



รายงานการวิจัย

การใช้โปรตีนที่หลั่งออกนอกเซลล์และตรึงอยู่กับเซลล์จากแบคทีเรีย
ชอบเค็ม/ทนเค็มในกระบวนการหมักน้ำปลา

**Application of extracellular and cell-bound proteinases from
halophilic/halotolerant bacteria in fish sauce fermentation**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การใช้โปรตีนที่หลั่งออกนอกเซลล์และตรึงอยู่กับเซลล์จากแบคทีเรีย
ชอบเค็ม/ทนเค็มในกระบวนการหมักน้ำปลา

**Application of extracellular and cell-bound proteinases from
halophilic/halotolerant bacteria in fish sauce fermentation**

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุรลักษณ์ รอดทอง

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2550-2552

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2556

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือและห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ 1 และ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ และบริษัทอุตสาหกรรมน้ำปลาระยองที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเกลือสมุทร และตัวอย่างปลา ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีความสำคัญสำหรับงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณ คุณศรชัย สีนสุวรรณ คุณนภาพร ลาภส่งผล คุณวาสนา วงศ์งาม คุณศศิธร แก้วเฟือก และคุณสิริัญญา ป้องจันลา ที่ปฏิบัติงานวิจัยและจัดทำรูปเล่มรายงานจนสำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณ คุณศุภกานูจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยจัดทำเอกสารเบิกจ่ายและจัดทำบัญชีด้วยความเรียบร้อย



บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างเดือนแรกของการหมักน้ำปลา มีความสามารถในการย่อยสลายปลากระดูกและเคซีน (Casein) ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10 และ 25 จึงอาจเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพเป็นกล้าเชื้อสำหรับกระบวนการหมักน้ำปลา ซึ่งแนวทางดังกล่าวจะนำไปสู่การพัฒนากระบวนการลดระยะเวลาการหมัก ดังนั้นวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้เพื่อศึกษาแนวทางการผลิตโปรตีนสที่หลั่งออกมาออกเซลล์ (Extracellular proteinase) ของ *Virgibacillus* sp. SK37 โดยใช้ผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหารเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีนส และศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ตรึงอยู่กับเซลล์ (Cell-bound proteinase) ในการหมักน้ำปลา

ผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหารทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ กากถั่วเหลือง รำข้าว โปรตีนถั่วเขียว กากยีสต์ และกากน้ำปลา พบว่ากากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการสร้างโปรตีนสที่หลั่งออกนอกเซลล์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 โดยการใช้กากยีสต์ 1% ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.5% ที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยให้ค่ากิจกรรมสูงกว่าการใช้ยีสต์สกัดทางการค้า (Commercial yeast extract) 1.7 เท่า โปรตีนสที่ตรึงอยู่ที่เซลล์ที่ผลิตจาก *Virgibacillus* sp. SK37 ถูกสกัดโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-มาเลอเตต (Tris-maleate) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ผสมสารละลายกรดเอธิลีนไดเอมีนเตตราอะซิติก (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ไซโมแกรม (Zymogram) ของโปรตีนสที่ตรึงอยู่ที่เซลล์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 โดยใช้เพปไทด์สังเคราะห์เป็นสารตั้งต้นแสดงโมเลกุลขนาด 19 20 22 32 34 และ 44 กิโลดาลตัน โปรตีนสนี้แสดงลักษณะของเอนไซม์สับทิลิซิน (Subtilisin) โดยแสดงกิจกรรมสูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 8 และ 11 กิจกรรมของโปรตีนสที่สกัดได้เพิ่มขึ้น 4 เท่า ที่ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์มากกว่าหรือเท่ากับ 100 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้แคลเซียมคลอไรด์ยังเพิ่มความคงทนต่ออุณหภูมิของโปรตีนสด้วย เอนไซม์แสดงกิจกรรมการย่อยสลายกล้ามเนื้อปลา โปรตีนถั่วเหลืองสกัด และเคซีนทั้งในสภาวะที่ไม่มีและมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 10 และ 25% การเติมแคลเซียมคลอไรด์ในระดับ 0.2% ร่วมกับเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 ในกระบวนการหมักน้ำปลา พบว่ามีการย่อยสลายโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักเพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์จากปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนบ่งชี้ได้ว่า โปรตีนสที่ตรึงอยู่กับเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 อาจเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายโปรตีนปลาในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา

การศึกษาผลของโปรตีนที่ตรึงอยู่ที่เซลล์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 ร่วมกับการลดปริมาณเกลือ หรือ การลดปริมาณเกลือร่วมกับการเพิ่มพีเอชในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาโดยเติมเซลล์ *Virgibacillus* sp. SK37 จำนวน 6 Log CFU/กรัม พบว่าการลดปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในกระบวนการหมักลงจาก 30% เหลือ 15% แต่เพียงอย่างเดียว และการลดปริมาณเกลือลงเหลือ 15% พร้อมกับปรับพีเอชเริ่มต้นให้เป็น 6.8 ไม่มีผลต่อการขยายระยะเวลาการอยู่รอดของกล้าเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 เนื่องจากตรวจพบเชื้อในระยะเวลา 14 วัน ของกระบวนการหมัก จากการสังเกตรูปพรรณสัณฐานของโคโลนีบนอาหาร JCM 168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% แต่การลดเกลือและเพิ่มพีเอชส่งผลให้เกิดแบคทีเรียหลากหลายชนิดมากกว่าตัวอย่างที่เติมเกลือ 30% หลังจาหมักเป็นเวลา 180 วัน ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนของทุกตัวอย่างมีค่า 1046-1162 มิลลิโมลาร์ โดยการลดปริมาณเกลือแต่เพียงอย่างเดียวและการลดปริมาณเกลือร่วมกับการเพิ่มพีเอชเริ่มต้นของกระบวนการหมักมีผลเพิ่มปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนเมื่อเทียบกับการหมักด้วยเกลือ 30% ($P < 0.05$) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของทุกตัวอย่างมีค่า 2.2-2.7% การลดเกลือแต่เพียงอย่างเดียวไม่มีผลต่อปริมาณ ไบโอดีนิคเอมีนของผลิตภัณฑ์แต่การลดเกลือร่วมกับการเพิ่มพีเอชของกระบวนการหมักเป็น 6.8 ส่งผลให้ปริมาณฮีสตามีนและคาตาเวอรินเพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) การหมักน้ำปลาโดยการลดเกลือร่วมกับปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.8 ส่งผลให้เกิดสารระเหยในปริมาณที่สูงโดยเฉพาะ ไดเมทิลไดซัลไฟด์ (Dimethyl disulfide) ซึ่งเป็นสาเหตุของกลิ่นอุจจาระ (Fecal note) ในขณะที่การหมักที่ลดเกลือลง 15% แต่เพียงอย่างเดียว ส่งผลให้ได้น้ำปลาที่มีชนิดและปริมาณสารระเหยใกล้เคียงกับการหมักแบบดั้งเดิมที่มีสัดส่วนของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 30% ($P < 0.05$)

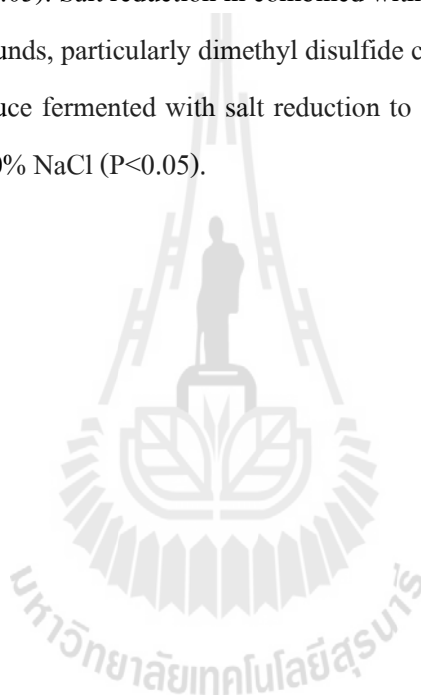
Abstract

Virgibacillus sp. SK37 isolated from fish sauce fermented for 1 month showed high proteolytic activity towards anchovy and casein substrates at 10% and 25% NaCl. It could be the potential strain for starter culture development for reducing fish sauce fermentation time. Overall objective of this research were to elucidate the suitable food industrial byproducts as a part of culture medium and conditions affecting extracellular proteinase production of *Virgibacillus* sp. SK37. In addition, to investigate biochemical characteristics of *Virgibacillus* sp. SK37 cell-bound proteinases and to apply cell-bound proteinase to fish sauce fermentation.

Among 5 food industrial wastes including soybean pomace, rice bran, mungbean protein, spent brewery yeast sludge, and fish sauce sludge, yeast sludge was the best nitrogen source for extracellular proteinase production from *Virgibacillus* sp. SK37. The optimum condition of proteinase production was obtained in the medium containing 1% yeast sludge, 2.5% NaCl, pH 7.5 at 40°C. This was about 1.7 times higher than the commercial yeast extract medium. Cell-bound proteinases from *Virgibacillus* sp. SK 37 were extracted into a free form by incubating the washed cells in 50 mM Tris-maleate (pH 7.0) containing 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) at 37°C for 2 h. Cell-bound proteinases from *Virgibacillus* sp. SK37 revealed molecular mass of 19, 20, 22, 32, 34, and 44 kDa based on a synthetic peptide zymogram. The proteinases showed subtilisin-like serine characteristics with the highest activity at 50 °C and pH 8 and 11. Activity of the extracted proteinases increased ~4 times at ≥ 100 mM CaCl_2 . In addition, CaCl_2 enhanced thermal stability of the extracted proteinases. Enzymes showed proteolytic activity in either the absence or presence of 10 and 25 % NaCl toward fish muscle, soy protein isolate, and casein substrates. Addition of 0.2 % CaCl_2 (w/w) in conjunction with starter culture of *Virgibacillus* sp. SK 37 increased protein hydrolysis as measured by α -amino group content throughout fermentation ($P < 0.05$). Cell-bound proteinases were likely to play an important role in protein hydrolysis during fish sauce fermentation.

The effect of cell-bound proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 together with reduced salt content or reduced salt with increase pH on fish sauce fermentation was investigated by inoculating cell pellets of *Virgibacillus* sp. SK37 of 6 log CFU/g. Salt reduction from 30% to 15% and salt reduction in conjunction with pH adjustment to 6.8 at the beginning of fermentation did not increase

the survivor of *Virgibacillus* sp. SK37 during fermentation as cells were detected within 14 days based on morphological observation on JCM 168 10% NaCl. But salt reduction alone or together with pH adjustment increased diversity of microflora throughout fermentation as compared to sample with 30% NaCl. α -Amino group contents of 180-day-old fish sauce samples were 1046-1162 mM and salt reduction alone and salt reduction along with pH adjustment appeared to increase α -amino group content as compared to the control with 30% NaCl ($P<0.05$). Total nitrogen content of all samples was 2.2-2.7%. Salt reduction alone had no effect on biogenic amine contents of the finished product, but salt reduction along with pH adjustment to 6.8 increased histamine and cadaverine ($P<0.05$). Salt reduction in combined with pH adjustment to 6.8 increased the contents of volatile compounds, particularly dimethyl disulfide contributing to fecal note. While volatile compounds of fish sauce fermented with salt reduction to 15% were comparable to those fermented conventionally at 30% NaCl ($P<0.05$).

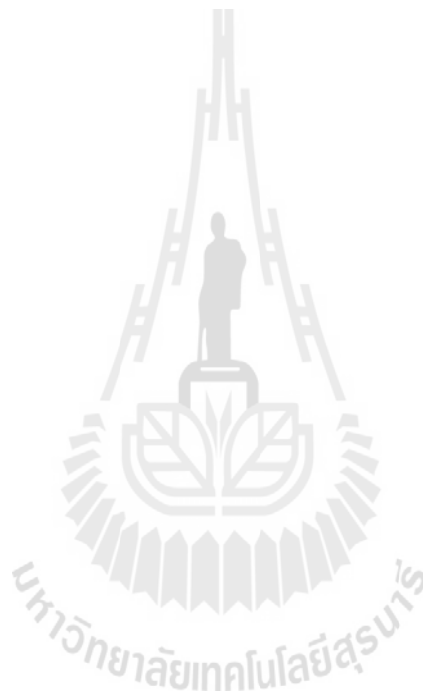


สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อไทย	ข
บทคัดย่ออังกฤษ	ง
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฌ
คำอธิบายสัญลักษณ์	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	2
การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง	3
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	14
ขอบเขตงานวิจัย	14
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	14
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
2.1 วัสดุและสารเคมี	16
2.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK37	16
2.3 การศึกษาทางชีวเคมีของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จากแบคทีเรียที่ชอบเกลือปานกลาง <i>Virgibacillus</i> sp SK37	18
2.4 บทบาทของเอนไซม์โปรตีนสสต่อการย่อยสลายโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา	22
2.5 บทบาทของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ของ <i>Virgibacillus</i> sp. SK37 ในกระบวนการหมักน้ำปลาระดับห้องปฏิบัติการ	23
2.6 วิเคราะห์ผลทางสถิติ	27
บทที่ 3 ผลการวิจัย	
3.1 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK37	29
3.2 ลักษณะทางชีวเคมีของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์	36

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3 บทบาทของโปรตีนสกัดจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK37 ต่อการย่อยปลากะตัก	45
3.4 บทบาทของโปรตีนที่ตรึงอยู่ที่เซลล์ของ <i>Virgibacillus</i> sp. SK37 ต่อกระบวนการหมักน้ำปลาระดับห้องปฏิบัติการ	47
บทที่ 4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	79
เอกสารอ้างอิง	81
ภาคผนวก	93
ประวัติผู้วิจัย	95



สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ลักษณะและสมบัติบางประการของ <i>Virgibacillus</i> sp. บางสายพันธุ์ที่พบในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือสูง	7
1.2	ลักษณะทางชีวเคมีของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จากแบคทีเรีย	11
1.3	คุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรตีนจาก <i>Virgibacillus</i> sp. ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ	13
3.1	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen) และปริมาณเกลือของยีสต์สกัดทางการค้า (Yeast extract) และผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหาร	29
3.2	ผลของสารยับยั้งและอิออนต่อค่ากิจกรรมของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK37	40
3.3	ความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK37	42
3.4	ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α -Amino group) ของน้ำปลาที่เติม <i>Virgibacillus</i> sp. SK37 ที่มีและไม่มีแคลเซียมคลอไรด์ ในระดับ 0.2% โดยน้ำหนัก	46
3.5	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำปลาที่หมักด้วยสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 6 เดือน	71
3.6	ค่าสีในระบบ L* a* และ b* ของตัวอย่างน้ำปลาที่หมักด้วยสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 6 เดือน	72
3.7	ปริมาณ โอจินิกเอมีน (ppm) ของตัวอย่างน้ำปลาหมักที่เติม <i>Virgibacillus</i> sp. SK37 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน	74
3.8	สารระเหยของตัวอย่างน้ำปลา ที่หมักด้วยความเข้มข้นเกลือและค่าพีเอชต่างๆ ร่วมกับการเติม ตะกอนเซลล์ <i>Virgibacillus</i> sp. SK37 เป็นระยะเวลา 6 เดือน	75

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า	
3.1	ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ระดับ 1% (w/v) ต่อกิจกรรมของโปรตีนที่หลั่งออกนอกเซลล์ (A) และการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Virgibacillus</i> sp. SK37 (B)	30
3.2	ผลของปริมาณกากยีสต์ที่ระดับต่างๆ (0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 % (w/v)) ต่อกิจกรรมโปรตีนที่หลั่งออกนอกเซลล์ (A) และการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Virgibacillus</i> sp. SK37 (B)	32
3.3	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของโปรตีนที่หลั่งออกนอกเซลล์ (A) และการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Virgibacillus</i> sp. SK37 (B)	33
3.4	ผลของพีเอชต่อกิจกรรมโปรตีนที่หลั่งออกนอกเซลล์ (A) และการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Virgibacillus</i> sp. SK37 (B)	34
3.5	ผลความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของโปรตีนที่หลั่งออกนอกเซลล์ (A) และการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Virgibacillus</i> sp. SK37 (B)	35
3.6	ไซโมแกรมของเอนไซม์โปรตีนที่สกัดจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK37 โดยใช้เคซีนเป็นสารตั้งต้น (a) และ ใช้ succinyl (Suc)-Ala-Ala-Pro-Phe-7-amino-4-methylcoumarin (AMC) เป็นสารตั้งต้น (b) S คือสารมาตรฐาน C คือ ตัวอย่างควบคุม EDTA คือเอนไซม์โปรตีนที่สกัดด้วยสารละลาย ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 10 mM Ca^{2+} คือ ตัวอย่างที่สกัดด้วยสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 10 mM Extract คือ เอนไซม์โปรตีนสกัด	37
3.7	ไซโมแกรมของการสกัดเอนไซม์โปรตีนจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK37 ด้วยสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ระยะเวลาต่างๆ	38
3.8	อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของโปรตีนที่สกัดจากเซลล์ <i>Virgibacillus</i> sp. SK37	39
3.9	ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรม และความคงทนต่ออุณหภูมิของเอนไซม์โปรตีนจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK37	43
3.10	ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการย่อยสลายโปรตีนปลา โปรตีนถั่วเหลืองสกัด และเคซีน ของโปรตีนสกัดจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK37	44

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.11 การเปลี่ยนแปลงประชากรเชื้อแบคทีเรีย ด้วยเทคนิคการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar (PCA) ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 15% ;Control คือ ปลากระดักไม่เติมเชื้อ <i>Virgibacillus</i> sp. SK37, Control+ CaCl ₂ คือปลากระดักเติมแคลเซียมคลอไรด์ในระดับ 0.2%, Whole cells คือตัวอย่างปลากระดักที่เติมเซลล์ (Whole cell) ของ <i>Virgibacillus</i> sp. SK37, Whole cells + CaCl ₂ คือ ตัวอย่างที่เติมเซลล์ของ <i>Virgibacillus</i> sp. SK37 และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2%	45
3.12 การเปลี่ยนแปลงประชากรในระหว่างการหมักน้ำปลาด้วย <i>Virgibacillus</i> sp. SK37 ตรวจสอบจุลินทรีย์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate JCM 168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10%	48
3.13 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันแรกของ กระบวนการหมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับ 10%	50
3.14 ตัวอย่างลักษณะ โคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 7 ของกระบวนการ หมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับ 10%	51
3.15 ตัวอย่างลักษณะ โคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 14 ของกระบวนการหมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับ 10%	52
3.16 ตัวอย่างลักษณะ โคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 21 กระบวนการหมัก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับ 10% (ไม่พบโคโลนีในตัวอย่างชุดควบคุมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 30% และเกลือโซเดียมคลอไรด์ 30% ที่เติม <i>Virgibacillus</i> sp. SK37)	53
3.17 ตัวอย่างลักษณะ โคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 30 ของกระบวนการหมัก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับ 10% (ไม่พบโคโลนีในตัวอย่างชุดควบคุมเกลือ 30% และตัวอย่างที่เติมเกลือ 30% และ <i>Virgibacillus</i> sp. SK37)	54

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.18 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 60 ของกระบวนการหมัก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับ 10% (ไม่พบโคโลนีในตัวอย่างชุดควบคุมเกลือ 30% และตัวอย่างที่เติมเกลือ 30% และ <i>Virgibacillus</i> sp. SK37)	55
3.19 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาระหว่างในวันที่ 90 ของกระบวนการหมัก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับ 10% (ไม่พบโคโลนีในตัวอย่างชุดควบคุมเกลือ 30% และ ตัวอย่างที่เติมเกลือ 30% และ <i>Virgibacillus</i> sp. SK37)	56
3.20 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 120 ของกระบวนการหมัก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับ 10% (ไม่พบโคโลนีในตัวอย่างชุดควบคุมเกลือ 30% และ ตัวอย่างที่เติมเกลือ 30% และ <i>Virgibacillus</i> sp. SK37)	57
3.21 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาระหว่างในวันที่ 150 ของกระบวนการหมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับ 10% (ไม่พบโคโลนีในตัวอย่างชุดควบคุมเกลือ 30% และ ตัวอย่างที่เติมเกลือ 30% และ <i>Virgibacillus</i> sp. SK37)	58
3.22 การเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ชอบเกลือสูงในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาที่เติม <i>Virgibacillus</i> sp. SK37 ตรวจนับจุลินทรีย์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM 169 ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 25%	59
3.23 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 7 ของกระบวนการหมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM169 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 25%	61
3.24 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 14 กระบวนการหมัก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM169 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 25%	62
3.25 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 21 ของกระบวนการหมัก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM169 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 25%	63

