นวพร ลาภส่งผล : บทบาทของ *VIRGIBACILLUS* SP. SK37 และโปรติเนสต่อสารให้กลิ่นสำคัญในน้ำปลาภายใต้การลดปริมาณเกลือ และเพปไทด์ต้านออกซิเดชัน (ROLE OF *VIRGIBACILLUS* SP. SK37 AND ITS PROTEINASE ON ODOR-ACTIVE COMPOUNDS OF FISH SAUCE UNDER REDUCED SALT CONTENT AND ANTIOXIDANT PEPTIDES) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล, 233 หน้า.

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อใช้ประโยชน์ *Virgibacillus* sp. SK37 เป็นกล้าเชื้อหมักน้ำปลาภายใต้การเติมเกลือที่ลดลงจากการหมักน้ำปลาปกติ ศึกษาการย่อยของโปรตีนและสารให้กลิ่นสำคัญ รวมถึงศึกษาการผลิตโปรติเนสและประสิทธิภาพของโปรติเนสจาก *Virgibacillus* sp. SK37 ในการผลิตเพปไทด์ต้านออกซิเดชัน

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารให้กลิ่นสำคัญในน้ำปลาไทยด้วยวิธี aroma extract dilution analysis (AEDA) และ static headspace dilution analysis (SHDA) ด้วย gas chromatography-olfactometry (GC-O) และ gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) วิเคราะห์ปริมาณของสารให้กลิ่นสำคัญด้วย stable isotope dilution assays (SIDA) และคำนวณค่า odor activity value (OAV) พบว่า สารให้กลิ่นสำคัญที่แสดงค่า OAV สูงสุด (มากกว่า 500) คือ มีเทนไธออล 2-เมธิลโพรพาแนล 3-เมธิลบิวทาแนล ไดเมธิลไตรซัลไฟด์ 3-เมธิลไทโอโพรพาแนล และกรดบิวทาโนอิค เมื่อทดลองโดยดึงสารเป็นกลุ่มออกจากโมเดลใช้ค่า R-index พบว่าสารระเหยในกลุ่มกรด แอลดีไฮด์ และซัลเฟอร์ มีผลต่อกลิ่นโดยรวมของน้ำปลา

จากการทดลองหมักน้ำปลาด้วยปลากะตักผสมด้วยเกลือที่ความเข้มข้น 10, 15, และ 20 เปอร์เซ็นต์ และเติมกล้าเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 ประมาณ 5 log CFU/มิลลิลิตรพบว่าตัวอย่างปลาที่หมักด้วยเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ เกิดการเน่าเสียเมื่อหมักได้ 7 วัน ส่วนตัวอย่างที่หมักด้วยเกลือ 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ยังคงพบการเจริญของกล้าเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 ตลอดระยะเวลาการหมัก 3 เดือน อย่างไรก็ตามพบว่า *Virgibacillus* sp. SK37 ไม่สามารถช่วยย่อยโปรตีน ที่อัตราส่วนเกลือ 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ แต่การเติมกล้าเชื้อนี้ร่วมกับการลดปริมาณเกลือลงเหลือ 15-20 เปอร์เซ็นต์ มีส่วนช่วยในการเพิ่มกลิ่นมอลต์ (malty) และ/หรือ ช็อกโกแลตดำ (dark chocolate) ซึ่งพิจารณาจากค่า OAVs ของ 2-เมธิลโพรพาแนล 2-เมธิลบิวทาแนล และ 3-เมธิลบิวทาแนล ที่เพิ่มขึ้น

เมื่อศึกษาการใช้ของเสียจากอุตสาหกรรมอาหาร 5 ชนิด คือ กากถั่วเหลือง รำข้าว โปรตีนถั่วเขียว กากปลา และ กากยีสต์ พบว่ากากยีสต์ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสามารถทดแทนการใช้สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเนส

คือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) 7.5 บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน ซึ่งมากกว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์ทางการค้า 1.7 เท่า ผลการทดลองดังกล่าวแสดงถึงศักยภาพของกากยีสต์ในการผลิตโปรติเนสในระดับอุตสาหรรมโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในราคาไม่แพง โปรติเนสจากแบคมีเรียสายพันธุ์นี้มีศักยภาพเทียบกับนิวเทรสในการผลิตเพปไทด์ต้านออกซิเดชันจากโปรตีนถั่วเขียว การทำบริสุทธิ์ของเพปไทด์ถั่วเขียวที่ผ่านการย่อยด้วยโปรติเนสจาก *Virgibacillus* sp. SK37 ด้วยหลักการการแลกเปลี่ยนไอออน และการแยกตามขนาด การวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนด้วยเครื่อง LC-MS/MS พบว่า ตัวอย่างเพปไทด์ที่มีค่าจำเพาะในการต้านออกซิเดชันสูงประกอบไปด้วยเพปไทด์ 4 สาย ซึ่งแต่ละสายมีกรดอะมิโนอาร์จินีนที่ปลายซี (C-termini) นอกจากนี้เพปไทด์เหล่านี้มีความเสถียรต่อการต้านออกซิเดชันที่ pH 4-10 และอุณหภูมิ 25-121 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2555 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

NAWAPORN LAPSONGPHON : ROLE OF *VIRGIBACILLUS* SP. SK37 AND ITS PROTEINASE ON ODOR-ACTIVE COMPOUNDS OF FISH SAUCE UNDER REDUCED SALT CONTENT AND ANTIOXIDANT PEPTIDES. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JIRAWAT YONGSAWATDIGUL, Ph.D., 233 PP.

VIRGIBACILLUS/PROTEINASE/ODOR-ACTIVE COMPOUND/FISH SAUCE/SPENT BREWERY YEAST/ANTIOXIDANT PEPTIDE

Objectives of this study were to utilize *Virgibacillus* sp. SK37 as a starter culture for fish sauce fermentation under reduced salt addition. Protein hydrolysis and odor-active compounds under starter culture inoculation were thoroughly investigated. In addition, production of *Virgibacillus* sp. SK37 proteinase and its efficacy as a processing aid of antioxidant peptides was elucidated.

Qualitative and quantitative analyses of odor-active compounds in Thai fish sauce samples were performed by aroma extract dilution analysis (AEDA), static headspace dilution analysis (SHDA), gas chromatography-olfactometry (GC-O), and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Odor-active compounds were quantified by stable isotope dilution assays (SIDA), and their odor activity values (OAVs) were calculated. Methanethiol, 2-methylpropanal, 3-methylbutanal, dimethyl trisulfide, 3-(methylthio)propanal, and butanoic acid showed the highest OAVs (>500). An Omission experiment using ranking R-index test revealed the importance of acid, aldehyde, and sulfur compounds to the overall odor of the complete model.

Virgibacillus sp. SK37 was inoculated with an approximate viable count of 5

log CFU/mL in anchovies with varied amounts of solar salt of 10, 15, and 20% of the total weight. Samples prepared using 10% salt underwent spoilage after 7 days of fermentation. The viable count of *Virgibacillus* sp. SK37 was found over 3 month period in the samples containing 15 and 20% salt. However, acceleration of protein hydrolysis was not pronounced in inoculated samples at both 15 and 20% salt. *Virgibacillus* sp. SK37, together with salt contents reduced to 15-20%, likely contributed to a stronger malty and/or dark chocolate note based on the higher OAVs of 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, and 3-methylbutanal.

Among the five food industrial wastes investigated, namely soybean pomace, rice bran, mungbean protein, fish sauce sludge, and spent brewery yeast sludge (Ys) for yeast extract replacement, *Virgibacillus* sp. SK37 proteinase was successfully produced from 1% (w/v) Ys. The highest levels of proteinase production obtained from the Ys medium containing 2.5% NaCl, pH 7.5, and incubated at 40°C for 4 days was about 1.7 times higher than the medium containing the commercial yeast extract, showing the potential of industrial scale of proteinase production using the inexpensive medium. Efficacy of this proteinase was comparable to Neutrase to produce mungbean meal hydolysate with antioxidant activities. *Virgibacillus* sp. SK37 proteinase-hydrolyzed mungbean peptides were purified using ultrafiltration, ion exchange, and gel filtration chromatography. The active fractions were characterized using LC-MS/MS, exhibiting the highest specific antioxidant activity which consisted of four peptides containing an arginine residue at their C-termini. These peptides were stable over a wide pH (4-10) and temperature (25-121°C) range.

School of Food Technology Student's Signature_____

Academic Year 2012 Advisor's Signature_____