665.7	2.73
	96	4362.8	2106.1	1.61
	120	3815.0	1626.9	1.24

ตารางที่ ค3 กิจกรรมโปรตีนกลุ่ม Chymotrypsin-like ในตัวอย่างปลากะตักที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35, 50 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆ

NaCl content (%)	Incubation time (h)	Specific activity (Unit/g.sample)		
		35 (°C)	50 (°C)	65 (°C)
0	0	29.7	43.8	54.82
	2	35.2	41.4	0.53
	4	33.4	26.7	0.20
	8	30.5	-	0.12
	12	-	-	0.09
	24	-	-	0.04
	36	-	-	0.04
	48	-	-	-
	72	-	-	-
	96	-	-	-
	120	-	-	-
5	0	22.7	44.8	44.33
	2	35.5	48.2	1.89
	4	29.6	39.0	0.51
	8	32.8	24.5	0.28
	12	25.3	18.0	0.24
	24	-	10.9	0.10
	36	-	5.1	0.11
	48	-	4.3	0.06
	72	-	3.1	0.04
	96	-	1.3	0.02
	120	-	1.7	-

ตารางที่ ๓ (ต่อ)

NaCl content (%)	Incubation time (h)	Specific activity (Unit/g.sample)		
		35 (°C)	50 (°C)	65 (°C)
10	0	37.7	68.2	52.26
	2	45.3	62.0	14.67
	4	40.8	53.6	3.49
	8	41.6	35.4	7.39
	12	43.4	29.9	0.36
	24	35.2	23.0	0.19
	36	24.6	11.2	0.11
	48	26.0	8.3	0.08
	72	19.2	3.9	0.03
	96	21.0	1.0	0.03
	120	18.1	0.8	0.00
15	0	41.8	75.8	69.28
	2	46.9	74.2	18.88
	4	44.8	65.5	6.96
	8	43.8	46.5	1.06
	12	44.8	49.4	1.01
	24	41.8	28.1	0.14
	36	29.7	14.5	0.09
	48	34.3	9.5	0.06
	72	22.0	3.1	0.06
	96	25.5	1.3	0.03
	120	31.9	1.0	0.03

ตารางที่ ค4 กิจกรรมโปรตีนเอนไซม์ Cathepsin L-like ในตัวอย่างปลากระดุกที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35, 50 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆ

NaCl content (%)	Incubation time (h)	Specific activity (Unit/g.sample)		
		35 (°C)	50 (°C)	65 (°C)
0	0	18.8	20.1	20.74
	2	16.3	13.0	5.72
	4	16.8	12.0	4.55
	8	14.7	-	3.21
	12	-	-	2.33
	24	-	-	0.45
	36	-	-	0.31
	48	-	-	0.22
	72	-	-	0.21
	96	-	-	0.09
	120	-	-	0.13
5	0	13.2	19.3	17.10
	2	14.0	15.2	1.14
	4	12.7	13.0	0.94
	8	12.9	10.1	0.86
	12	11.5	9.0	0.74
	24	-	9.1	0.27
	36	-	8.5	0.21
	48	-	8.8	0.16
	72	-	8.0	0.11
	96	-	8.5	0.12
	120	-	9.0	0.08

ตารางที่ ค4 (ต่อ)

NaCl content (%)	Incubation time (h)	Specific activity (Unit/g.sample)		
		35 (°C)	50 (°C)	65 (°C)
10	0	14.6	24.5	16.31
	2	16.7	22.8	1.32
	4	16.0	13.1	0.99
	8	15.1	10.5	0.79
	12	16.4	11.9	0.68
	24	14.4	10.2	0.25
	36	12.4	11.0	0.16
	48	12.9	10.0	0.10
	72	11.7	7.7	0.06
	96	12.6	6.5	0.04
	120	11.9	6.6	0.04
15	0	17.4	31.5	16.63
	2	16.4	17.6	4.68
	4	15.3	15.7	1.11
	8	14.9	12.3	0.75
	12	15.7	12.3	0.57
	24	14.6	11.8	0.23
	36	13.8	7.5	0.18
	48	12.1	8.3	0.12
	72	10.5	5.4	0.09
	96	12.9	4.1	0.04
	120	11.5	5.4	0.06