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.26 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 30 ของกระบวนการหมัก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM169 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 25%	64
3.27 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 60 ของกระบวนการหมัก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM169 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 25% (ไม่พบโคโลนีในตัวอย่างชุดควบคุมเกลือ 15%, พีเอช 6.8 และเกลือ 15%, พีเอช 6.8 ที่เติม <i>Virgibacillus</i> sp. SK37)	65
3.28 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 90 ของกระบวนการหมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM169 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 25% (ไม่พบโคโลนีในตัวอย่างชุดควบคุมเกลือ 15%, พีเอช 6.8 และเกลือ 15%, พีเอช 6.8 ที่เติม <i>Virgibacillus</i> sp. SK37)	66
3.29 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 120 ของกระบวนการหมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM169 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 25% (ไม่พบโคโลนีในตัวอย่างชุดควบคุมเกลือ 15%, พีเอช 6.8 และเกลือ 15%, พีเอช 6.8 ที่เติม <i>Virgibacillus</i> sp. SK37)	67
3.30 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนของน้ำปลาในระหว่างกระบวนการหมักเป็นเวลา 6 เดือน	69
3.31 การเปลี่ยนแปลงโอลิโกเปปไทด์ของน้ำปลาในระหว่างกระบวนการหมักเป็นเวลา 6 เดือน	70

คำอธิบายสัญลักษณ์

ANOVA	= Analysis of variance
α	= Alfa
CFU	= Colony forming unit
et al.	= et alia (and others)
mM	= Millimolar
mmol	= Millimole
μmol	= Micromole
%	= Percentage
sp.	= Species
DTT	= Dithiothreitol
E-64	= <i>Trans</i> -epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidine)-butane
EDTA	= Ethylenediaminetetraacetic acid
MW	= Molecular weight
MWCO	= Molecular weight cut-off
PMSF	= Phenylmethanesulfonyl fluorid
SDS-PAGE	= Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TCA	= Trichloroacetic acid
TLCK	= <i>N</i> -Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone
TPCK	= <i>N</i> -Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone
Tris	= Tris(hydroxymethyl)aminomethane
μL	= Microliter
μm	= Micrometer
Ym	= Yeast extract broth
Unit	= Unit activity



บทที่ 1
บทนำ

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตน้ำปลาที่สำคัญของโลก มูลค่าการส่งออกน้ำปลาเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปีจาก 637.6 ล้านบาท ในปี พ.ศ. 2541 เป็น 858 ล้านบาท ในปี พ.ศ. 2550 และคาดว่าจะสูงถึง 1,200 ล้านบาท ในปี พ.ศ. 2554 (www.ops3.moc.go.th) โดยคู่ค้าที่สำคัญได้แก่ สหรัฐอเมริกา ฮองกง ญี่ปุ่น และลาว ซึ่งมีการขยายตัวในปี พ.ศ. 2554 ถึงร้อยละ 5.34 ทั้งนี้เนื่องจากการขยายตัวของธุรกิจร้านอาหารไทย และกระแสความนิยมในอาหารเพื่อสุขภาพของชาวตะวันตก จะเห็นได้ว่าน้ำปลานับเป็นเครื่องปรุงอาหารที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไม่น้อย อย่างไรก็ตามการผลิตน้ำปลายังคงอาศัยกระบวนการหมักตามธรรมชาติ ซึ่งใช้เวลาในการผลิตนานถึง 12-18 เดือนในการผลิตหัวน้ำปลา และต้องใช้เวลาอีกประมาณ 3-4 เดือนหลังจากนั้นเพื่อผลิตน้ำปลาชั้นคุณภาพที่ 2 รวมเบ็ดเสร็จแล้วใช้เวลารวม 2 ปี เพื่อให้ได้น้ำปลาทางการค้า จะเห็นได้ว่าอุตสาหกรรมน้ำปลาขาดการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเพื่อเพิ่มผลผลิต และควบคุมคุณภาพ ซึ่งเป็นจุดอ่อนที่ทำให้อุตสาหกรรมนี้ไม่สามารถเติบโตและเพิ่มผลผลิตได้ตามความต้องการของตลาดทั้งภายในและภายนอกประเทศ หากยังไม่มีการประยุกต์ใช้องค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มผลผลิตและควบคุมคุณภาพของน้ำปลาแล้ว น้ำปลาซึ่งเป็นสินค้าที่แสดงเอกลักษณ์ของความเป็นไทยย่อมจะไม่สามารถแข่งขันในตลาดโลกได้

น้ำปลา คือ ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนปลาในสภาวะที่มีเกลือสูง (25-30%) โดยโปรตีนสจากปลา (Endogenous proteinases) และจากจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในระหว่างกระบวนการหมักซึ่งเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ชอบเค็ม และ/หรือ จุลินทรีย์ทนเค็ม (Halophilic/halotolerant bacteria) เนื่องจากสภาวะที่เกลือความเข้มข้นสูง กิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้มีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นแนวทางในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน คือ การเติมเอนไซม์โปรตีนสทางการค้า ซึ่งมีรายงานว่าคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำปลาที่ได้เทียบเท่ากับการหมักแบบธรรมชาติ และสามารถลดระยะเวลาในการหมักลงได้ (Beddows and Ardeshir, 1979; Raksakulthai et al., 1986; Raksakulthai and Haard, 1992) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงการค้า ทั้งนี้อาจเนื่องจากเอนไซม์โปรตีนสทางการค้ามีราคาแพง

อีกแนวทางหนึ่งคือการใช้โปรตีนสจากจุลินทรีย์ ซึ่งทางคณะผู้วิจัยได้ประสบความสำเร็จในการคัดเลือก จุลินทรีย์ชอบเค็มและทนเค็มจากตัวอย่างน้ำปลาหมักในช่วงระยะเวลาต่างๆ ได้มากกว่า 200 ไอโซเลท โดยในจำนวนนี้มีอยู่ 5 ไอโซเลทที่แสดงกิจกรรมของโปรตีนสที่หลั่งออกนอกเซลล์ และโปรตีนสที่ตรึงอยู่กับเซลล์ในระดับสูงและมีศักยภาพที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเร่งปฏิกิริยา

การย่อยสลายโปรตีนได้ การใช้ประโยชน์จากเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นแนวทางที่น่าสนใจ เนื่องจาก (1) มีต้นทุนที่ถูกกว่าการใช้เอนไซม์ทางการค้าซึ่งต้องนำเข้าจากต่างประเทศ (2) เนื่องจากจุลินทรีย์ชอบเค็ม/ทนเค็ม คัดแยกจากตัวอย่างน้ำปลา เอนไซม์ที่ผลิตได้จึงน่าจะแสดงกิจกรรมได้ในสภาวะเกลือสูงและมีความคงทนต่อเกลือได้ดีกว่าเอนไซม์ทางการค้า (3) เป็นการลดการพึ่งพาเทคโนโลยีจากต่างชาติ อย่างไรก็ตาม การใช้ประโยชน์เอนไซม์โปรตีนจากแบคทีเรียเหล่านี้ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด จำเป็นต้องมียุทธศาสตร์ความรู้เกี่ยวกับคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์เหล่านี้ เช่น อุณหภูมิ พีเอช ความเข้มข้นของเกลือ ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา เป็นต้น นอกจากนี้ยังจะต้องมีความเข้าใจถึงปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างโปรตีนของแบคทีเรียเหล่านี้ เช่น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างโปรตีน และหากสามารถพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แหล่งไนโตรเจนจากวัสดุที่มีในประเทศและราคาถูก เช่น เศษปลาที่เหลือจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล หรือกากปลาที่เหลือทิ้งจากกระบวนการหมักน้ำปลา แทนการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จะทำให้สามารถผลิตกล้าเชื้อและ/หรือเอนไซม์ในต้นทุนที่ถูก และยังเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดอีกทางหนึ่งด้วย ปัจจัยหนึ่งที่ต้องพิจารณาในการใช้ประโยชน์จากโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ คือ ปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรานั้น กล่าวคือ หากกล้าเชื้อที่ใช้มีกิจกรรมของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ กล้าเชื่อนั้นควรสามารถเพิ่มจำนวนได้ดีภายใต้สภาวะการหมัก เพื่อเป็นการเพิ่มกิจกรรมของโปรตีนด้วย นอกจากนี้ ปริมาณกรดอะมิโน โอลิโกเปปไทด์ ปริมาณแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นของเกลือ และสารอาหารอื่นในกระบวนการหมักอาจมีผลต่อการเจริญของกล้าเชื้อที่สร้างโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ด้วย ปัจจัยเหล่านี้ควรมีการควบคุมและปรับเพื่อให้กล้าเชื้อสามารถเจริญได้สูงสุด นอกจากสภาวะที่กล้าเชื้อจะสามารถเจริญได้ดีแล้ว ปัจจัยที่จะต้องพิจารณาคือสภาวะที่โปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์สามารถเร่งกิจกรรมได้ดี องค์ความรู้เกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของกล้าเชื้อและคุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ล้วนแล้วแต่มีความสำคัญที่จะนำไปสู่ประยุกต์ใช้กล้าเชื้อในกระบวนการหมักน้ำปลาอย่างมีประสิทธิภาพ

บททวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

1.1 น้ำปลา

น้ำปลาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากการหมักปลา เป็นของเหลวใส สีน้ำตาล มีรสชาติเค็ม ใช้เป็นเครื่องปรุงรสที่นิยมและรู้จักกันมานาน เป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตในแถบทวีปเอเชีย โดยมีชื่อแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ เช่น ประเทศไทยและลาวเรียกว่า น้ำปลา ประเทศมาเลเซีย เรียกว่า บูดู (Budu) ประเทศอินโดนีเซีย เรียกว่า เคทัจบอิคาน (Ketjabinan) ประเทศเวียดนาม เรียกว่า นอคนัม (Nouc-mam) ประเทศกัมพูชา เรียกว่า ตีคตริย (Teuk-trei) ประเทศญี่ปุ่น เรียกว่า อิชิรุ (Ishiru)

ประเทศพม่า เรียกว่า งามยาयी (Ngam-ya-ye) ประเทศฟิลิปปินส์ เรียกว่า พาทิส (Patis) เป็นต้น (Lapetcharat et al., 2001) ปลาที่นิยมใช้ในการผลิต ได้แก่ปลาไส้ตันหรือปลากระดูก (Stolephorus spp.) โดยนำปลาผสมกับเกลือสมุทรในอัตราส่วน 3:1 บรรจุในถังซีเมนต์ในสภาวะที่มีอากาศแบบจำกัด เป็นเวลาประมาณ 12-18 เดือน ในระหว่างการหมักของเหลวภายในตัวปลาจะซึมออกสู่ภายนอกเซลล์ด้วยผลจากแรงดันออสโมซิส (Osmosis effect) จากนั้นกรองเพื่อแยกส่วนตะกอนออก แล้วนำส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งไว้ให้ตกตะกอนเป็นระยะเวลา 2-12 สัปดาห์ ได้น้ำปลาเกรดเอ หรือเกรดที่ 1 ส่วนกากปลาที่เหลือจากการผลิตน้ำปลาเกรดที่ 1 จะนำมาใช้ผลิตน้ำปลาเกรดรองลงมาโดยการเติมน้ำเกลือ แต่งสีและเติมสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคเพื่อเพิ่มสีและรสชาติ (Lopetcharat et al., 2001) น้ำปลามีลักษณะพิเศษเฉพาะตัว เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก เช่น กลิ่นของน้ำปลาเกิดจากการย่อยโปรตีน โดยเอนไซม์โปรตีนเอสจากตัวปลา และจากแบคทีเรียทำให้ได้เพปไทด์ และอาจถูกย่อยต่อไปได้อีกเป็นเอมีน คีโตเอซิด แอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนไขมันจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ทำให้เกิดกรดไขมันทั้งที่ระเหยได้และระเหยไม่ได้ รวมทั้งสารประกอบคีโตน และอัลดีไฮด์ (Raksakulthai and Haard, 1992; Beddows et al., 1979) น้ำปลาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง ถึงประมาณ 25-30% ดังนั้นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักน้ำปลา เป็นกลุ่มแบคทีเรียชอบเค็มที่สามารถเจริญได้ในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีนและการสร้างสารให้กลิ่นรสที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวในน้ำปลา (Beddows et al., 1979 และ Lopetcharat et al., 2001)

2.1.1 จุลินทรีย์ในกระบวนการหมักน้ำปลา

Thongthai and Suntainalert (1991) ได้แยกจุลินทรีย์ *Halobacterium* จากน้ำปลา และพบว่าเชื่อดังกล่าวสามารถสร้างโปรตีนเอสได้สูง นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *Bacillus* และ *Coryneform* ในน้ำปลาซึ่งสามารถสร้างโปรตีนเอสได้สูงเช่นกัน ต่อมา Thongthai et al. (1992) ได้รายงานการแยก *Halobacterium salinarium* จากน้ำปลาซึ่งเชื่อดังกล่าวสามารถสร้างเอนไซม์โปรตีนเอสที่ยังคงแสดงกิจกรรม (Activity) ที่ความเข้มข้นของเกลือ 4 โมลาร์ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานว่ามีโปรตีนเอสดังกล่าวเป็นประเภทใดและเชื่อดังกล่าวเกิดขึ้นช่วงใดของการหมักน้ำปลา Chaiyanan et al. (1999) แยกแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ *Halobacillus thailandensis* sp. nov. จากน้ำปลาเชื่อดังกล่าวสามารถสร้างโปรตีนเอสกลุ่ม Serine proteinase และ Metalloproteinase ซึ่งคาดว่าเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายโปรตีนในน้ำปลา Porntaveewat et al. (2002) ได้ศึกษาโปรตีนเอสจาก *Halobacterium* ที่แยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา และพบว่าเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Serine proteinase โดยเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์สามารถแสดงกิจกรรมได้สูงสุดที่พีเอช 6.0, 55 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของเกลือ 25% วิไลลักษณ์ (2538) พบว่าการใช้เชื้อ *H. salinarium* ร่วมกับ *S. saprophyticus* และ *B. pantothenicus* ในการหมักน้ำปลา ทำให้ได้ค่าการละลายของโปรตีนสูง นอกจากนี้มีรายงานการพบ

แบคทีเรียในกลุ่มชอบเกลือปานกลาง (Moderately halophilic bacteria) โดยเฉพาะในกลุ่มที่เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง แกรมบวก ใช้ออกซิเจนในการเจริญ (Aerobic) และสร้างสปอร์ Namwong et al. (2005) ได้คัดแยกและระบุสายพันธุ์ใหม่คือ *Lentibacillus juripiscarius* sp. nov. จากน้ำปลา และยังพบ *Lentibacillus salicampi* อีกด้วย นอกจากนี้ *Bacillus* สายพันธุ์ใหม่จากน้ำปลาเวียดนามคือ *B. vietnamensis* sp. nov. (Noguchi et al., 2004) ซึ่งสามารถเจริญได้ที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้นไม่เกิน 15% Hiraga et al. (2005) คัดแยก *Filobacillus* sp. RF2-5 จากน้ำปลาที่ผลิตในประเทศไทย ซึ่งแบคทีเรียนี้สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0-25% โดยเจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 15% และสามารถผลิตโปรตีนเอสในากลุ่มซีรีน (Serine proteinase) ได้ และเป็นโปรตีนเอสที่มีเสถียรภาพที่ความเข้มข้นของเกลือสูง (25%) นอกจากนี้ยังมีการค้นพบ *Staphylococcus* sp. ในน้ำปลาที่หมักจากปลาแมคเคอเรล (Mackerel) ของประเทศญี่ปุ่น และยังพบในน้ำปลาที่ผลิตจากประเทศไทยและเวียดนาม (Fukami et al., 2004b) โดย *Staphylococcus* sp. มีบทบาททำให้น้ำปลามีกลิ่นที่อ่อนลง (Fukami et al., 2004a) นอกจากนี้มีแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ซึ่งพบในน้ำปลาที่หมักกับเกลือสมุทรที่ใช้ในกระบวนการหมักน้ำปลา โดย Nawong (2006) ได้คัดแยกแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำปลาที่หมักในเดือน 1, 3, 5, 7, 9 และ 12 จากตัวอย่างน้ำคาวปลาและเกลือสมุทร ซึ่งพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือสูงถึง 25% นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นก้ำเชื้อเพื่อเร่งกระบวนการของน้ำปลา ได้แก่ *Staphylococcus*, *Virgibacillus*, *Brevibacterium*, *Halomonas*, *Coronebacterium* และ *Bacillus* โดยแบคทีเรียในกลุ่ม *Virgibacillus* sp. SK33 และ SK37 เป็นแบคทีเรียชอบเกลือปานกลาง ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำปลาของไทยที่หมักได้ 1 เดือน เจริญได้ที่ pH ค่อนข้างกว้างในช่วง 5-11 อุณหภูมิ 10-45 องศาเซลเซียส และในสภาวะที่มีเกลือเข้มข้น 0-20% อีกทั้งยังมีศักยภาพในการผลิตโปรตีนเอส ซึ่งโปรตีนเอสที่ได้นั้นถูกกระตุ้นการทำงานโดยเกลือที่มีความเข้มข้นค่อนข้างสูง 20-30% นอกจากนี้โปรตีนเอสที่ผลิตได้ยังมีเสถียรภาพในเกลือที่มีความเข้มข้น 20-30% (Sinsuwan et al., 2007, 2008, 2010a, 2010b, Phrommao et al., 2011) ยิ่งไปกว่านั้น Yongsawatdigul et al., 2007 สามารถนำ *Virgibacillus* sp. SK37 และ *Staphylococcus* sp. SK1-1-5 มาประยุกต์และพัฒนาเป็นก้ำเชื้อสำหรับกระบวนการหมักน้ำปลาเพื่อลดระยะเวลาการหมักให้สั้นลงจาก 12 เดือน เป็น 4 เดือน ได้สำเร็จ จากงานวิจัยดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่สร้างโปรตีนเอสที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลานั้นมีหลากหลายสายพันธุ์

2.2 แบคทีเรียชอบเค็ม

แบคทีเรียชอบเค็ม เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่และปรับตัวให้อยู่รอดในสภาวะแวดล้อมที่มีความเค็มสูง (Ventosa et al., 1998) แบคทีเรียชอบเค็มต้องการเกลือในการเจริญและ

ปริมาณเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญขึ้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารและอุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญ สามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามความเข้มข้นของเกลือที่เจริญได้ดีที่สุดได้แก่ 1) กลุ่มชอบเกลือเล็กน้อย (Slight halophile) เป็นแบคทีเรียที่เจริญในอาหารที่มีเกลือ 0.2–0.85 โมลาร์ หรือ 2–5% 2) แบคทีเรียที่ชอบเกลือปานกลาง (Moderate halophile) แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือ 0.5-2.5 โมลาร์ หรือ 3-15% 3) แบคทีเรียชอบเกลือสูง (Extremal halophile) แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือ 5 โมลาร์ (Oren, 2008) ซึ่งแบคทีเรียชอบเกลือสูงนี้ถูกค้นพบตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 เนื่องจากเกิดขึ้นที่มีสีแดงเป็นบริเวณกว้าง ในบริเวณที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงเนื่องจากการระเหยของน้ำ โดยพบในทะเลสาบ และยังพบแบคทีเรียที่สร้างสารสีแดงในปลาและเครื่องหนัง (Oren, 2003) แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของเกลืออย่างน้อย 15% จนถึงอิ่มตัว และความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 20-25% แต่ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีเกลือ แบคทีเรียกลุ่มนี้มีทั้งรูปร่างเซลล์เป็นท่อน กลม และไม่แน่นอน ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ชอบเกลือสูงมีสีแดงเนื่องจากการสร้างสารแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายจากแสงแดด จึงมักพบแบคทีเรียที่ชอบเกลือสูงนี้ในบริเวณที่มีแสงแดด โดยแสงแดดจะทำให้เกิดการระเหยของน้ำทำให้ความเข้มข้นของเกลือสูงมากจนเกือบอิ่มตัว ในบางครั้งมีการสร้างแวคิวโอลซึ่งสามารถทำหน้าที่เก็บสะสมแก๊ส (Gas vacuoles) ทำให้โคโลนีมีสีชมพูหรือขาว (Oren, 2003)

2.2.1 *Virgibacillus*

Virgibacillus เป็นแบคทีเรียที่ชอบเกลือปานกลาง เจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือเข้มข้น 0-25% *Virgibacillus* มีรูปร่างเป็นท่อน (0.3-0.8 × 2-8 ไมครอน) มีการจัดเรียงเซลล์ทั้งแบบ เซลล์เดี่ยว (Single) จัดเรียงเป็นคู่ (Pair) และ เป็นเรียงต่อกันเป็นสายสั้นๆ (Short chain) ย้อมติดสีแกรมบวก และย้อมติดสีทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Variable) สร้างเอนโดสปอร์ (Endospore) โคโลนีเป็นทรงกลม หรือมีรูปร่างไม่แน่นอน (Circular and slightly irregular) เรียบ (Smooth) เป็นมันวาว (Glossy) ความนูนต่ำ (Low convex) และโปร่งใสเล็กน้อยไปจนถึงทึบแสง (Slightly transparent to opaque) และให้ผลทดสอบบวกในปฏิกิริยา Catalase และ Oxidase เจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน มีปริมาณเบส (G-C) อยู่ที่ 30.7-42.8 mol% มีองค์ประกอบของควิโนน (Quinone) ชนิด เมนาควิโนน-7 (MK-7) เป็นองค์ประกอบหลัก และมี anteiso-C_{15:0} เป็นกรดไขมันหลักของเซลล์ (Heyrman et al., 2003, Chen et al., 2008) ปัจจุบันสายพันธุ์ของ *Virgibacillus* ที่มีการรายงานพบว่ามีทั้งหมด 28 สายพันธุ์ โดยทั่วไปพบได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีความเค็มเช่น ดินเค็ม น้ำทะเล นาเกลือ ทะเลสาบน้ำเค็ม (Chen et al., 2009, Peng et al., 2009, Wang et al., 2008, Carrasco et al., 2009) นอกจากนี้ยังพบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เช่นน้ำปลา (Nawong, 2006) ปลาร้า (Chamroensaksri et al., 2008) อาหารทะเลหมักแบบเกาหลี (Kim et al., 2011) และผลิตภัณฑ์นม (Seiler and Wenning, 2013) ตารางที่ 1.1 แสดงลักษณะและสมบัติของ *Virgibacillus* บางสายพันธุ์ที่พบในสิ่งแวดล้อมที่มีความเค็ม

ตารางที่ 1.1 ลักษณะและสมบัติบางประการของ *Virgibacillus* สายพันธุ์ที่พบในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือสูง

Characteristic	Type culture strain ^d																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Habitat	marine solar saltern	Chigu saltern	salt lake	salt field	saline soil	Dead sea	salt lake	solar saltern	Thai fermented fish	salt lake	saline lake	subsurface saline soil	marine solar saltern	marine solar saltern	salt-fermented seafood	permafrost core (Canadian high Arctic)	salt lake	sea water
Spore shape ^a	E	S, E	E, S	E	E, S	E	E, S	E	E	E, S	E	E, S	S	S, O	E	E	E	E, S
Spore position ^b	S, T	T, S	T	T	T	S	S	C, S, T	S	T, S	S, T	T	T	T	T, S	C, S	S	T
Gram stain	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	v	+	+	+	+
Colony pigmentation	-	-	-	-	Cream	-	White	-	Red	Cream	Cream	-	-	-	Cream	Light pink	-	Cream
Anaerobic growth	+	+	-	+	ND	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	ND
Growth in the presence of:																		
0.5 % NaCl	v (-)	+	+	w	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
25 % NaCl	v (+)	+	+	-	+	-	+	w	-	-	-	+	-	-	+	-	-	
pH 10	-	-	+	-	+		+	+	-	-	+	-	-		+	-	+	
Growth temperature (°C)	10-45	15-55	10-50	10-45	10-45	15-50	10-15	15-45	15-40	8-52	10-40	10-50	15-40	4-45	4-40	0-30	10-55	10-45
Nitrate reduction	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	ND	ND	ND	+	+	+
Hydrolysis of:																		
Aesculin	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	ND	ND	+	+
Casein	+	+	-	+	-	+	+	+	w	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Gelatin	+	+	-	-	+	+	w	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Strach	-	+	+	ND	-	ND	-	ND	+	-	-	-	ND	+	-	ND	-	-
Growth on:																		
D-Glucose	+	+	+	ND	+	+	ND	w	ND	+	-	+	+	-	ND	+	+	+
D-Fructose	+	v (+)	-	ND	+	+	+	+	ND	+	-	+	-	ND	ND	ND	-	-
Sucrose	+	+	-	ND	ND	+	ND	+	ND	ND	+	+	-	-	ND	+	-	-

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

Characteristic	Type culture strain ^d																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Acid production from:																		
<i>N</i> -Acetylglucosamine	+	-	-	-	ND	+	+	w	ND	ND	ND	+	ND	ND	+	-	+	ND
D-Galactose	+	+	-	-	+	-	-	w	-	-	+	+	-	ND	-	ND	-	-
D-Glucose	+	+	+	w	+	+	+	w	+	+	+	+	-	-	-	w	+	+
D-Fructose	v	+	-	+	-	+	+	w	-	+	+	+	-	w	-	w	+	-
D-Mannose	+	+	-	-	+	+	+	w	-	-	-	-	-	-	-	w	+	-
D-Trehalose	+	-	w	w	-	-	-	-	-	ND	+	-	-	-	-	+	ND	-
D-Mannitol	+	w	w	-	+	-	-	-	ND	-	-	-	-	ND	ND	+	-	-
Major polar lipids ^c	PG, DPG	PG, DPG,PE, PLs	PG, DPG, PLs	PG, DPG, PLs	PG, DPG	PG, DPG, PE	DPG, PG, PE	PG, DPG	PG, DPG	PG, DPG	PG, DPG	PG, DPG	DPG, PG, PLs	ND	DPG, PG, PE	PG, DPG, PLs	DPG, PG, PE, PLs	PG, DPG
DNA G+C (mol %)	38-39	37.3	41.8	41	40.2	39.0- 42.8	37.3	36.3- 39.5	38	44.5	38.8	37.1	39.5	37.6	37	38.2	40.9	39.5

Note: ND, no data available; w, weakly positive; v, variable; ^aE, Ellipsoidal; S, spherical; O, oval; ^bC, Central; S, subterminal; T, terminal

^cDPG, Diphosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; PG, Phosphatidylglycerol; PLs, unidentified phospholipids

^d1. *V. halodenitrificans* (Yoon et al., 2004), 2. *V. chigensis* (Wang et al., 2008), 3. *V. kekensis* (Chen et al., 2008), 4. *V. koreensis* (Lee et al., 2006), 5. *V. lioralis* (Chen, Liu et al., 2009), 6. *V. marismortui* (Arahal et al., 1999), 7. *V. salaries* (Hua et al., 2008), 8. *V. salexigeus* (Garabito et al., 1997), 9. *V. siammensis* (Tanasupawat et al., 2010), 10. *V. xinjiangensis* (Jeon et al., 2009), 11. *V. salinus* (Carrasco et al., 2009), 12. *V. subterraneus* (Wang et al., 2010), 13. *V. campisalis* (Lee et al., 2011), 14. *V. byunsanensis* (Yoon et al., 2010), 15. *V. alimentarius* (Kim et al., 2011), 16. *V. arcticus* (Niederberger et al., 2009), 17. *V. sediminis* (Chen, Cui et al., 2009), 18. *V. zhanjiangensis* (Peng et al., 2009)

2.3 โปรตีนเอส

โปรตีนเอส (Proteinase) คือกลุ่มเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรไลซิสของโปรตีน ซึ่งสามารถย่อยพันธะเพปไทด์ของสายโปรตีนรวมทั้งพันธะเอไมด์ (Amide) และเอสเทอร์ของกรดอะมิโนทำให้ได้โอลิโกเพปไทด์ ไดเพปไทด์หรือกรดอะมิโน โปรตีนเอสเป็นเอนไซม์ที่ถูกนำมาใช้ในหลากหลายอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมผลิตสารทำความสะอาด อุตสาหกรรมผลิตเพปไทด์ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมนม อุตสาหกรรมการหมัก และอุตสาหกรรมยา (Shimogaki et al., 1991; Rao et al., 1998) โปรตีนเอสสามารถจำแนกประเภทตามตำแหน่งของพันธะเพปไทด์ที่ย่อยสลายได้เป็น 2 ประเภท คือ เอนโดโปรตีนเอส (Endoproteinase) และ เอกโซโปรตีนเอส (Exoproteinase) โดยเอนโดโปรตีนเอสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเพปไทด์ที่อยู่ในสายโปรตีนทำให้เกิดเพปไทด์สายสั้น (Oligopeptide) ในขณะที่เอกโซโปรตีนเอสจะสลายพันธะเพปไทด์ที่อยู่ด้านนอกของสายโปรตีนได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะมิโน (Rawling and Barrett, 1992) โปรตีนเอสสามารถจำแนกออกเป็น 4 ประเภท ตามชนิดของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา (Active site) ได้เป็น โปรตีนเอสซีรีน (Serine) โปรตีนเอสซิสตีอีน (Cysteine) โปรตีนเอสแอสปาติก (Aspartic) และโปรตีนเอสเมทัลโล (Metallo) โปรตีนเอสซีรีนเป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะเพปไทด์ภายในสายโปรตีน (Endoproteinase) โดย catalytic triad ประกอบด้วยซีรีน ฮิสตีดีน และแอสพาเทต นอกจากนี้โปรตีนเอสซีรีนยังถูกยับยั้งโดย 3,4-Dichloro isocoumarin (3,4-DCI), Diisopropylfluoro phosphate (DFP), Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) นอกจากนี้ โปรตีนเอสซีรีนยังสามารถจำแนกออกเป็น 4 กลุ่มย่อย ตามตำแหน่งการตัดพันธะบนสายโปรตีน คือ โปรตีนเอสที่มีสมบัติคล้ายทริปซิน (Trypsin-like serine proteinase) โปรตีนเอสที่มีสมบัติคล้ายไคโมทริปซิน (Chymotrypsin-like proteinase) หรือซับทิลิซิน (Subtilisin-like proteinase) โปรตีนเอสที่ทำหน้าที่คล้ายอีลาสเตส (Elastase-like proteinase) และเมทัลโลซีรีนโปรตีนเอส (Serine metallo proteinase) (Moriyama, 1947) นอกจากนี้สามารถแบ่งประเภทของโปรตีนเอสตามค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาได้ เป็นโปรตีนเอสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาในสภาวะกรด (Acid proteinase) สภาวะที่เป็นกลาง (Neutral proteinase) และสภาวะด่าง (Alkaline proteinase)

โปรตีนเอสที่แสดงกิจกรรมในสภาวะที่เป็นด่างแสดงกิจกรรมได้สูงในช่วง พีเอช 8.1-12.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการแสดงกิจกรรมของโปรตีนเอสกลุ่มนี้คือประมาณ 50-80 องศาเซลเซียส และมีความจำเพาะเจาะจงกับสารตั้งต้นที่หลากหลาย ด้วยเหตุผลนี้ทำให้โปรตีนเอสกลุ่มนี้เหมาะสำหรับอุตสาหกรรมสารชำระล้าง (Detergent) (Roa et al., 1998; Maurer, 2004) เช่น *Bacillus* sp. B001 ผลิตเอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนสูง เอนไซม์แสดงกิจกรรมได้สูงที่ พีเอช 10 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา คือ 60 องศาเซลเซียส (Deng et al., 2010) *B. mojavensis*

A21 ผลิตภัณฑ์โปรตีนซึ่งแสดงกิจกรรมได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมคือ 8.5 นอกจากนี้ *B. clausii* GMBAE 42 ผลิตภัณฑ์โปรตีนซึ่งแสดงกิจกรรมได้สูงที่ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 11.3 (Kazan et al., 2005)

โปรตีนที่แสดงกิจกรรมในสภาวะเป็นกลางแสดงกิจกรรมได้ในช่วงพีเอช ที่แคบ 5.0-8.0 สามารถทนความร้อนได้ต่ำ ส่งผลให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาต่ำ และโปรตีนกลุ่มนี้ยังมีความจำเพาะต่ออะมิโนกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว (Hydrophobic amino acid) ด้วยสมบัติในการทนความร้อนที่ต่ำของโปรตีนกลุ่มนี้จึงสามารถใช้เพื่อควบคุมระดับการย่อยของโปรตีน (Degree of hydrolysis) ซึ่งสามารถทำการปรับอุณหภูมิให้สูงขึ้นเพื่อชะลอหรือหยุดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ (Godfrey and West, 1996) โปรตีนที่แสดงกิจกรรมในสภาวะที่เป็นกลางส่วนใหญ่จัดเป็นซีรีน โปรตีนซึ่งโลหะไม่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยา (Rao et al., 1998) เช่น *B. subtilis* JB1 ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่หลั่งออกนอกเซลล์ พีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา คือ 7.5 (Sung et al., 2010) *B. laterosporus* ผลิตภัณฑ์โปรตีนที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 (Usharani and Muthuraj, 2010)

2.3.1 โปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ (Cell-bound proteinase)

โปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์เป็นเอนไซม์ที่ฝังปลายสายคาร์บอกซิล (C-terminus) อยู่ในส่วนเซลล์ห่อหุ้ม (Cell envelop) และส่วนผิวของแบคทีเรีย (Cell surface) ส่วนห่อหุ้มหมายถึง ส่วนที่ห่อหุ้ม โครงสร้างและองค์ประกอบต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ทั้งหมด ซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือ ไขมันที่มีขั้ว (amphipatic lipids) และ เพปติโดไกลแคน (peptidoglycan) (McKane and Kandel 1985) ซึ่งมีการศึกษาคุณลักษณะของโปรตีนกลุ่มนี้อย่างกว้างขวางในแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ใช้เป็นกัวเชื้อในการผลิตเนยแข็ง โดยพบว่าโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์มีบทบาทสำคัญต่อการผลิตเนยแข็งและผลิตภัณฑ์นมหมักอื่นๆ โดยทั่วไปแล้วโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จะถูกสกัดด้วย กลีโธ การใช้อัตราซาวาน์ การใช้สารลดแรงตึงผิว (Detergent) สภาวะต่าง สารยึดจับโลหะ (Chelating agent) ตัวทำละลายอินทรีย์ และการใช้เอนไซม์ในกลุ่มฟอสโฟไลเปส (Phospholipase) (Scopes 1994; Martín-Hernández et al. 1994) โปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ *Lactobacillus helveticus* L89 ซึ่งมีขนาด 180 กิโลดาลตัน สกัดด้วย Triton x-100 และ Nonidet P40 แต่สำหรับการสกัดโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จาก *Streptococcus thermophilus* CNRZ385 ทำได้โดยการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมไกลซีนเพื่อยับยั้งการสร้างเพปติโดไกลแคนของผนังเซลล์ และใช้ Alumina powder ร่วมกับการใช้ไลโซไซม์ (Fernandez-epla et al., 2000) Fricke et al. (2001) รายงานการสกัดโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จาก *B. cereus* ที่มีขนาด 17 kDa โดยใช้ Sulfobetain SB-12 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิว ในขณะที่ Exterkate และ de Veer (1985) พบว่าโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จาก *Streptococcus cremoris* HP ถูกสกัดได้ง่ายๆ โดยการเขย่าเซลล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที Sinuwana et al. (2011)

รายงานว่โปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จากแบคทีเรียชอบเกลือ *Virgibacillus* sp. SK33 สามารถสกัดออกได้โดยใช้ไลโซโซมเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โปรตีนที่ถูกสกัดส่วนใหญ่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 17, 32 และ 65 กิโลดาลตัน สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ที่สกัดได้คือ 50 องศาเซลเซียส pH 8 และ 11 โปรตีนดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่ม ซีรีนและมีคุณสมบัติคล้ายยับยั้งทีลิซิน (Subtilisin-like) และยังคงแสดงกิจกรรมที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 25% (ตารางที่ 1.2) โปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆมีขนาดโมเลกุลประมาณ 45-180 กิโลดาลตัน ดังแสดงในตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 คุณลักษณะทางชีวเคมีของ โปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จากแบคทีเรีย

Species	Classification	Optimum condition		MW (kDa)	Reference
		pH	Temperature (°C)		
<i>Lactococcus casei</i> NCDO	Serine	7.5	45	-	Ezzat et al. (1998)
	Serine-metallo	7	40	-	
<i>L. casei</i> subsp. Casei IFPL 731	Serine	6	40	150	Fernandez de Palencia et al. (1997)
<i>L. casei</i> NCDO 151	Serine	4.8, 5.6	35-37	36×4	Naes et al. (1991)
<i>L.bugaricus</i> NCDO 1489	Metallo	5.2-5.8	45-50	-	Argyli et al. (1976)
<i>L.delbrueckii</i> subsp. lactis ACA-DC 178	Serine	6	40	-	Tsakalodou et al. (1999)
<i>L.delbrueckii</i> subsp. bulgaricus CNRZ 397	Cysteine	5.5-6	42-45	170	Laloi et al. (1991)
<i>L. helveticus</i> L89	Serine	7	50	180	Martin-Hernandez et al. (1994)
<i>Streptococcus thermophilus</i> CNRZ 385	Serine	7	37	153	Shanbal et al. (1993)
<i>S. thermophilus</i> CNRZ 703	Serrine	7	45	-	Fernandez-Espla et al. (2000)
<i>S.cremoris</i> AC1	Serine	40	5.5-6	145	Geis et al. (1985)
<i>Virgibacillus</i> sp. SK33	Subtilisin-like	50	8, 11	17, 32, 65	Sinsuwan et al. (2011)

สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ส่วนใหญ่คือสภาวะที่มีพีเอชอยู่ในช่วงเป็นกรดถึงกลาง และมีค่า isoelectric point (pI) ในช่วงของความเป็นกรด ความจำเพาะต่อสารตั้งต้นอย่างเคซีนของ โปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์แตกต่างกันตามสายพันธุ์ เช่น โปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จาก *Lactococcus casei* NH14, *L.lactis* subsp. *Lactis* NCDO 763, *Streptococcus cremoris* HP, *S.cremoris* C13 มีความจำเพาะต่อ β -casein (Exterkate and de Veer 1985; Geis et al., 1985; Visser, Exterkate, Slaygen and de Veer 1986; Monnet, Bockelmann, Gripon and Teuber, 1989; Kojic et al., 1991) ในขณะที่โปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จาก *S.cremoris* AM1 และ *S.cremoris* SK11 มีความจำเพาะต่อ α_s -1 β และ K-Casein (Visser et al., 1996) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จากแบคทีเรียชอบเค็มมากนัก