ตารางที่ ค5 กิจกรรมโปรตีนสกลุ่ม Lucine aminopeptidase ในตัวอย่างปลากระดักที่เติมเกลือโซเดียม-คลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35, 50 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆ

NaCl content (%)	Incubation time (h)	Specific activity (Unit/g.sample)		
		35 (°C)	50 (°C)	65 (°C)
0	0	0.186	0.1612	0.182
	2	0.159	0.1487	0.056
	4	0.160	0.1626	0.013
	8	0.150	-	0.007
	12	-	-	0.007
	24	-	-	0.005
	36	-	-	0.005
	48	-	-	0.006
	72	-	-	0.006
	96	-	-	0.005
	120	-	-	0.005
5	0	0.110	0.1304	0.135
	2	0.140	0.1504	0.022
	4	0.115	0.1630	0.009
	8	0.149	0.1585	0.009
	12	0.128	0.1487	0.010
	24	-	0.1050	0.007
	36	-	0.0551	0.008
	48	-	0.0436	0.007
	72	-	0.0298	0.005
	96	-	0.0313	0.005
	120	-	0.0225	0.005

ตารางที่ ค5 (ต่อ)

NaCl content (%)	Incubation time (h)	Specific activity (Unit/g.sample)		
		35 (°C)	50 (°C)	65 (°C)
10	0	0.129	0.1356	0.129
	2	0.156	0.1645	0.011
	4	0.156	0.1800	0.009
	8	0.167	0.1656	0.006
	12	0.182	0.1476	0.007
	24	0.170	0.0741	0.007
	36	0.186	0.0416	0.005
	48	0.184	0.0306	0.006
	72	0.176	0.0220	0.006
	96	0.177	0.0268	0.005
	120	0.126	0.0212	0.004
15	0	0.159	0.1378	0.157
	2	0.148	0.1721	0.010
	4	0.160	0.1777	0.010
	8	0.149	0.1421	0.007
	12	0.170	0.1087	0.008
	24	0.166	0.0514	0.006
	36	0.175	0.0259	0.006
	48	0.190	0.0272	0.005
	72	0.182	0.0192	0.005
	96	0.132	0.0151	0.004
	120	0.133	0.0187	0.003



ประวัติผู้วิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติหัวหน้าโครงการ

- ชื่อ(ภาษาไทย) นาย จิรวัดน์ นามสกุล ขงสวัสดิกุล
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Jirawat Yongsawatdigul
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 3101200691826
- ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
- หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
สาขาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทร 044-22-4359 โทรสาร 044-224-387
E-mail: jirawat@ccs.sut.ac.th
- ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	อักษรย่อ	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันศึกษา	ประเทศ
2532	ปริญญาตรี	วท.บ.(วิทยา ศาสตร์บัณฑิต) เกียรตินิยมอันดับ 2	เทคโนโลยี อาหาร	เทคโนโลยี อาหาร	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	ไทย
2535	ปริญญาโท	M.S. (Master of Science)	Food Science Food Science	Food processing	University of Wisconsin-Madison	สหรัฐอเมริกา
2539	ปริญญาเอก	Ph.D. (Doctor of Philosophy)	and Technology	Seafood chemistry	Oregon State University	สหรัฐอเมริกา

- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
-Food proteins, Food enzymes
- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพใน
การทำงานวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละ
ข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น
 - ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย -
 - หัวหน้าโครงการวิจัย :
- Factors affecting histamine in fish sauce fermentation