1.4 โปรตีนที่สร้างโดย *Virgibacillus*

แบคทีเรียในกลุ่ม *Virgibacillus* มีความสามารถในการผลิตโปรตีนที่หลั่งออกนอกเซลล์ Rohban และคณะ (2009) ได้แยกแบคทีเรียชอบเกลือปานกลางและชอบเกลือสูงจากทะเลสาบน้ำเค็มซึ่งบางไอโซเลทเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Virgibacillus* ซึ่งสร้างเอนไซม์โปรตีนส นอกจากนั้นมีการรายงานที่แสดงถึงความสามารถในการผลิตโปรตีนของ *Virgibacillus* ดังแสดงในตารางที่ 1.3 Nawong (2006) ได้รายงานการแยกแบคทีเรียกลุ่ม *Virgibacillus* จากกระบวนการหมักน้ำปลา และพบว่า *Virgibacillus* sp. SK33 และ SK37 สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีน ซึ่งสามารถย่อยปลากระดูกและเคซีนได้ดีและเชื่อได้ว่าสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโปรตีนจากปลากระดูกเป็นองค์ประกอบสำคัญ และมีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% ดังนั้นผลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มในการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ เพื่อเร่งกระบวนการหมักน้ำปลา ต่อมา Sinsuwan et al. (2007, 2008, 2010, 2011) ศึกษาถึงคุณลักษณะของเอนไซม์ที่หลั่งออกนอกเซลล์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 และ *Virgibacillus* sp. SK33 โดยโปรตีนจาก ทั้ง 2 สายพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่มซีรีนโปรตีนสมีคุณสมบัติคล้ายซัพทิลิซินและถูกกระตุ้นกิจกรรมที่ระดับความเข้มข้นเกลือค่อนข้างสูงคือ 20-25% และ 20-30% ตามลำดับ และเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 แสดงกิจกรรมได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส และ pH 8 ส่วนเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK33 แสดงกิจกรรมได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ pH 7.5 เอนไซม์ยังมีเสถียรภาพที่เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 4 โมลาร์ และแคลเซียมคลอไรด์ 500 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ Sinsuwan et al (2011) ศึกษาถึงโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จาก *Virgibacillus* sp. SK33 เอนไซม์มีขนาดโมเลกุลประมาณ 17, 32 และ 65 กิโลดาลตัน สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ที่สกัดได้คือ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 8 และ 11 อีกทั้ง Phrommao

et al. (2011) ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ที่หลั่งออกนอกเซลล์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 จากรายงานดังกล่าวพบว่าโปรตีนจาก *Virgibacillus* sp. นั้นถูกกระตุ้นกิจกรรมที่ระดับความเข้มข้นของเกลือค่อนข้างสูงคือ 20-30% และมีความเสถียรในเกลือที่มีความเข้มข้นสูง 0-30% นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *V.pantothenicus* ซึ่งหลั่งโปรตีนสออกนอกเซลล์ที่จัดอยู่ในกลุ่มซีรีน โปรตีนเอส และมีคุณสมบัติทนอุณหภูมิสูงและทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง ซึ่งคัดแยกมาจากตัวอย่างเนื้อไก่สด (ตารางที่ 1.3) โดยเอนไซม์แสดงกิจกรรมได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ พีเอช 10 อีกทั้งเอนไซม์มีการสูญเสียกิจกรรมเล็กน้อยในสภาวะเป็นด่างที่ 10 โดยมีค่ากิจกรรมเหลืออยู่ 85% และเอนไซม์ไม่สูญเสียกิจกรรมเลยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Gupta et al., 2008) Chamroensaksri et al (2008) รายงานถึงเอนไซม์ที่หลั่งออกนอกเซลล์จาก *V.marismortui* NB2-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบเกลือปานกลางที่คัดแยกได้จากปลาร้าว่ามีสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนที่โซเดียมคลอไรด์ 15% พีเอช 9 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กิจกรรมของโปรตีนที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ถูกกระตุ้นด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% พีเอช 10 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส Tanasupawat, et al. (2011) ศึกษาถึงเอนไซม์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์จาก *V. halodenitrificans* TKNR13-3 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกะปิว่าจัดอยู่ในกลุ่มซีรีน โปรตีนเอสที่มีคุณสมบัติคล้ายกับไคโมทริปซินและกระตุ้นด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15% พีเอช 8 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โปรตีนจาก *V. dokdonensis* VIPT 14 จัดอยู่ในกลุ่มซีรีน โปรตีนเอสที่มีมวล

ตารางที่ 1.3 คุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรตีนจาก *Virgibacillus* ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ

Species	Classification	Optimum condition			Mass (kDa)	Source	Reference
		Temperature (°C)	pH	NaCl (%)			
<i>V.pantothenicus</i> MTCC 6729	Alkaline serine proteinase	50	10	-	-	Fresh chicken meat sample	Gupta et al. (2008)
<i>V.marismortui</i> NB2-1	Alkaline serine proteinase	50	10	5	17, 19, 24, 29, 35	Pla-ra	Chamroensaksri et al. (2008)
<i>Virgibacillus</i> sp. SK 33	Subtilisin-like serine proteinase	55	7.5	20-25	19, 32	Thai fish sauce	Sinsuwan et al. (2008)
<i>Virgibacillus</i> sp. SK 37	Subtilisin-like serine proteinase	55-60	8	20-30	19, 34, 44	Thai fish sauce	Phrommao et al.(2011)
<i>V.halodenitrificans</i> TKNR 13-3	Chymotrypsin-like serine proteinase	60	8	15	12, 21, 29, 39, 49	Ka-pi	Tanasupawat, et al. (2011)
<i>V.dokdonensis</i> VIPT 14	Serine proteinase	40	7	9	36	Saltern of Kumta	Rajeswari et al. (2012)

โมเลกุลขนาด 36 กิโลดาลตัน เอนไซม์แสดงกิจกรรมได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ pH 7 (ตารางที่ 1.3) อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่ามีรายงานเกี่ยวกับคุณสมบัติของ โปรตีนส ที่ผลิตจาก *Virgibacillus* ชนิดที่ตรึงอยู่กับเซลล์อยู่น้อย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างโปรตีนของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากน้ำปลาซึ่งแสดงกิจกรรมโปรตีนสูง
2. ศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ของไอโซเลทที่คัดแยกจากน้ำปลาซึ่งแสดงกิจกรรมโปรตีนสูง
3. ศึกษาการใช้โปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ในกระบวนการหมักน้ำปลา

ขอบเขตของการวิจัย

มุ่งเน้นการใช้ประโยชน์แบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 ที่แยกและคัดเลือกได้ว่ามีศักยภาพในการใช้เป็นแหล่งผลิตโปรตีนที่หลั่งออกนอกเซลล์และโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ เพื่อย่อยสลายโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นแหล่งโปรตีนราคาถูกที่สามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีนที่หลั่งออกนอกเซลล์ รวมถึงศึกษาสภาวะที่เหมาะสม และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ นอกจากนี้ทดสอบศักยภาพของ *Virgibacillus* sp. SK37 ในการเร่งกระบวนการหมักน้ำปลา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

เกิดองค์ความรู้เกี่ยวกับโปรตีนจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญต่อการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ และความรู้เกี่ยวกับโครงการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมน้ำปลาของประเทศไทย ทำให้เกิดการพัฒนาปรับปรุงกระบวนการผลิตน้ำปลาให้ทันสมัย สามารถแข่งขันกับประเทศคู่แข่งได้ หน่วยงานของรัฐที่จะได้ประโยชน์คือ กรมประมงและนักวิจัยที่ศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับน้ำปลา



บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 วัสดุและสารเคมี

ขนส่งตัวอย่างปลากระตัก (*Stolephorus* sp.) จากสะพานปลาช่องแสมสาร จังหวัดชลบุรี โดยเก็บปลาในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งหลังจากจับทันที มายังห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งใช้เวลา 6 ชั่วโมงหลังการจับ ปลามีขนาดน้ำหนักตัวเฉลี่ย 2.61 ± 0.47 กรัม และมีความยาวประมาณ 7.59 ± 0.34 เซนติเมตร ซึ่งเป็นขนาดปลาที่ใช้ในอุตสาหกรรมน้ำปลา

สารเคมีจากบริษัท Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.) ได้แก่ Boc-Gln-Ala-Arg-AMC, Boc-Val-Leu-Lys-AMC, Z-Arg-Arg-AMC, azocasein, leupeptin, soybean trypsin inhibitor I (SBTI), N-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), bestatin, pepstatin A, trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidine)-butane (E-64), N-ethylmaleimide (NEM), 2-mercaptoethanol (β -ME), bovine serum albumin, L-tyrosine และ casein สารเคมีจากบริษัท Bachem A.G. (Bubendorf, Switzerland) ได้แก่ t-Butyloxycarbonyl(Boc)-Asp(oBzl)-Pro-Arg-7-amino-4-methylcoumarin (AMC), succinyl (Suc)-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC และ carbobenzoxy (Z)-Phe-Arg-AMC สารเคมีจากบริษัท Fluka (Buchs, Switzerland) ได้แก่ Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) สารเคมีจากบริษัท Merck (KGaA, Darmstadt, Germany) ได้แก่ plate count agar (PCA) สารเคมีจากบริษัท Abbra Corporation Limited ได้แก่ Soy protein isolate (Bangkok, Thailand) และสารเคมีอื่นๆ ที่ใช้ในการวิจัยเป็นคุณภาพที่ใช้ในงานวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการ (Analytical grade)

2.1 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนจาก *Virgibacillus* sp. SK37

2.1.1 การคัดเลือกชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนราคาถูก

แหล่งไนโตรเจนราคาถูกเพื่อใช้ในการคัดเลือกมีทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ กากถั่วเหลือง ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการหมักซีวี่ รำข้าว โปรตีนถั่วเขียวซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเส้น กากยีสต์ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากโรงงานเบียร์ และกากน้ำปลาซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา เติร์ยมกล้าเชื้อ (Inoculum) โดยถ่ายโคโลนี 1 ลูป (Loop) ของเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Ym (1% Yeast extract, 0.3% Trisodium citrate, 0.2% KCl, และ 2.5% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5% และ

พีเอช 7 บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm เป็นเวลา 1 วัน วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (GBC UV/VIS 916; GBC Scientific Equipment PTY, LTD., Australia) ให้ได้ประมาณ 0.3 ซึ่งเทียบเท่ากับจำนวนเซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนข้างต้นในระดับ 1% (w/v) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ $8,000 \times g$ เป็นเวลา 20 นาที เติมไตรโซเดียมซิเตรท (Trisodium citrate) เข้มข้น 0.3%, โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride, KCl) เข้มข้น 0.2%, และแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) เข้มข้น 2.5% เติมโซเดียมคลอไรด์ให้ถึงความเข้มข้น 5% ปรับให้ได้ พีเอช 7 สูตรอาหารควบคุมใช้ Yeast extract 1% เป็นแหล่งไนโตรเจนแทน ถ้ายกค่าเชื้อปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 45 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0-6 วัน เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm ติดตามการเจริญของเชื้อทุก 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Spread plate โดยใช้ Modified JCM 168 agar medium ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5% บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน และวิเคราะห์กิจกรรมของโปรตีนสที่หลั่งออกนอกเซลล์ โดยเลือกชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่ากิจกรรมของโปรตีนสที่หลั่งออกนอกเซลล์สูงสุด เพื่อศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสม และปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญและสร้างโปรตีนสต่อไป

2.1.1.2 วิเคราะห์กิจกรรมของโปรตีนสที่หลั่งออกนอกเซลล์

ดัดแปลงจาก Barrett and Kirschke (1981) โดยในปฏิกิริยา 1 มิลลิลิตร ใช้ เอนไซม์ 0.05 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นสังเคราะห์ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ McIlvain พีเอช 8.0 ไตรโซเดียมฟอสเฟต (Trisodium phosphate) เข้มข้น 0.2 โมลาร์ และไตรโซเดียมซิเตรท เข้มข้น 0.1 โมลาร์) บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยากับสารผสมบิวทานอล: เมทานอล: น้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionized water) ในอัตราส่วน 30: 35: 35 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร วัดค่าการเรืองแสง (Fluorescence) ด้วยเครื่อง Spectrofluorometer (RF-1501; Shimadzu Co., Kyoto, Japan) ที่ค่าความยาวคลื่นกระตุ้น 380 นาโนเมตร และค่าความยาวคลื่นการปล่อยพลังงานที่ 460 นาโนเมตร กำหนดให้ค่ากิจกรรม 1 หน่วย (Unit activity, U) คือ ปริมาณสาร AMC 1 นาโนโมลที่ถูกปลดปล่อยต่อ 1 นาที

2.1.2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมและปัจจัยแวดล้อมต่อการการเจริญและสร้างโปรตีนส

2.1.2.1 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

เมื่อคัดเลือกชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมแล้ว ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0, 3.0 และ 5% (w/v) ปรับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับ 5% และ พีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0-5 วัน เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ติดตามการเจริญของเชื้อเมื่อครบ 4 วัน ด้วยเทคนิค Spread plate โดย

ใช้อาหารแข็ง Ym ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5% บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน และวิเคราะห์กิจกรรมของโปรตีนที่หลั่งออกมานอกเซลล์ทุกวันตามรายละเอียดข้างต้น โดยเลือกความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ที่ให้ค่ากิจกรรมของโปรตีนที่หลั่งออกนอกเซลล์สูงสุด เพื่อใช้ในการศึกษาปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญและสร้างโปรตีนต่อไป

2.1.2.2 อุณหภูมิ

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสร้างโปรตีนในอาหารราคาถูกที่คัดเลือกได้ โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ปรับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับ 5% และ พีเอช 7 เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที่ ติดตามการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมโปรตีนเป็นเวลา 5 วัน ติดตามการเจริญของเชื้อเมื่อครบ 4 วัน และวิเคราะห์กิจกรรมของโปรตีนที่หลั่งออกนอกเซลล์ทุกวัน ตามรายละเอียดข้างต้น โดยเลือกอุณหภูมิที่ให้ค่ากิจกรรมของโปรตีนสูงสุด เพื่อใช้ในการศึกษา ค่าพีเอช และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ที่มีผลต่อการเจริญและสร้างโปรตีนต่อไป

2.1.2.3 ค่าพีเอช (pH)

ศึกษาผลของพีเอชโดยปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้เท่ากับ 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.5 จากนั้นปรับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับ 5% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากผลการทดลองข้างต้น เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที่ ติดตามการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมโปรตีนเป็นเวลา 5 วัน ติดตามการเจริญของเชื้อเมื่อครบ 4 วัน และวิเคราะห์กิจกรรมของโปรตีนที่หลั่งออกมานอกเซลล์ทุกวัน ตามรายละเอียดข้างต้น โดยเลือกค่าพีเอชที่ให้ค่ากิจกรรมของโปรตีนสูงสุด เพื่อใช้ในการศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการเจริญและสร้างโปรตีนต่อไป

2.1.2.4 ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์

ศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 7.5 และ 10% ปรับค่าพีเอชเท่ากับค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม ติดตามการเจริญของเชื้อและวิเคราะห์กิจกรรมของโปรตีนที่หลั่งออกมานอกเซลล์ทุกวัน เป็นเวลา 6 วัน ตามรายละเอียดข้างต้น

2.3 การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จากแบคทีเรียที่ชอบเกลือปานกลาง *Virgibacillus* sp SK37

2.3.1 การเตรียมและการสกัดเอนไซม์โปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์

ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ปริมาตร 1 ลูป (loop) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast extract broth (Ym; yeast extract 1%, trisodium citrate 0.3%, KCl 0.2% และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

2.5%) พีเอช 7.0 ตามวิธีของ Sinsuwan และคณะ (2008) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ $10000 \times g$ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-มาลีเอต (Tris-maleate) พีเอช 7 แช่เย็นที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เท่ากับปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทิ้งไป ปั่นเหวี่ยง (centrifuged) ที่ $10000 \times g$ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-มาลีเอต (พีเอช 7) แช่เย็นที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ประกอบด้วยสารละลายเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติกแอซิด (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ หรือสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตร 1/30 ของบัฟเฟอร์ที่ทิ้งไป บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่าที่ 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บเอนไซม์ที่สกัดได้โดยการปั่นเหวี่ยงที่ $10000 \times g$ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำเอนไซม์ที่สกัดได้ไปผ่านโดยกระบวนการ dialysis กับสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-มาลีเอต ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, พีเอช 7 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อ dialysis อีกครั้ง ใช้เยื่อ dialysis ที่มี molecular weight cutoff (MWCO) 10 กิโลดาลตัน (Pierce Chemical Company, Rockford, IL USA) เก็บสารละลายในถุง dialysis เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมโปรตีนและวิเคราะห์ต่อไป

หลังจากคัดเลือกวิธีการสกัดเอนไซม์ที่เหมาะสม ศึกษาระยะเวลาการย่อยสลายสารตั้งต้นของเอนไซม์สกัดในช่วงระยะเวลา 0-2 ชั่วโมง โดยวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายโปรตีน (Proteolytic activity) และวิเคราะห์ไซโมแกรม (Zymography) ดังวิธีข้างต้น

2.3.2 การวิเคราะห์ไซโมแกรม (Zymography)

แยกโปรตีนด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยใช้เจลอะคริลามายด์ (Acrylamide) ในชั้น Stacking ที่ความเข้มข้น 4% และ Separating gel ที่ความเข้มข้น 12.5% (Laemmli, 1970) ผสมเอนไซม์กับบัฟเฟอร์ (SDS เข้มข้น 4%, 2-mercaptoethanol (β -ME) เข้มข้น 10%, กลีเซอรอลเข้มข้น 20%, สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) เข้มข้น 125 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 6.8), โบรโมฟินอลบูล เข้มข้น 0.1%) ในอัตราส่วน 1:1 ย้อมโปรตีนด้วยวิธี Silver staining

เตรียม Casein zymography ตามวิธีของ García-Carreño และคณะ (1993) โดยแช่แผ่นเจลในสารละลายเคซีน (casein) เข้มข้น 2% และสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 8) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นเจลด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 8) แช่เย็นสองครั้ง จากนั้นบ่มตัวอย่างในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl), พีเอช 8 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และย้อมสีแผ่น

เจลด้วยสารย้อมสี Coomassie brilliant blue R-250 ที่เข้มข้น 0.1% ในเมทานอลเข้มข้น 40% และ กรดอะซิติกเข้มข้น 10% เป็นเวลา 30 นาที กำจัดสีย้อมโดยใช้สารละลายเอทานอล (Ethanol) เข้มข้น 25% และ กรดอะซิติกเข้มข้น 10% แยกใส (clear zone) บนพื้นน้ำเงินเข้มแสดงถึงแถบเอนไซม์

วิเคราะห์ไซโมแกรมโดยใช้สารตั้งต้นเรืองแสง (Fluoregenic peptide) ตามวิธีของ Yasothomsrikul and Hook (2000) โดยทำการแยกเอนไซม์บนเจลอะคริลาไมด์ตามขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้นยกเว้น separating gel เตรียมโดยเติม succinyl (Suc)-Ala-Ala-Pro-Phe-7-amino-4-methylcoumarin (AMC) เป็นสารตั้งต้นที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากแยกโดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส ในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำเจลไปล้างด้วย Triton X-100 เข้มข้น 2.5% ที่แช่เย็นเป็นเวลา 5 นาที และล้างอีกสองครั้งด้วยน้ำปราศจากไอออนแช่เย็น กับสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl), พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ นำแผ่นเจลไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แถบฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent bands) แสดงตำแหน่งเอนไซม์โปรตีนส และบันทึกผลโดยใช้ Gel Doc™ XR system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) สารโปรตีนมาตรฐานเพื่อคำนวณโมเลกุลของเอนไซม์คือ โมโอซิน (209 กิโลดาลตัน), β -galactosidase (124 กิโลดาลตัน), ซีรัมอัลบูมิน (80 กิโลดาลตัน), ovalbumin (49.1 กิโลดาลตัน), คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (34.8 กิโลดาลตัน), สารยับยั้งทริปซิน (28.9 กิโลดาลตัน), และไลโซไซม์ (20.6 กิโลดาลตัน) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

2.3.3 อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและเสถียรภาพเอนไซม์

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของโปรตีนสกัดที่อุณหภูมิ 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 และ 80 องศาเซลเซียส ที่ พีเอช 7.0 ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมโดยแปรค่าพีเอชที่ 3, 4, 5, 5.5, 6 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate) เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์, ส่วน พีเอช 6, 6.5, 7, 7.5 ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-มาเลอเต (Tris-maleate) เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์, พีเอช 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์, พีเอช ที่ 9.5, 10, 11, 12 ใช้สารละลายบัฟเฟอร์บอเรต เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และ สารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ (glycine-NaOH) เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และ พีเอช 11, 12 ใช้สารละลายบัฟเฟอร์คาร์บอนตเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยดัดแปลงจากวิธีของ Barrett และ Kirschke (1981) ตามรายละเอียดข้างต้น

2.3.4 ผลของสารยับยั้งและอิออน

ศึกษาผลของสารยับยั้งต่างๆ คือ leupeptin, soybean trypsin inhibitor I (SBTI), *N*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), *N*-p-tosyl-l-phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), EDTA, L-histidine, imidazole, bestatin, pepstatin

A, (1S,2S)-2-(((S)-1-((4-guanidinobutyl)amino)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl)carbamoyl)cyclopropanecarboxylic acid (E-64), *N*-ethylmaleimide (*NEM*), iodoacetic acid, และ reducing agents (dithiothreitol (DTT) และ β -ME) โดยควบคุมค่าพีเอชของปฏิกิริยาโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.3.5 ความจำเพาะของสารตั้งต้น

วิเคราะห์ความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสังเคราะห์ชนิดต่างๆ คือ *t*-butyloxycarbonyl (Boc)-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC, Boc-Gln-Ala-Arg-AMC, Boc-Val-Leu-Lys-AMC, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC, carbobenzoxy (Z)-Phe-Arg-AMC, and Z-Arg-Arg-AM ตามวิธีของ Barrett และ Kirschke (1981) ทำปฏิกิริยาในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.3.6 ผลของแคลเซียมคลอไรด์

ศึกษาผลของแคลเซียมคลอไรด์ โดยบ่มเอนไซม์สกัดในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 0-500 มิลลิโมลาร์ และศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิ (Thermal stability) โดยการบ่มเอนไซม์ในสารละลายเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิด (EDTA) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ หรือ สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 35-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำให้เย็นทันทีด้วยน้ำเย็น คำนวณค่ากิจกรรมความสัมพันธ์ (Relative activity) โดยกำหนดให้ตัวอย่างที่ไม่ได้บ่มคิดเป็น 100%

2.3.7 ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์

เตรียมตัวอย่างโปรตีนชนิดต่างๆ ดังนี้คือ โปรตีนกล้ามเนื้อของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เคซีน (Casein) และโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้า (Soy protein isolate) เพื่อศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการย่อยสลายโปรตีนของเอนไซม์โปรตีนเอส สกัดโปรตีนกล้ามเนื้อของปลานิล โดยปั่นเนื้อปลาบดกับสารละลายบัฟเฟอร์แซ่เย็น (สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0, 10 และ 25%, พีเอช 8) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 และ กวนผสมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บสารละลายส่วนใสที่ประกอบด้วยสารละลายโปรตีนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 10000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ละลายเคซีน (2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเกลือเข้มข้นต่างๆดังกล่าวข้างต้น ละลายโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทางการค้าในสารละลายโซเดียมไอซอครอโรไซด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ แซ่เย็น และกวนผสมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ 10000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเก็บสารละลายส่วนใส จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์โดยความเข้มข้นสุดท้ายมีค่า 10 และ 25% กวนผสมที่อุณหภูมิ 4 องศา

เซลล์เชื้อส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บสารละลายส่วน โดยการปั่นเหวี่ยง ที่ 10000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในหลอดปฏิกิริยา 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วยเอนไซม์โปรตีนเอสสกัด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โปรตีนตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้น โซเดียมคลอไรด์ต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลายกรด ไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid, TCA) เข้มข้น 50% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเก็บใน น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายส่วนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 13000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเปปไทด์โดยใช้วิธี Lowry (Lowry, 1951) โดยใช้ไทโรซีน (Tyrosine) เป็นสารมาตรฐาน

2.4 บทบาทของเอนไซม์โปรตีนเอสต่อการย่อยสลายโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมัก น้ำปลา

2.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

ถ่ายเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 ปริมาตร 1 ลูป (Loop) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Ym ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% (พีเอช 7) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 วัน ถ่ายเชื้อลงใน fish juice broth ในปริมาตร 1% โดย fish juice broth มีโซเดียมคลอไรด์ 10% ของปริมาตรทั้งหมด บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบของการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 3 วัน fish juice broth เตรียมจากของเหลวส่วนที่ซึมออกมาจากการผสมปลาและเกลือ (น้ำคาวปลา) ซึ่งจัดเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำปลา และมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 25-30% การเตรียม fish juice broth ทำได้โดยการเติมน้ำปราศจากอิออน (Deionized water) ลงในน้ำคาวปลาซึ่งเก็บตัวอย่างจากโรงงานน้ำปลาให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของโซเดียมคลอไรด์เป็น 10% หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เก็บเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร fish juice broth โดยการปั่นเหวี่ยง ที่ 10000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนเซลล์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.85% ปริมาตร 1/10 ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทิ้งไป

ละลายปลากระตักแช่แข็ง (*Stolephorus* sp.) ในน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำปลาที่ทำละลาย (Thaw) แล้วจำนวน 750 กรัม ผสมกับเกลือสมุทร 250 กรัม และเติมเซลล์ *Virgibacillus* sp. SK37 ที่เตรียมข้างต้น (จำนวนเซลล์ประมาณ 8.26 log CFU/ml) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมแคลเซียมคลอไรด์ในระดับ 0.2% โดยน้ำหนัก นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ในภาชนะแก้วที่มีขนาด 10.8 × 10.8 × 18.1 ซม. (กว้าง×ยาว×สูง) บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 เดือน เตรียมตัวอย่างควบคุมเหมือนกับตัวอย่างทดลอง ยกเว้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์

ที่ความเข้มข้น 0.85% แทนการเติมเซลล์ ติดตามการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial growth) โดยใช้เทคนิค Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15%

ติดตามการย่อยสลายของโปรตีนที่ระยะเวลาต่างๆของการหมักโดยผสมปลาหมักจำนวน 3 กรัมกับสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid, TCA) ที่มีความเข้มข้น 5% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 27 มิลลิลิตร และเก็บตัวอย่างบนน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยการปั่นเหวี่ยงที่ $10000 \times g$ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วัดปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α -amino acid) โดยใช้วิธี trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) (Adler-Nissen, 1979) โดยใช้ลูซีน (Leucine) เป็นสารมาตรฐาน หลังจากสัปดาห์ที่ 4 ของการหมัก โปรตีนปลาจะกลายเป็นของเหลว ดังนั้นการเก็บตัวอย่างในสัปดาห์ที่ 6 หลังจากนั้นทำโดยการปั่นเหวี่ยงที่ $13000 \times g$ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และกรองสารละลายส่วนใสด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 สารละลายส่วนใสที่กรองได้นำไปวิเคราะห์หาปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α -amino group)

2.5. บทบาทของโปรตีนที่ตรึงอยู่ที่เซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 ในกระบวนการหมักนำปลาระดับห้องปฏิบัติการ

2.5.1. การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมกล้าเชื้อสำหรับหมักนำปลาโดยถ่ายเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 1 หลอดในอาหารเหลว JCM 168 ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% และปรับค่าพีเอชให้ได้ 7.0 ± 0.2 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน เมื่อได้จำนวนเซลล์ประมาณ 10^8 CFU ต่อ มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ $10,000 \times g$, 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อเก็บเกี่ยวเซลล์ จากนั้นเติมสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมสารละลายเซลล์ (Cell suspension) สำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อ

2.5.2 การเตรียมตัวอย่างปลาหมัก

เตรียมตัวอย่างปลาหมัก 3 สภาวะ โดยทุกตัวอย่างใช้ปลากระดัก 1.5 กิโลกรัม และใช้เกลือสมุทรจากสถานประกอบการ ชุมการทดลองที่ 1 เติมเกลือสมุทรในระดับ 30% ของน้ำหนักทั้งหมด ชุมการทดลองที่ 2 เติมเกลือสมุทรเพื่อให้มีปริมาณเกลือทั้งหมด 15% และ ชุมการทดลองที่ 3 ปรับปริมาณเกลือเหมือนชุดที่ 2 และปรับค่าพีเอชในระบบหมักให้มีค่าประมาณ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต จากนั้นเติมสารละลายเซลล์ที่เตรียมไว้ โดยให้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นในระบบหมักอยู่ที่ 10^6 CFU ต่อ มิลลิลิตร เตรียมชุดควบคุม (Control) ของแต่ละชุดการทดลองโดยเติมสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% ที่ปลอดเชื้อในปริมาณที่เท่ากับสารละลายเซลล์

คลุกเคล้าผสมให้เข้ากัน บรรจุในโหลแก้วปิดปากโหลด้วยพลาสติก บ่มตัวอย่างในที่มืดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการสุ่มตัวอย่างที่ระยะเวลา 0, 7, 14, 21, 30, 60, 90, 120 และ 180 วัน ติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช กิจกรรมโปรตีนเอสโดยวิเคราะห์ปริมาณ โอลิโกเปปไทด์ ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน ปริมาณเกลือ และติดตามจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (Viable cell count) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ JCM 168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% และ JCM 169 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 25% เมื่อบ่มครบ 6 เดือน กรองตัวอย่างน้ำปลา วิเคราะห์ค่าต่างๆตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น รวมถึงปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณแอมโมเนีย

2.5.3 การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมัก

สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำปลาจำนวน 25 กรัม ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% (สำหรับตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียที่เรียกว่าเชื้อ) หรือสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% (สำหรับตรวจนับ Extreme halophiles) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างด้วยเครื่อง Stomacher (Stomacher 400, Seward Ltd., West Sussex, England) วิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี Standard plate count โดยใช้เทคนิค Spread plate เจือจางตัวอย่างแบบ Serial dilution ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 ตรวจนับประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดและ extreme halophiles ตามลำดับ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ JCM 168 agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% และตรวจนับแบคทีเรียประเภท extreme halophiles ด้วยการเจือจางตัวอย่างแบบ Serial dilution ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% ในอาหาร JCM 169 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% ทำการทดลองสองซ้ำ

2.5.4 สมบัติทางเคมีของน้ำปลาในระหว่างกระบวนการหมัก

2.5.4.1 ค่าพีเอช (pH)

วัดค่าพีเอช (pH) โดยใช้เครื่อง pH meter (Mettler-Toledo MP220, Schwerzenbach, Switzerland)

2.5.4.2 ปริมาณ โอลิโกเปปไทด์ (Oligopeptide content)

วิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ในตัวอย่างน้ำปลาด้วยวิธี Lowry (Lowry *et al.*, 1951) โดยใช้ไทโรซีน (Tyrosine) เป็นสารละลายมาตรฐาน แสดงปริมาณโอลิโกเปปไทด์ในหน่วยมิลลิโมลาร์ ปิเปิดตัวอย่างน้ำปลา 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Alkaline CuSO_4 (สารละลายผสมระหว่าง โซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 2% ใน สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัล กับสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) เข้มข้น 0.5% ในโซเดียมซิเตรต เข้มข้น 1% ในอัตราส่วน 1:50) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu (เจือจางด้วยน้ำกลั่น 1:1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้า

กันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (SmartSpec™ Plus, Bio-Rad Laboratories, California, U.S.A.)

2.5.4.3 ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α -Amino group content)

วิเคราะห์ปริมาณโพลิโกเปปไทด์ในตัวอย่างน้ำปลาในค่าของปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α -Amino acids) โดยทำปฏิกิริยากับ 2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid ตามวิธีของ Field (1972) โดยใช้ลูซีน (Leucine) เป็นสารมาตรฐาน แสดงค่าการย่อยสลายของโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักในหน่วยมิลลิโมลาร์ของกรดอะมิโนแอลฟา ปิเปตตัวอย่างน้ำปลา 50 ไมโครลิตร เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 8.2) เข้มข้น 0.2125 โมลลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย Picrylsulfonic acid เข้มข้น 0.05% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (SmartSpec™ Plus, Bio-Rad Laboratories, California, USA)

2.5.4.4 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen)

วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดด้วยการย่อย กลั่น และไทเทรต ตาม AOAC (2005) ปิเปตตัวอย่างน้ำปลา 1 มิลลิลิตร (สำหรับตัวอย่าง Blank ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร) เติมสารผสมระหว่าง คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4) และ โพแทสเซียมซัลเฟตในอัตราส่วน 1:10 ปริมาณ 5 กรัม และเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 96% ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อย จากนั้นนำเข้าเครื่องย่อย (Block digestion unit KB205, Gerhardt UK Ltd., Northamptonshire, UK) โดยใช้อุณหภูมิ 380 องศาเซลเซียส ย่อยจนสารละลายเป็นสีเขียวใส ทิ้งให้เย็น แล้วนำมากลั่น โดยการเตรียมสารละลายกรดบอริกเข้มข้น 4% ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร หยด Mixed indicator (สารละลายผสมระหว่าง Bromocresol green 0.1 กรัม และ Methyl red 0.2 กรัม ละลายใน Ethyl alcohol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) จำนวน 2-3 หยด นำไปวางรองรับ distillate จากเครื่องกลั่น (Kjeltec 8100, FOSS, Hillerød, Denmark) โดยให้ปลายหลอดแก้วจุ่มอยู่ในสารละลายกรดบอริก แล้วนำหลอดกลั่นที่มีสารละลายตัวอย่างมาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 32% จำนวน 50 มิลลิลิตร กลั่นประมาณ 4 นาที ให้ได้ปริมาตรประมาณ 150 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทเทรตด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.1 นอร์มัล ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน

2.5.4.5 ปริมาณไนโตรเจนในรูปแอมโมเนีย (Ammonical nitrogen)

วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียด้วยการกลั่น และไทเทรต ตาม AOAC (2005) ปิเปตตัวอย่างน้ำปลา 1 มิลลิลิตร (ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เป็น Blank) เติมแมกนีเซียมออกไซด์ 1.50 กรัม และน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ลงในหลอดกลั่น แล้วนำมากลั่น โดย

การเตรียมสารละลายกรดบอริกเข้มข้น 4% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร หยด Mixed indicator (สารละลายผสมระหว่าง Bromocresol green 0.1 กรัม และ Methyl red 0.2 กรัม ละลายใน Ethyl alcohol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) จำนวน 2-3 หยด นำไปกรองรับ distillate จากเครื่องกลั่น (Kjeltec 8100, FOSS, Hillerød, Denmark) โดยให้ปลายหลอดแก้วจุ่มอยู่ในสารละลายกรดบอริก แล้วนำหลอดกลั่นที่มีสารละลายตัวอย่างมากลั่นประมาณ 4 นาที ให้ได้ปริมาตรประมาณ 150 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทเทรตด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 นอร์มัล ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน

2.5.4.6 ความเข้มข้นของเกลือ (Salt concentration)

วิเคราะห์ความเข้มข้นของเกลือด้วยหลักการ Volhard ตามวิธี AOAC (1995) ปิเปตตัวอย่างน้ำปลา 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (Silver nitrate, AgNO_3) เข้มข้น 0.1 นอร์มัล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมกรดไนตริกเข้มข้น 65% ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนประมาณ 15 นาที จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม Ferric alum indicator 5 มิลลิลิตร ไทเทรตกับสารละลายแอมโมเนียมไทโอไซยาเนต (Ammonium thiocyanate) เข้มข้น 0.1 นอร์มัล (ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน) จนเกิดตะกอนสีส้มอิฐ คำนวณปริมาณเกลือในรูปโซเดียมคลอไรด์

2.5.4.7 การวิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีน

วิเคราะห์ปริมาณ ฮีสตามีน คาตาเวอริน ทริปตามีน ไทรามีน พิวเทรสซีน สเปอร์มิดีน และ สเปอร์มิน ในตัวอย่างน้ำปลา โดยดัดแปลงจากวิธีของ Dadakova et al. (2009) โดยนำน้ำปลา 1 มิลลิลิตร เติมน้ำใน 1.5 มิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์พีเอช 11 (เตรียมโดยละลายโปแตสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) 16.65 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 9.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เตรียมจากสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ให้ได้ 9.2 จากนั้นเติมสารละลายแดนซิลคลอไรด์ (Dansyl chloride) เข้มข้น 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งละลายในอะซิโตน (Acetone) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปปรมที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที กำจัดแดนซิลอิสระโดยเติมสารละลายแอมโมเนียเข้มข้น 30% ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ปรับปริมาตรให้ได้ 5 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน นำสารละลายที่ได้มาสกัดด้วยเฮปแทน ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง เก็บสารละลายส่วนใสด้านบน นำไประเหยแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน ด้วย Tubo Vap[®] LV (Caliper LifeSciences, Massachusetts, USA) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาละลายด้วย acetonitrile ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร กรองตัวอย่างผ่านแผ่นเยื่อกรอง 0.45 ไมครอน (Vertical Chromatography, Co., LTD., Bangkok, Thailand) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย

เครื่อง HPLC ซึ่งใช้ DAD detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยตั้งค่าความยาวคลื่นอ้างอิงที่ 550 นาโนเมตร วิเคราะห์ไบโอจีนิกเอมีนด้วยคอลัมน์ Zorbax Eclipse-XDB-C18 (4.6×150 mm, 5µm, Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA., U.S.A.) โดย mobile phase ที่ใช้คือ 50% acetonitrile (solvent A) และ 100% acetonitrile (solvent B) ที่อัตราการไหล 0.8 มล. ต่อนาที เริ่มต้นใช้ isocratic elution คือนาทีที่ 0-5, solvent B 30-40%, นาทีที่ 5-10, solvent B 40-80%, นาทีที่ 10-15, solvent B 80-95%, นาทีที่ 15-20, solvent B 95-30% คงไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นปรับคอลัมน์ให้สมดุลด้วย solvent B 30% เป็นเวลา 2 นาที ก่อนการฉีดตัวอย่างครั้งต่อไป ปรับอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 28 องศาเซลเซียส ปริมาตรของการฉีดตัวอย่างคือ 10 ไมโครลิตร

2.5.4.8 การวิเคราะห์ห้องค์ประกอบของสารระเหยในน้ำปลา

วิเคราะห์ห้องค์ประกอบของสารระเหยของตัวอย่างน้ำปลาหมักเดือนที่ 6 ด้วยวิธี Headspace Solid-Phase Microextraction (SPME) โดยการแยกสารและระบุชนิดของสารด้วยเทคนิค Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Pham et al. (2008) ใช้ตัวอย่างน้ำปลา 1 มล. เติม Cyclohexanol ซึ่งเป็นสารมาตรฐานภายใน (Internal standard) ความเข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ให้ความร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และดูดซับสารระเหยด้วยไฟเบอร์ 50/30 ไมโครเมตร DBV/Carboxen/PDMS Stable Flex (Supelco, Bellefonte, PA., U.S.A) เป็นเวลา 30 นาที แยกสารระเหยด้วยคอลัมน์ DB-WAX polyethylene glycol (0.25 ไมโครเมตร, 60 เมตร, Agilent Technologies, Redwood, CA., U.S.A.) ตั้งค่าการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ (Oven temperature) จาก 25 จนถึง 250 องศาเซลเซียส ในอัตรา 15 องศาเซลเซียสต่อนาที วิเคราะห์มวลสารด้วย ionization energy ที่ 70 eV ระบุชนิดของสารประกอบที่ระเหยได้โดยการเปรียบเทียบ mass spectral ที่ได้กับฐานข้อมูลของ National Institute of Standards

2.6. วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการทดลองสองซ้ำโดยทำการทดลองวัดอย่างน้อย 2-3 ค่า ผลของ *Virgibacillus* sp. SK37 ต่อการย่อยโปรตีนของตัวอย่างน้ำปลาใช้การทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และแฟกทอเรียลแบบ CRD ส่วนผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ใช้การทดลองแฟกทอเรียลแบบ CRD วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS for Windows (version 14.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$



บทที่ 3

ผลการวิจัย

บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนจาก *Virgibacillus* sp. SK37

3.1.1 การคัดเลือกชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนราคาถูกลง

จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าการใช้เศษปลาและน้ำคาวปลาสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้แต่ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้สร้างโปรตีนได้จึงศึกษาแหล่งไนโตรเจนราคาถูกลงอื่นแทนเศษปลา ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหาร ทั้ง 5 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีนจาก *Virgibacillus* sp. SK37 แสดงดังตารางที่ 3.1 โดยโปรตีนถั่วเขียวมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ ในขณะที่รำข้าวมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดน้อยที่สุด