2. Proteinases and transglutaminase activity in freshwater fish species
3. Reduction of biogenic amines content during fish sauce fermentation
4. Influence of freshness quality and actomyosin denaturation on gel-forming ability of threadfin bream (*Nemipterus* spp.) muscle proteins
5. Purification and characterization of transglutaminase from Tilapia (*Oreochromis niloticus*)
6. Covalent cross-linking of threadfin bream muscle proteins by transglutaminase(s)
7. Inhibition of proteolysis and application of microbial transglutaminase in lizardfish surimi
8. Process development of fish ball and fish sausage from freshwater fish species
9. Biogenic amine formation in anchovies and fermented fish products
10. Acceleration of fish sauce production using starter cultures and proteinases
11. Study in catalytic reaction of transglutaminase in threadfin bream surimi using MALDI-TOF
12. Conformation changes of muscle proteins from tropical fish species.

7.2 ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

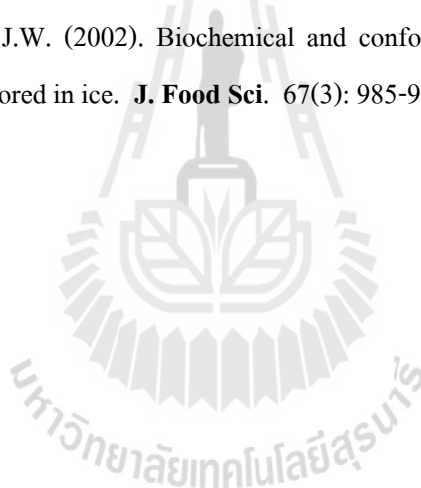
- Yongsawatdigul, J., Pivisan, S., Wongngam, W., and Benjakul, S. (2012). Gelation characteristics of mince and washed mince from small scale mud carp and common carp. **J. Aquat. Food Prod. Tech.** In press.
- Wiriyapan, A., Chitsomboon, B., and Yongsawatdigul, J. (2012). Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. **Food Chem.** 132:104–111.
- Udomsil, N., Rodtong, S., Choi, Y.J., Hua, Y., and Yongsawatdigul, J. (2011). The use of *Tetragenococcus halophilus* as a starter culture for flavor improvement in fish sauce fermentation. **J. Agric. Food Chem.** 59(15): 8401-08.
- Piyadhamviboon, P., Wongngam, W., Benjakul, S., and Yongsawatdigul, J. (2011). Antioxidant and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activities of Protein Hydrolysates Prepared from Threadfin bream (*Nemipterus* spp.) Surimi By-products. **J. Aquat. Food Prod.** In press.
- Phrommao, E., Yongsawatdigul, J., Rodtong, S., and Yamabhai M. (2011). A novel subtilase with NaCl-activated and oxidant-stable activity from *Virgibacillus* sp. SK37. **BMC Biotech.** 11:65.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2011). Evidence of cell-associated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. **J. Food Sci.** 76: C413-419.

- Phrommao, E., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2011). Identification of novel halotolerant bacillopeptidase-like proteinases from a moderately halophilic bacterium, *Virgibacillus* sp. SK37. **J. Appl. Micro.** 1: 191-201.
- Udomsil, N., Rodtong, S., Tanasupawat, S., and Yongsawatdigul, J. (2010). Proteinase-producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds. **Int. Food Microbiol.** 141: 186–194.
- Tadpitchayangkoon, P., Park, J., Mayer, S., and Yongsawatdigul, J. (2010). Structural Changes and Dynamic Rheological Properties of Sarcoplasmic Proteins Subjected to pH-Shift Method. **J. Agric. Food Chem.** 58: 4241-4249.
- Tadpitchayangkoon, P., Park, J.W., and Yongsawatdigul, J. (2010). Physicochemical and dynamic rheological properties of fish sarcoplasmic proteins treated at various pHs. **Food Chem.** 121: 1046-1052.
- Yongsawatdigul, J., and Hemung, B. (2010). Structural changes and functional properties of threadfin bream sarcoplasmic proteins subjected to pH-shifting treatments and lyophilization. **J. Food Sci.** 75(3): C251-257.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2010). Purification and Characterization of a Salt-Activated and Organic Solvent-Stable Heterotrimer Proteinase from *Virgibacillus* sp. SK33 Isolated from Thai Fish Sauce. **J. Agric. Food Chem.** 58: 248-256.
- Piyadhamviboon, P., and Yongsawatdigul, J. (2010). Proteinase inhibitory activity of sarcoplasmic proteins from threadfin bream (*Nemipterus* spp.). **J. Sci Food Agric.** 90(2): 291-298.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2010). A NaCl-stable serine proteinase from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from Thai fish sauce. **Food Chem.** 119: 573-579.
- Tadpitchayangkoon, P., and Yongsawatdigul, J. (2009). Comparative study of washing treatments and alkali extraction on gelation characteristics of striped catfish (*Pangasius hypophthalmus*) muscle protein. **J. Food Sci.** 74(3): C284-C291.
- Hemung, B, Li-Chan, E.C.Y., and Yongsawatdigul, J. (2009). Identification of glutaminy sites on β -lactoglobulin for threadfin bream liver and microbial transglutaminase activity by MALDI-TOF mass spectrometry. **Food Chem.** 115: 149-154.