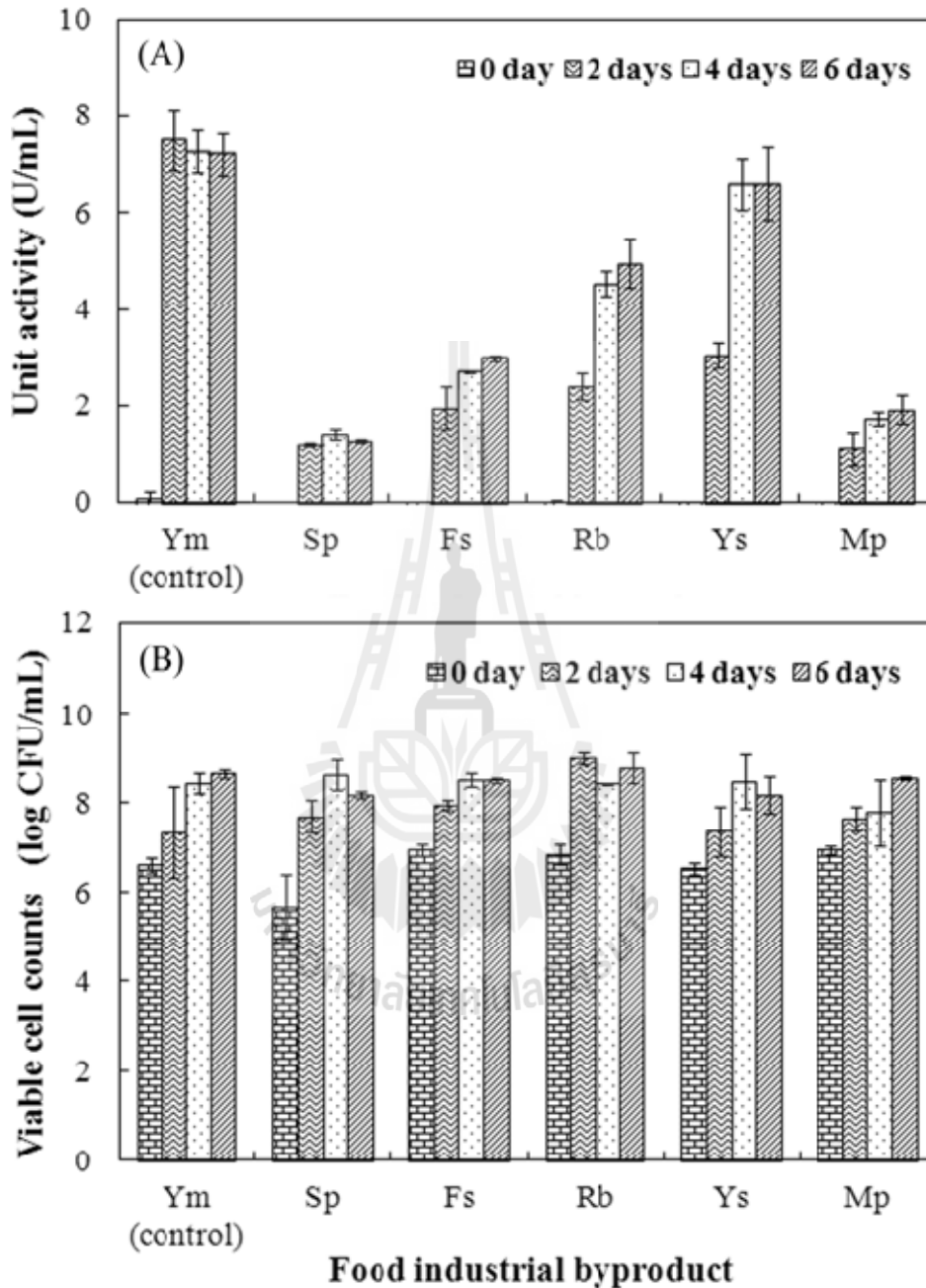
ตารางที่ 3.1 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen) และปริมาณเกลือของยีสต์สกัดทางการค้า (Yeast extract) และผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหาร

% (w/w)	Ym	Mp	Fs	Rb	Ys	Sp
Total nitrogen	10.79±0.05	12.29±0.09	2.22±0.14	2.16±0.01	7.79±0.01	3.47±0.14
NaCl	-	0.52±0.16	74.67±0.74	0.48±0.11	0.46±0.13	19.82±0.08

Ym= ยีสต์สกัดทางการค้า Mp= โปรตีนถั่วเขียว Fs=กากน้ำปลา Rb=รำข้าว Ys=กากยีสต์ Sp=กากถั่วเหลือง

ผลการศึกษาร่วมสร้างโปรตีนระหว่างการใช้ Ym กับแหล่งไนโตรเจนจากผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหาร พบว่าการใช้ Ym เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่ากิจกรรมของโปรตีนที่หลังออกนอกเซลล์สูงที่สุด (7.51±0.63 หน่วย/มิลลิลิตร) และระหว่างแหล่งไนโตรเจนราคาถูกลงทั้ง 5 ชนิด กากยีสต์จากอุตสาหกรรมเบียร์เป็นสารอาหารที่กระตุ้นการสร้างโปรตีนที่หลังออกนอกเซลล์สูงที่สุด คือประมาณ 6.60±0.53 หน่วย/มิลลิลิตร (P<0.05) (รูปที่ 3.1A) โดยค่ากิจกรรมของโปรตีนที่หลังออกนอกเซลล์มีค่าสูงที่สุดในวันที่ 4 และแหล่งไนโตรเจนจากกากถั่วเหลืองและโปรตีนถั่วเขียวทำให้การผลิตโปรตีนมีค่าต่ำที่สุด Kumar และ Tagaki (1999) รายงานว่าโปรตีนที่หลังออกนอกเซลล์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ต่างๆ ถูกเหนี่ยวนำด้วยแหล่งไนโตรเจนที่จำเพาะโดย beef extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดของ *B. cereus* 146 ในขณะที่กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการผลิตโปรตีนจาก *B. cereus* MCM B-326 เมื่อพิจารณาถึงปริมาณเซลล์

พบว่ารำข้าวให้ผลผลิตเซลล์สูงที่สุดในวันที่ 2 ขณะที่ Ym จะให้ปริมาณเซลล์สูงที่สุดในวันที่ 4 (รูปที่ 3.1B) และปริมาณเซลล์ระหว่างแหล่งไนโตรเจนราคาถูกและ Ym มีค่าไม่



รูปที่ 3.1 ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ระดับ 1% (w/v) ต่อกิจกรรมของโปรตีนที่หลั่งออกนอกเซลล์ (A) และการเจริญเติบโตของเชื้อ *Virgibacillus sp. SK37* (B)

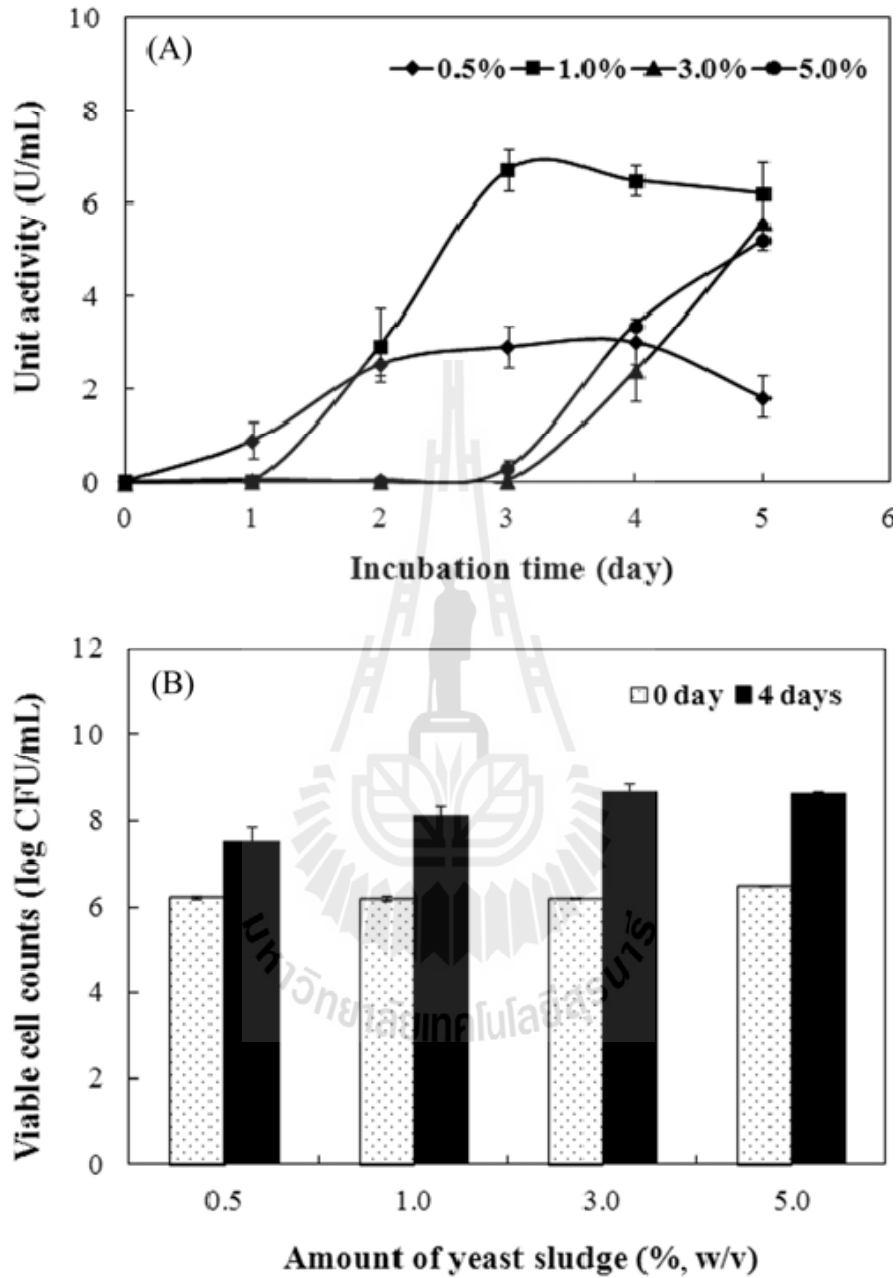
ต่างกันในวันที่ 4 ($P > 0.05$) เนื่องจากปริมาณเซลล์ของ *Virgibacillus sp. SK37* ที่เลี้ยงโดยใช้รำข้าวเป็นแหล่งไนโตรเจนมีปริมาณมากที่สุดในวันที่ 2 แต่กิจกรรมของโปรตีนมีค่าต่ำกว่าการใช้ Ym

และ กากยีสต์ ($P < 0.05$) แสดงว่าการผลิตโปรตีนสไมได้ขึ้นอยู่กับปริมาณเซลล์แต่ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหาร ถึงแม้ว่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของโปรตีนถั่วเขียวจะมีค่าสูงที่สุดแต่มื่อนำมาเลี้ยงเชื้อพบว่าให้ค่ากิจกรรมของโปรตีนต่ำกว่ากากยีสต์ เป็นไปได้ว่าโปรตีนในโปรตีนถั่วเขียวส่วนใหญ่เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ในขณะที่กากยีสต์อุดมไปด้วยกรดอะมิโน เปปไทด์ วิตามิน และเกลือแร่ ซึ่งสารอาหารขนาดเล็กในกากยีสต์จะถูกนำไปใช้ในการสร้างโปรตีนของ *Virgibacillus* sp. SK37 มากกว่าโปรตีนโมเลกุลใหญ่ในโปรตีนถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า yeast extract ช่วยเพิ่มความสามารถในการผลิตโปรตีนใน *Bacillus* หลายสายพันธุ์ (Boominadham et al., 2009) เมื่อเร็ว ๆ นี้ มีรายงานการใช้กากยีสต์ในอุตสาหกรรมเบียร์แทนยีสต์สกัดทางการค้า (Yeast extract) ในอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตเอนไซม์ (do Nascimento et al., 2011; Xiros et al., 2012) ดังนั้นจากการศึกษานี้สรุปได้ว่ากากยีสต์ในอุตสาหกรรมเบียร์ซึ่งเป็นวัตถุดิบราคาถูกสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนหลักสำหรับการผลิตโปรตีนจาก *Virgibacillus* sp. SK37 แทนการใช้ยีสต์สกัดทางการค้า (Yeast extract)

3.1.2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมและปัจจัยแวดล้อมต่อการเจริญและสร้างโปรตีน

เมื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของกากยีสต์ที่เหมาะสมต่อการสร้างโปรตีน พบว่าในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นของกากยีสต์ 1% (w/v) มีค่ากิจกรรมของโปรตีนหลังออกสูงที่สุด (6.72 ± 0.44 หน่วย/มิลลิลิตร) ดังแสดงในรูปที่ 3.2A เมื่อเพิ่มระดับกากยีสต์ เป็น 3% และ 5% พบว่า *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถสร้างโปรตีนได้ช้าในช่วง 3 วันแรก และเริ่มสร้างโปรตีนที่หลังออกนอกเซลล์ในวันที่ 4 โดยมีค่ากิจกรรมประมาณ 2.5-3.5 หน่วย/มิลลิลิตร สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Moon and Parulekar (1991) ที่พบว่า การสร้างโปรตีนของ *Bacillus firmus* ลดลงเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนในระดับความเข้มข้นสูงเกินไป จากการศึกษาพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของกากยีสต์ 0.5% *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถสร้างโปรตีนได้เร็วกว่าที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ คือในวันที่ 1 ก็แสดงการสร้างโปรตีนแล้ว แต่ค่ากิจกรรมของโปรตีนเพิ่มขึ้นและเริ่มคงที่ในวันที่ 2-4 ซึ่งไม่สูงเมื่อเทียบกับกากยีสต์ที่ระดับ 1% อาจเป็นไปได้ว่าที่ระดับ 0.5% นี้มีปริมาณไนโตรเจน (N-source) จำกัด (รูปที่ 3.2B) Moon and Parulekar (1991) รายงานว่าโดยทั่วไปการสร้างโปรตีนของแบคทีเรียจะมีการนำแหล่งไนโตรเจน เช่น กรดอะมิโน หรือ เกลือแอมโมเนียม ไปใช้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้มีรายงานการสร้างโปรตีนจาก *Bacillus* sp. SIMA-2 ที่ต้องใช้ยีสต์สกัดทางการค้ามากกว่า 0.3% และมีเปปโตินมากกว่า 0.2% จึงจะมีการสร้างโปรตีน (do Nascimento et al., 2011) ในขณะที่การสร้างโปรตีนของ alkaliphilic actinomycete ต้องมีเปปโตินมากกว่า 1.5% หรือมียีสต์สกัดทางการค้ามากกว่า 1% (Mehta et al., 2006) สำหรับ *Virgibacillus* sp. SK37 ต้องมีกากยีสต์ 1% ถึงจะมีการสร้างโปรตีนสูงสุด ($P < 0.05$) เป็นที่น่าสังเกตว่าจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5% มีปริมาณไม่ต่างกัน ($P > 0.05$) (รูปที่ 3.2B) จากผลการทดลองนี้

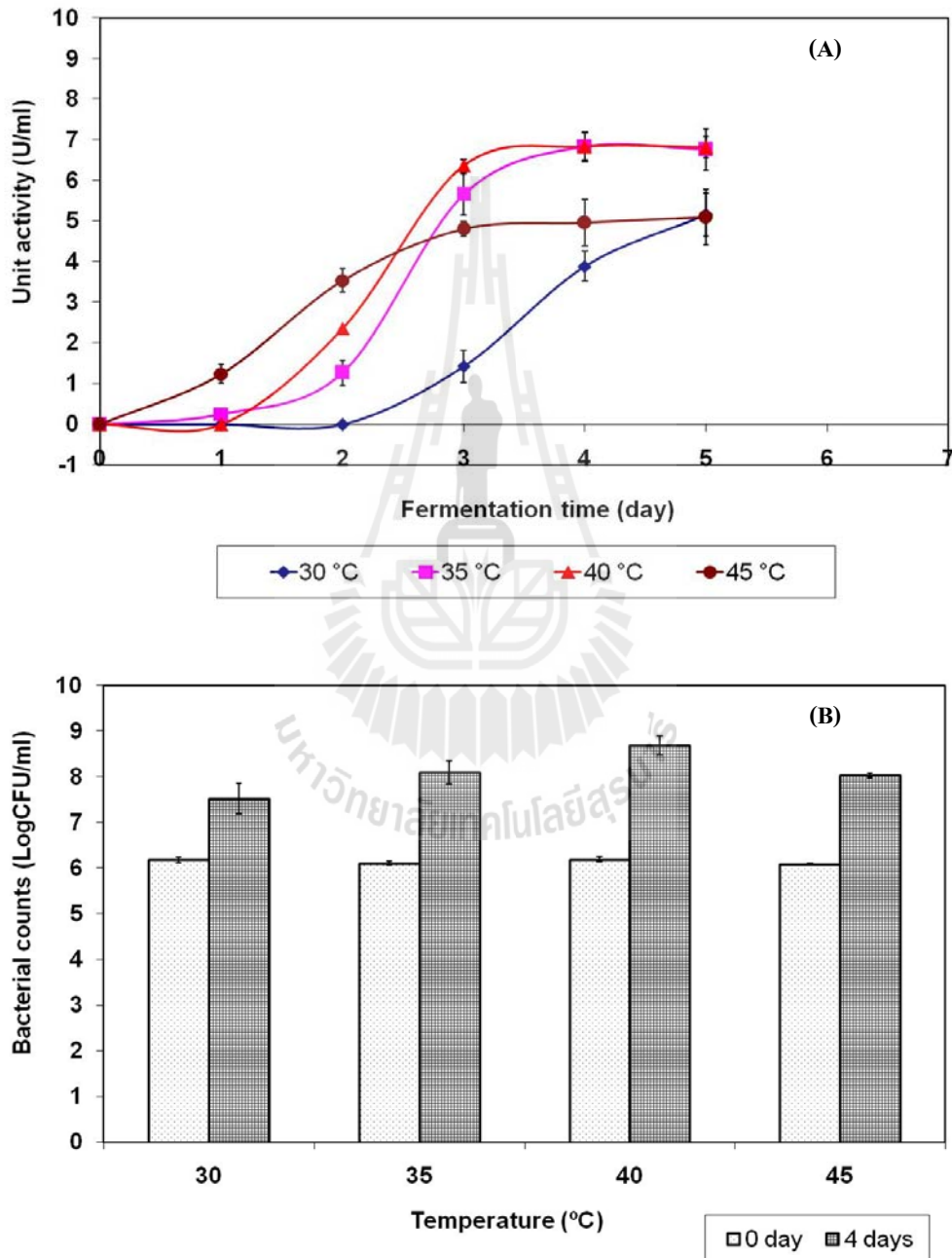
แสดงให้เห็นว่าปริมาณไนโตรเจนมีความจำเป็นต่อการสร้างโปรตีนสแต่ไม่ส่งผลกระทบต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37



รูปที่ 3.2 ผลของปริมาณกากยีสต์ที่ระดับต่างๆ (0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 % (w/v)) ต่อกิจกรรมโปรตีนสที่หลั่งออกนอกเซลล์ (A) และการเจริญเติบโตของเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 (B)