- Piyadhamviboon, P., and Yongsawatdigul, J. (2009). Protein cross-linking ability of sarcoplasmic proteins extracted from threadfin bream. **LWT-Food Sci. Technol.** 42(1): 37-43.
- Hemung, B, Li-Chan, E.C.Y., and Yongsawatdigul, J. (2008). Reactivity of fish and microbial transglutaminases on glutaminyl sites of peptides derived from threadfin bream myosin. **J. Agric. Food Chem.** 56(16): 7510-7516.
- Hemung, B, Li-Chan, E.C.Y., and Yongsawatdigul, J. (2008). Thermal stability of fish natural actomyosin affects reactivity to cross-linking by microbial and fish transglutaminases. **Food Chem.** 111(2): 439-446.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2008). Characterization of Ca^{2+} -activated cell-bound proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 isolated from fish sauce fermentation. **LWT-Food Sci Technol.** 41: 2166-2174.
- Hemung, B., and Yongsawatdigul, J. (2008). Partial purification and characterization of transglutaminase from threadfin bream (*Nemipterus* sp.) liver. **J. Food Biochem.** 32: 182-200.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2008). Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. **Proc. Biochem.** 43: 185-192.
- Park, J.D., Yongsawatdigul, J., Choi, Y.J., and Park, J.W. (2008). Biochemical and conformational changes of myosin purified from Pacific sardine at various pHs. **J. Food Sci.** 73: C191-197.
- Yongsawatdigul, J., Rodtong, S., and Raksakulthai, N. (2007). Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter culture. **J. Food Sci.** 72: M382-M390.
- Panpipat, V, and Yongsawatdigul, J. (2008). Stability of potassium iodide and omega-3 fatty acids in fortified freshwater fish emulsion sausage. **LWT-Food Sci Technol.** 41: 483-492.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2007). NaCl-activated extracellular proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 isolated from fish sauce fermentation. **J. Food Sci.** 72: C264-C269.
- Yongsawatdigul, J. and Piyadhamviboon, P. (2007). Gel enhancing effect and protein cross-linking ability of tilapia sarcoplasmic proteins. **J. Sci Food Agric.** 87: 2810-2816.