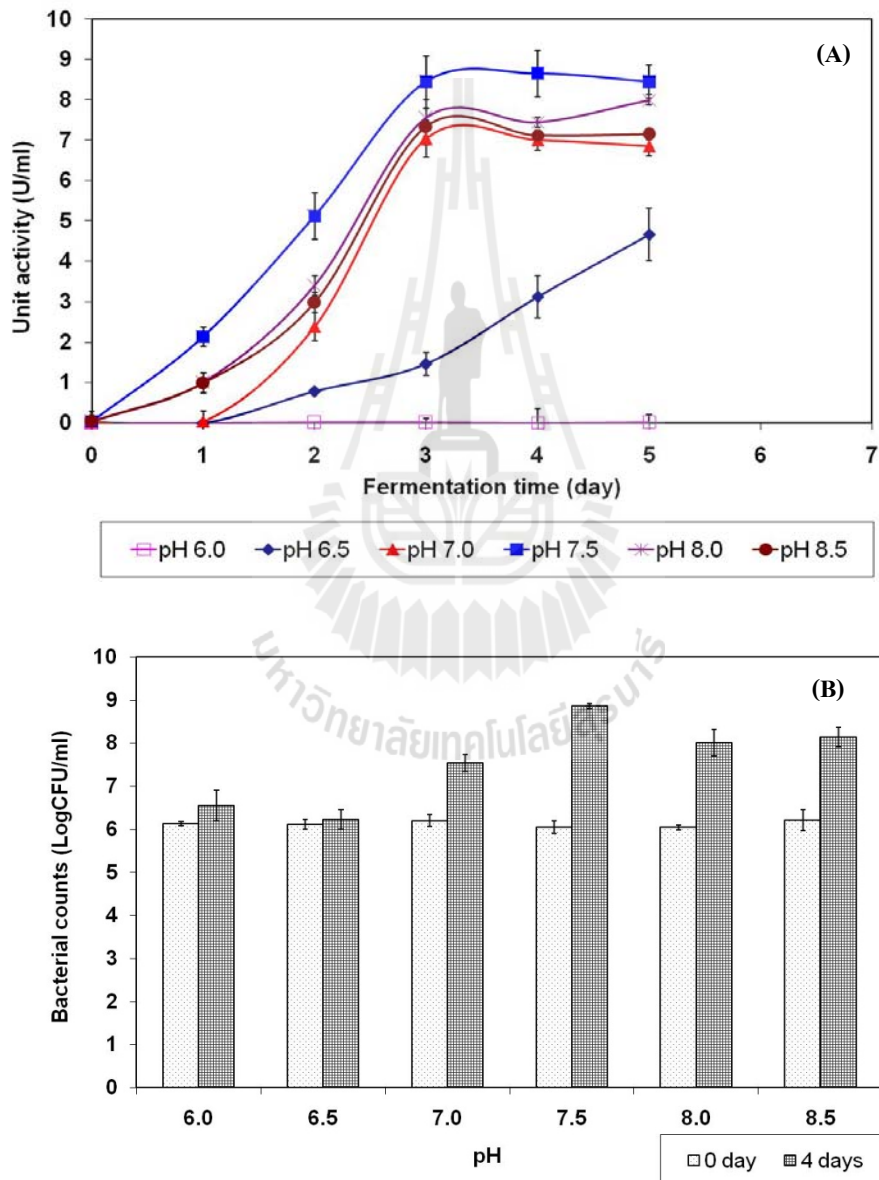
Virgibacillus sp. SK37 สามารถผลิตโปรตีนสได้สูงที่สุดในวันที่ 4 ที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส โดยมีค่ากิจกรรมของโปรตีนสเท่ากับ 6.80 ± 0.35 และ 6.84 ± 0.34 หน่วย/มิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 3.3A) อุณหภูมิที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อสูงสุดคือที่ 40 องศาเซลเซียส

และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 45 องศาเซลเซียส พบว่ามีการสร้างโปรตีนและการเจริญของเชื้อลดลง (รูปที่ 3.3B) แสดงว่าอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างโปรตีนและการเจริญของ *Virgibacillus* sp. SK37 ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Sinsuwan และคณะ (2008) ที่พบว่าในอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างโปรตีนของ *Virgibacillus* sp. SK33



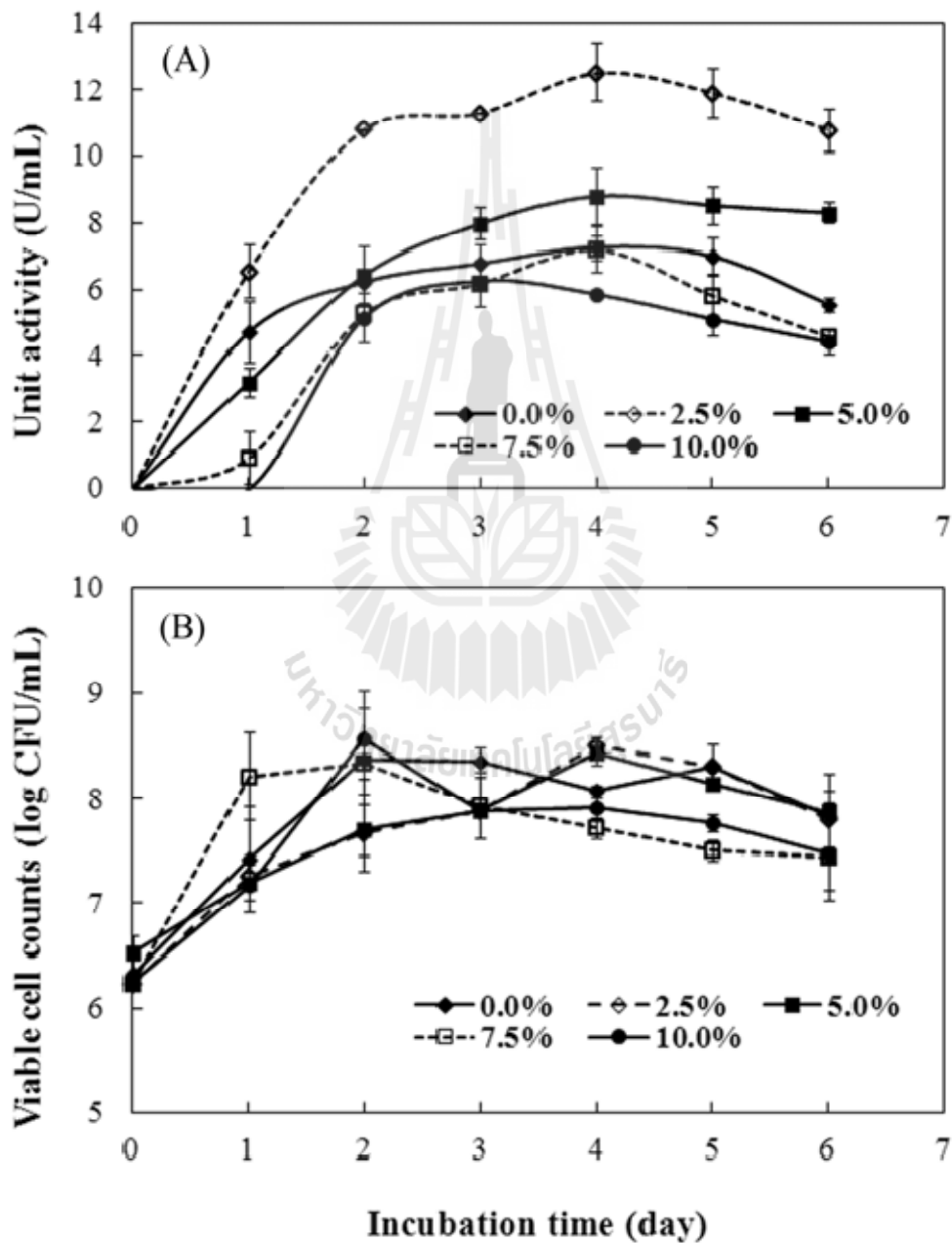
รูปที่ 3.3 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของโปรตีนที่หลั่งออกนอกเซลล์ (A) และการเจริญเติบโตของเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 (B)

เมื่อศึกษาผลของพีเอชที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 5% และบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการสร้างโปรตีนมากที่สุดคือที่พีเอช 7.5 (รูปที่ 3.4, $P < 0.05$) เมื่อพิจารณาที่พีเอช 8.0 และพีเอช 8.5 พบว่ามีการสร้างโปรตีนลดลง อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอช 6.0 และ 6.5 ไม่เหมาะสมต่อการสร้างโปรตีนและการเจริญของเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 (รูปที่ 3.4) Ryu (1994) รายงานถึงอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างโปรตีนของแบคทีเรียที่ชอบเกลือ *Halobacterium* sp. PB407 และหรือ *H. halobium* ATCC43214 คือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่พีเอช 7.0



รูปที่ 3.4 ผลของ pH ต่อกิจกรรมของโปรตีนที่หลั่งออกมานอกเซลล์ (A) และการเจริญเติบโตของเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 (B)

เมื่อศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการสร้างโปรตีนที่พีเอช 7.5 บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0-6 วัน ที่เกลือระดับ 0% คือ ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งในตัวอย่างกากยีสต์มีปริมาณเกลืออยู่ประมาณ 0.46% ดังนั้นในอาหารที่ไม่เติมเกลือจึงมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์จากกากยีสต์อยู่เล็กน้อย จากผลการทดลองพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือ 2.5% บ่มเป็นเวลา 4 วัน เป็นระดับที่เหมาะสมต่อการสร้างโปรตีนที่สุดได้ค่ากิจกรรมของโปรตีนประมาณ 12.50 หน่วย/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อาหาร Y-broth ซึ่งได้ค่ากิจกรรมของโปรตีนที่ต่ำกว่า (7.50



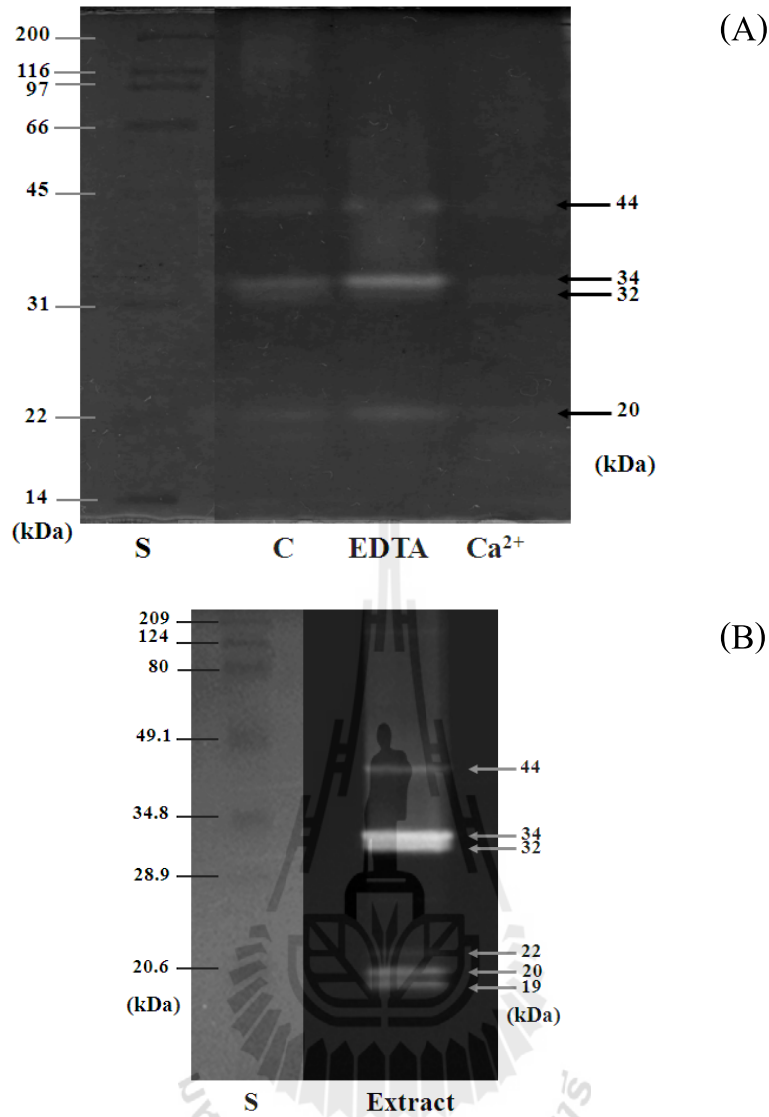
รูปที่ 3.5 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของโปรตีนที่หลั่งออกนอกเซลล์ (A) และการเจริญเติบโตของเชื้อ *Virgibacillus sp. SK37* (B)

หน่วย/มิลลิลิตร) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ มีผลทำให้กิจกรรมของโปรตีนเอสมีค่าลดลง (รูปที่ 3.5A) ที่ความเข้มข้นเกลือ 7.5% พบการเจริญสูงสุดเทียบกับความเข้มข้นเกลืออื่นๆ (รูปที่ 3.5B) ใน 2 วันแรก โดยมีปริมาณเซลล์อยู่ที่ 8.21 Log CFU/มิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *Virgibacillus* sp. SK37 เป็นแบคทีเรียชอบเกลือ นอกจากนี้ *Virgibacillus* sp. SK37 ความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างโปรตีนเอสของ *Virgibacillus* sp. SK37 ต่ำกว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* อื่นๆ โดยความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างโปรตีนเอสของ *B. halophilus* และ *B. salexigens* คือ 15 และ 10% ตามลำดับ (Garabito et al., 1997; Kim et al., 2006)

3.2 ลักษณะทางชีวเคมีของโปรตีนเอสที่ตรึงอยู่กับเซลล์

3.2.1 การสกัดโปรตีนเอสที่ตรึงอยู่กับเซลล์

ไซโมแกรม (Zymogram) ของเอนไซม์โปรตีนเอสจาก *Virgibacillus* sp. SK37 เมื่อใช้ fluoregenic peptide เป็นสารตั้งต้นปรากฏแถบสีซึ่งแสดงถึงแถบของโปรตีนเอส พบว่าการสกัดเอนไซม์โปรตีนเอสโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-มาเลต (Tris-maleate), พีเอช 7 แชนจ์เย็น ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ผสมสารละลายเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิดความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สามารถสกัดเอนไซม์โปรตีนเอสออกมาได้ดีกว่าการสกัดโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-มาเรอ (Tris-maleate), พีเอช 7 แชนจ์เย็นที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ผสมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และที่สกัดโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-มาเลต (Tris-maleate), พีเอช 7 แชนจ์เย็นที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ แต่เพียงอย่างเดียว เนื่องจากเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิด (EDTA) มีผลจับยึดแคลเซียมไอออนเพิ่มการย่อยสลายตัวเองโดยเอนไซม์ ในแบคทีเรียกรดแล็กติกการใช้บัฟเฟอร์ที่ปราศจาก Ca^{2+} โดยการเติมสารละลายเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิด (EDTA) มีผลส่งเสริมการปลดปล่อยโปรตีนเอสที่ตรึงอยู่กับเซลล์ เนื่องจากเหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายตัวเองของโปรตีนเอส อย่างไรก็ตามการปลดปล่อยโปรตีนเอสที่ตรึงอยู่กับเซลล์จะแตกต่างกันตามแต่ละชนิดของแบคทีเรีย การแยก PrtL cell-bound proteinase จาก *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL581 สามารถทำได้โดยใช้ค่าพีเอชที่มากกว่าหรือเท่ากับ 6 และอุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส ในขณะที่การแยกโปรตีนเอสที่ตรึงอยู่กับเซลล์ จาก *Bacillus cereus* สามารถทำได้โดยสารลดแรงตึงผิว sulfobetain SB-12 (Fricke et al., 1995) และการแยกโปรตีนเอสที่ตรึงอยู่กับเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK33 ที่ได้ผลคือการใช้ไลโซไซม์ (Sinsuwan et al., 2011) เมื่อพิจารณาไซโมแกรมของสารตั้งต้นสังเคราะห์พบว่ามวลโมเลกุลของเอนไซม์ที่พบในการศึกษานี้คือ 20 32 34 และ 44 กิโลดาลตัน และเอนไซม์ที่มีขนาดขนาด 32 และ 34 กิโลดาลตัน เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นสังเคราะห์ได้มากที่สุด

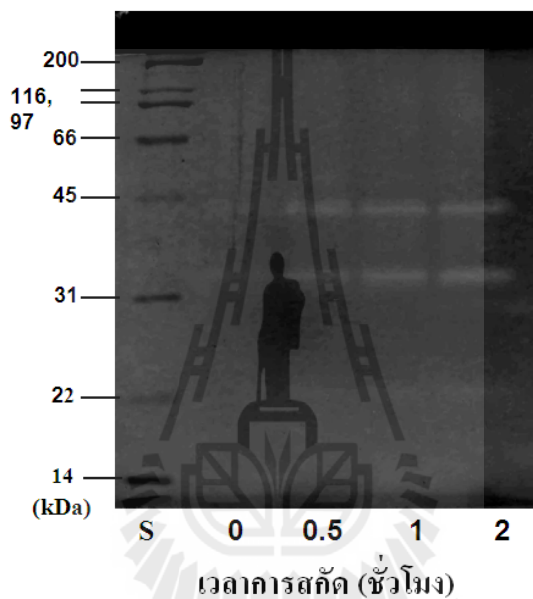


รูปที่ 3.6 ไซโมแกรมของเอนไซม์โปรตีนเอสที่สกัดจาก *Virgibacillus* sp. SK37 โดยใช้เคซีนเป็นสารตั้งต้น (A) และ ใช้ succinyl (Suc)-Ala-Ala-Pro-Phe-7-amino-4-methylcoumarin (AMC) เป็นสารตั้งต้น (B) S คือสารมาตรฐาน C คือ ตัวอย่างควบคุม EDTA คือเอนไซม์โปรตีนเอสที่สกัดด้วยสารละลาย ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 10 mM Ca²⁺ คือตัวอย่างที่สกัดด้วยสารละลาย CaCl₂ ความเข้มข้น 10 mM Extract คือเอนไซม์โปรตีนเอสสกัด

จากรูปที่ 3.6(B) พบว่าการใช้ succinyl (Suc)-Ala-Ala-Pro-Phe-7-amino-4-methylcoumarin (AMC) เป็นสารตั้งต้น (substrate) จะพบแถบโมเลกุลมากกว่าโดยแสดงมวลโมเลกุล 19 20 22 32 34 และ 44 กิโลดาลตัน แสดงให้เห็นถึงความไว (Sensitivity) ของสารตั้งต้นเพปไทด์สังเคราะห์เมื่อเทียบกับโปรตีนเคซีน ขนาดของเอนไซม์ที่ตรวจพบด้วยไซโมแกรมมีขนาดเล็กกว่าที่มีการรายงานในแบคทีเรียกรดแล็กติก (Laan and Konings, 1989) แต่มีขนาดใกล้เคียงกับที่

พบใน *Virgibacillus* sp. SK33 คือ 17, 32, 43, 56 และ 65 กิโลดาลตัน (Sinsuwan et al., 2011)

มวลโมเลกุลของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จากเชื้อ *B. cereus*, *B. subtilis* 168, และ *St. lactis* NCDO 763 คือ 19, 52, และ 80 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (Monnet et al, 1987; Fricke et al, 2001; Marqot and Karamata 1996) ในส่วนโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จากเชื้อ *B. subtilis* IFO 3027, *Lb. helveticus* L89, *Lb. casei* subsp. *casei* IFPL 731 และ *St. cremoris* AC1 มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่คือ 540, 180, 150, และ 145 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (Shimizu et al., 1983; Geis et al., 1985; Martin-Hernandez et al., 1994; Fernandez de Palencia et al., 1997)