- Yongsawatdigul, J., and Sinsuwan, S. (2007). Aggregation and conformational changes of tilapia actomyosin as affected by calcium ion during setting. **Food Hydrocol.** 21: 359-367.
- Sirighan, P., Raksakulthai, N., and Yongsawatdigul, J. (2007). Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). **Food Chem.** 101: 82-89.
- Sirighan, P., Raksakulthai, N., and Yongsawatdigul, J. (2006). Source and changes of proteinase activities of Indian anchovy (*Stolephorus indicus*) during fish sauce fermentation. **J. Sci. Food Agric.** 86(12): 1970-1976.
- Yongsawatdigul, J., Piyadhamviboon, P., and Singchan, K. (2006). Gel-forming ability of small scale mud carp unwashed and washed mince as related to endogenous proteinases and transglutaminase activities. **Eur. Food Res. Technol.** 223(6): 769-774.
- Sirighan, P., Raksakulthai, N., and Yongsawatdigul, J. (2006). Autolytic activity and biochemical characteristics of endogenous proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). **Food Chem.** 98(4): 678-684.
- Kim, Y.S., Yongsawatdigul, J., Park, J., and Thawornchinsombat, S. (2005). Characteristics of sarcoplasmic proteins and their interaction with myofibrillar proteins. **J. Food Biochem.** 29: 517-532.
- Hemung, B., and Yongsawatdigul, J. (2005). Ca^{2+} affects physicochemical and conformational changes of threadfin bream myosin and actin in a setting model. **Food Sci.** 70: C455-460.
- Yongsawatdigul, J., and Piyadhamviboon, P. (2005). Effect of microbial transglutaminase on autolysis and gelation of lizardfish surimi. **J. Sci Food Agric.** 85(9): 1453-1460.
- Worratao, A., and Yongsawatdigul, J. (2005). Purification and characterization of transglutaminase from tropical tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Food Chem.** 93: 651-658.
- Rodtong, S., Nawong, S., and Yongsawatdigul, J. (2005). Histamine accumulation and histamine-forming bacteria in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). **Food Microbiol.** 22(5): 475-482.
- Yongsawatdigul, J., and Park, J.W. (2004). Effect of alkaline and acid solubilization on gelation characteristics of rockfish proteins. **J. Food Sci.** 69(7): C499-505.

- Yongsawatdigul, J., Choi, Y.S., and Udomporn, S. (2004). Biogenic amines formation in fish sauce prepared from fresh and temperature-abused Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). **J. Food Sci.** 69(4): FCT312-319.
- Yongsawatdigul, J., and Piyadhamviboon, P. (2004). Inhibition of autolytic activity of lizardfish surimi by proteinase inhibitors. **Food Chem.** 87: 447-455.
- Yongsawatdigul, J., and Park, J.W. (2003). Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin. **Food Chem.** 83(3): 406-416.
- Worratao, A., and Yongsawatdigul, J. (2003). Cross-linking of actomyosin by crude tilapia (*Oreochromis niloticus*) transglutaminase. **J. Food Biochem.** 27: 35-51.
- Yongsawatdigul, J., Worratao, A., and Park, J. (2002). Effect of endogenous transglutaminase on gelation of threadfin bream surimi. **J. Food Sci.** 67(9): 3258-3263.
- Yongsawatdigul, J., and Park, J.W. (2002). Biochemical and conformation changes of actomyosin from threadfin bream stored in ice. **J. Food Sci.** 67(3): 985-990.



ประวัติผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-สกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุรีลักษณ์ รอดทอง

หน่วยงานที่สังกัดและที่อยู่

สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ 044-22 4297, 044-22 4633 โทรสาร 044-22 4633
e-mail sureelak@sut.ac.th

ประวัติการศึกษา

วท.บ. (ชีววิทยา เลือกจุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ประเทศไทย
วท.ม. (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ประเทศไทย
PGDip. Sc. with Credit (Biotechnology)	University of Otago	New Zealand
Ph.D. (Microbiology)	University of Otago	New Zealand

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญ

พันธุศาสตร์และสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ การหมักของจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและเชื้อรา) และความหลากหลายของชนิดและการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกและเชื้อรา

ผลงานทางวิชาการ

1. ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ
วารสารระดับชาติ จำนวน 17 เรื่อง และวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 25 เรื่อง
2. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ใน Proceedings จำนวน 25 เรื่อง
3. ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับชาติ จำนวน 80 เรื่อง
4. ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 82 เรื่อง
5. สิทธิบัตรที่ยื่นคำขอจดทะเบียน จำนวน 4 คำขอ