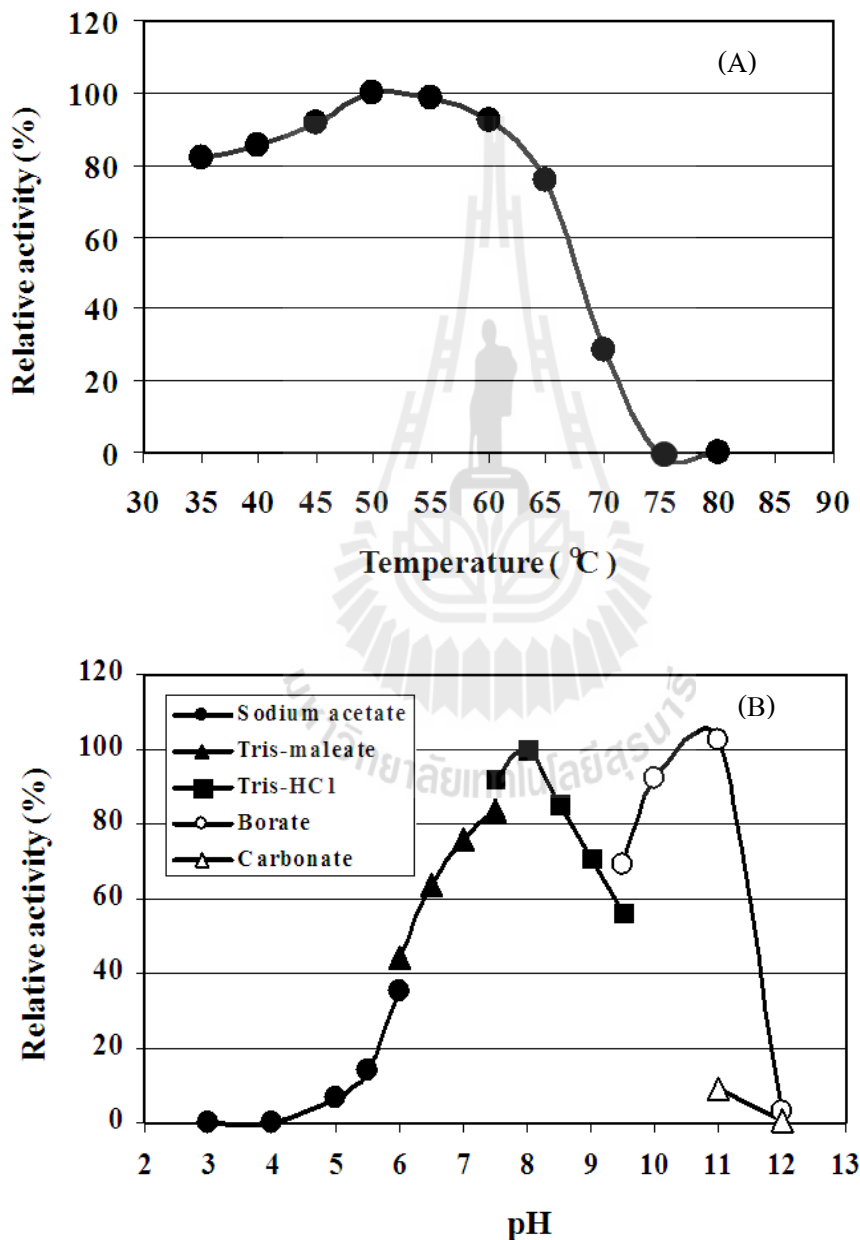
รูปที่ 3.7 ไซโมแกรมของการสกัดเอนไซม์โปรตีนจาก *Virgibacillus* sp. SK37 ด้วยสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ระยะเวลาต่างๆ

สารละลายที่เหมาะสมสำหรับสกัดเอนไซม์โปรตีนจาก *Virgibacillus* sp. SK37 คือ สารละลาย EDTA เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และเมื่อศึกษาระยะเวลาการสกัดที่เหมาะสม พบว่า ระยะเวลาการสกัด 2 ชั่วโมง แถบไซของเอนไซม์โปรตีนมีความเด่นชัดมากกว่าที่ระยะเวลาอื่นๆ (รูปที่ 3.7) ดังนั้นที่ระยะเวลาสกัดโปรตีนสกัดจาก *Virgibacillus* sp. SK37 ที่เหมาะสมคือ 2 ชั่วโมง

3.2.2 อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและเสถียรภาพ

กิจกรรมสูงสุดของโปรตีนที่สกัดจาก *Virgibacillus* sp. SK37 คือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (ดังรูปที่ 3.8A) ซึ่งบ่งชี้ว่าเอนไซม์นี้ สามารถถูกกระตุ้นในช่วงอุณหภูมิสูง ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกแต่ละสายพันธุ์จะ

แตกต่างกัน เช่น เอนไซม์จาก *St. thermophilus*, *St. cremoris* AC1, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397, *Lb. casei* subsp. *casei* IFPL 731 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 37–42 องศาเซลเซียส (Geis et al, 1985; Laloi et al, 1991; Shahbal et al, 1993; Fernandez de Palencia et al, 1997) จากการศึกษพบว่าเอนไซม์โปรตีนเอสจาก *Virgibacillus* sp. SK37 มีค่ากิจกรรมสูงในช่วงอุณหภูมิกว้างที่ 35–60 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจทำให้สามารถประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 30–40 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3.8 อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของโปรตีนเอสที่สกัดจากเซลล์ *Virgibacillus* sp. SK37

ฟิเอร์ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนสกัดจาก *Virgibacillus* sp. SK37 คือ 11 (ดังรูปที่ 3.8B) ซึ่งเหมือนกับเอนไซม์จาก *B. subtilis* IFO 3027 (Shimizu et al, 1983) เป็นที่น่าสังเกตว่าฟิเอร์ที่เหมาะสมของ *Virgibacillus* sp. SK37 มีค่าเท่ากับ *Virgibacillus* sp. SK33 (Sinsuwan et al, 2011) แต่อย่างไรก็ตามฟิเอร์ที่เหมาะสมของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกเช่น *Lb. casei*, *St. cremoris* AC1, และ *Lb. casei* subsp. *casei* IFPL 731 จะอยู่ในช่วงฟิเอร์ที่ 5.5-6 (Geis et al, 1985; Naes et al, 1991; Fernandez de Palencia et al, 1997)

3.2.3 ผลของสารยับยั้งและอืออน

PMSF ซึ่งเป็นสารยับยั้งโปรตีนในกลุ่่มซีรีน (Serine proteinases) สามารถยับยั้งกิจกรรมของโปรตีนโดยสมบูรณ์ (ตารางที่ 3.2) แต่อย่างไรก็ตาม สารยับยั้งโปรตีนในกลุ่่มซีรีนและซิสเทอีน (Serine and cysteine proteinases) คือ Leupeptin และสารยับยั้งโปรตีนในกลุ่่มไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) คือ TPCK สามารถยับยั้งกิจกรรมของโปรตีนได้เพียง 30-40% ส่วนสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin-like proteinase) ได้แก่ soybean trypsin inhibitor (SBTI) และ TLCK สารยับยั้งโปรตีนในกลุ่่มซิสเทอีน (E-64, Iodoacetate และ NEM) โปรตีนในกลุ่่มเอซิด (Pepstatin A) และ โปรตีนในกลุ่่มเมทาโล (EDTA, L-histidine, Imidazole และ Bestatine) ยับยั้งกิจกรรมของโปรตีนเพียงเล็กน้อย ผลการทดลองบ่งชี้ว่าโปรตีนที่สกัดจาก *Virgibacillus* sp. SK37 เป็นซีรีนโปรตีน

ตารางที่ 3.2 ผลของสารยับยั้งและอืออนต่อค่ากิจกรรมของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จาก

Virgibacillus sp. SK37

Substance	Targeted proteinase	Final concentration	Relative activity (%) ^a
Leupeptin	Serine and cysteine proteinases	100 μ M	69
SBTI	Trypsin-like proteinase	0.02 mg/mL	84
TLCK	Trypsin-like proteinase	100 μ M	77
TPCK	Chymotrypsin-like proteinase	100 μ M	64
PMSF	Serine proteinase	1 mM	0
EDTA	Metalloproteinase	10 mM	101
L-histidine	Metalloproteinase	10 mM	101
Imidazole	Metalloproteinase	10 mM	95
Bestatine	Metallo aminopeptidase	10 μ M	93
Pepstatine A	Acid proteinase	10 μ M	75
E-64	Cysteine proteinase	10 μ M	98
Iodoacetate	Cysteine proteinase	1 mM	92
N-et	Cysteine proteinase	1 mM	98
DTT		10 mM	82
β -ME		10 mM	88

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

Substance	Targeted proteinase	Final concentration	Relative activity (%) ^a
Mono- and di-valent cations			
Li ⁺		10 mM	103
Na ⁺		10 mM	98
K ⁺		10 mM	97
Mg ²⁺		10 mM	149
Ca ²⁺		10 mM	140
Sr ²⁺		10 mM	141
Ba ²⁺		10 mM	139
Metal ions			
Cu ⁺		1 mM	97
Cd ⁺		1 mM	125
Fe ²⁺		1 mM	83
Mn ⁺		1 mM	115
Hg ⁺		1 mM	83
Zn ⁺		1 mM	121

^a Maximum activity was taken as 100%

3.2.4 ความจำเพาะต่อสารตั้งต้น

กิจกรรมของโปรตีนเอสต่อสารตั้งต้นสังเคราะห์ชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 3.3 เอนไซม์สกัดจาก *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นสังเคราะห์ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC ได้สูงสุด ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเอนไซม์โปรตีนเอสในกลุ่มไคโมทริปซิน และซบติลิสิน (Chymotrypsin-like and subtilisin-like) (Graycar et al., 2004) เนื่องจากสามารถย่อยสลายสารตั้งต้นที่มีกรดอะมิโนที่เป็นอะโรมาติก (Aromatic amino acid) ในตำแหน่ง P1 ได้ดี ส่วน Boc-Val-Leu-Lys-AMC และ Boc-Gln-Ala-Arg-AMC ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของพลาสมิน (Plasmin) และทริปซิน ถูกย่อยสลายได้น้อยมาก ในขณะที่ Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อเอนไซม์ แอลฟาทรอมบิน (α -Thrombin) และ ทริปซิน (Trypsin) สารตั้งต้นที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อคาเทพซิน-บี (Cathepsin B) และคาเทพซิน-แอล (Cathepsin L) ซึ่งได้แก่ Z-Arg-Arg-AMC และ Z-Phe-Arg-AMC ตามลำดับ ไม่สามารถถูกย่อยสลายโดยโปรตีนเอสสกัดจาก *Virgibacillus* sp. SK37

ผลของสารตั้งต้นสอดคล้องกับผลของสารยับยั้งซึ่ง แสดงลักษณะของซบติลิสิน (Subtilisin-like characteristics) มีรายงานว่าโปรตีนเอสที่หลั่งจากเซลล์ของ *Filobacillus* sp. RF2-5 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารตั้งต้นที่มี phenylalanine methionine และ threonine ในตำแหน่ง P₁ ได้ดี (Hiraga et al, 2005) ในขณะที่โปรตีนเอสจาก *Halobacillus* sp. SR5-3 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารตั้งต้นที่มี leucine, glutamine และ alanine ในตำแหน่ง P₁ ได้ดี (Namwong et al, 2006)

โปรตีนจาก *B. licheniformis* SMI 4.C.1 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารตั้งต้นที่มี phenylalanine และ leucine ในตำแหน่ง P₁ ได้ดี (Manachini and Fortina 1998) ในขณะที่โปรตีนจาก *B. thermoruber* สามารถย่อยสลายสารตั้งต้น Z-Ala-Ala-Leu-p nitroanilide (pNA) ซึ่งเป็นลักษณะของโปรตีนที่อยู่ในของซับทิลิซิน (Subtilisin-like) (Manachini et al., 1988) นอกจากนี้โปรตีนจาก *Bacillus* sp. PS 719 ยังสามารถย่อยสลายสารตั้งต้นที่มี arginine ในตำแหน่ง P₁ ได้ดี ซึ่งเป็นลักษณะของโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มทริปซิน (Trypsin-like) (Hutadilok-Towatana et al., 1999)

ตารางที่ 3.3. ความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จาก *Virgibacillus* sp. SK37

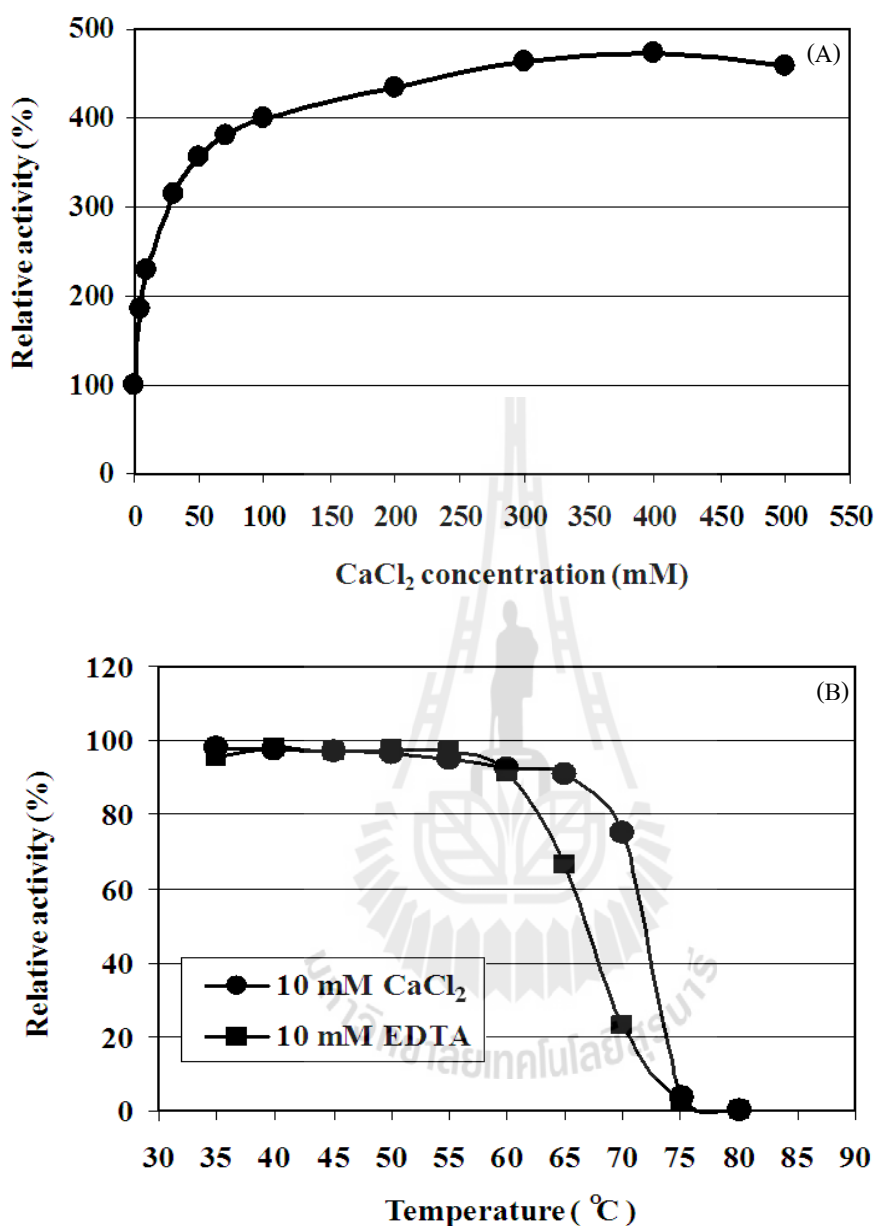
Synthetic substrates	Specificity	Relative activity (%)
Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC	Trypsin-like, α -thrombin-like	0
Boc-Gln-Ala-Arg-AMC	Trypsin-like	1
Boc-Val-Leu-Lys-AMC	Plasmin-like	1
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC	Chymotrypsin-like, subtilisin-like	100
Z-Phe-Arg-AMC	Cathepsin L-like	0
Z-Arg-Arg-AMC	Cathepsin B-like	0

^a Maximum activity was taken as 100%

3.2.5 ผลของแคลเซียมคลอไรด์

การเพิ่มความเข้มข้นของ Ca²⁺ ส่งผลให้ค่ากิจกรรมของโปรตีนเพิ่มขึ้น (รูปที่ 3.9A) โดยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ความเข้มข้นของ Ca²⁺ ตั้งแต่ 0-100 มิลลิโมลาร์ และ เพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ความเข้มข้น 200-500 มิลลิโมลาร์ ผลของ Ca²⁺ ต่อกิจกรรมของโปรตีนจากแบคทีเรียแตกต่างกันตามสายพันธุ์ ซึ่งกิจกรรมของโปรตีนจาก *Bacillus* sp. PS719 มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ Ca²⁺ มีค่ามากกว่า 2 มิลลิโมลาร์ ขึ้นไป (Hutadilok-Towatana et al., 1999) กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนจาก *Salinivibrio costicala* 18AG จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ที่ความเข้มข้นของ Ca²⁺ 2 มิลลิโมลาร์ (Lama et al., 2005) ในขณะที่กิจกรรมของโปรตีนจาก *Halobacterium halobium* S9 เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ที่ความเข้มข้นของ Ca²⁺ ในระดับ 1 มิลลิโมลาร์ (Capiralla et al., 2002) อย่างไรก็ตามเอนไซม์โปรตีนจาก *Pseudoalteromonas* sp. CP76 ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบเกลือปานกลาง (Moderately halophilic bacteria) จะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นของ Ca²⁺ ที่ 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ (Sanchez-Porro et al., 2003) นอกจากนี้ Ca²⁺ ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนจาก

Salinivibrio sp. AF-2004 และ *Bacillus subtilis* Y-108 (Yang et al, 2000; Karbalaeei-Heidari et al, 2007) ผลของแคลเซียมต่อกิจกรรมจึงแตกต่างกันตามแหล่งของเอนไซม์



รูปที่ 3.9 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรม และความคงทนต่ออุณหภูมิของเอนไซม์โปรตีนสจาก *Virgibacillus* sp. SK37

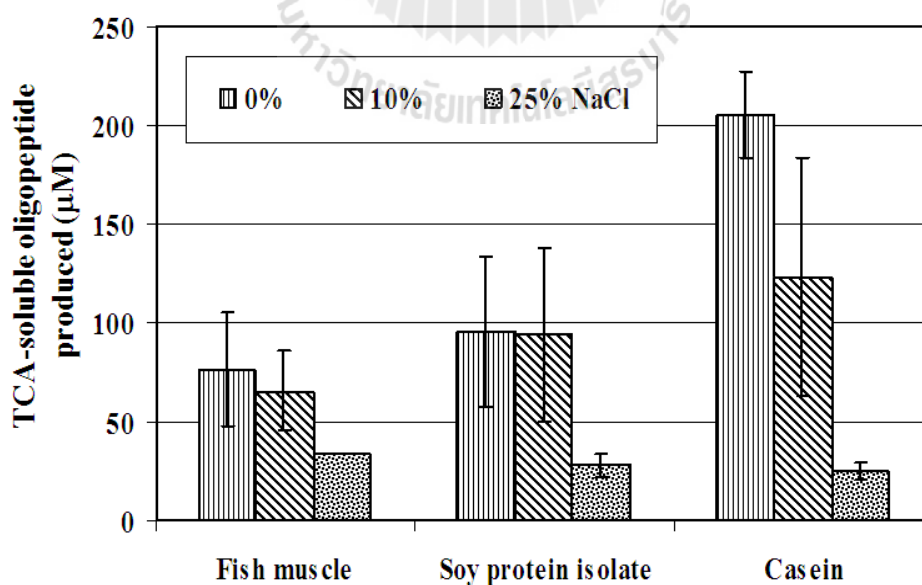
เอนไซม์โปรตีนสจาก *Virgibacillus* sp. SK37 ในสารละลาย Ca^{2+} เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เสถียรภาพอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 35-65 องศาเซลเซียส แต่กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 75% ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในขณะที่เอนไซม์โปรตีนสจาก *Virgibacillus* sp. SK37 ในสารละลาย EDTA เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ มีเสถียรภาพต่ำกว่าคือแสดงกิจกรรมสูงเฉพาะที่ 35-60 องศาเซลเซียส

และกิจกรรมจะลดลงเหลือ 20% ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 3.9B ผลดังกล่าวแสดงว่า Ca^{2+} มีผลช่วยเพิ่มเสถียรภาพของเอนไซม์

ผลของ Ca^{2+} ต่อความคงทนต่ออุณหภูมิของเอนไซม์โปรตีนสแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ (Strains) ความคงทนต่ออุณหภูมิของ *B. mojavensis* จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Ca^{2+} จนถึง 10 มิลลิโมลาร์ (Beg and Gupta 2003) ความคงทนต่ออุณหภูมิของโปรตีนสแตกจาก *B. stearothermophilus* F1 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ Ca^{2+} จนถึง 20 มิลลิโมลาร์ (Rahman et al, 1994) ในขณะที่ความคงทนต่ออุณหภูมิของโปรตีนสแตกจาก *Bacillus* sp. KSM-K16 จะเพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้นของ Ca^{2+} ในระดับ 5 มิลลิโมลาร์ (Kobayashi et al, 1994) โปรตีนสแตกจาก *Virgibacillus* sp. SK37 มีความคงทนต่ออุณหภูมิสูงเมื่อมีแคลเซียมไอออน

3.2.6 ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์

ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของการย่อยสลายโปรตีนของเอนไซม์ โดยใช้สารตั้งต้น กล้ามเนื้อปลา โปรตีนถั่วเหลืองสกัด และเคซีน แสดงดังรูปที่ 3.10 การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ทำให้ค่ากิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนเพิ่มขึ้น โดยโปรตีนสแตกจาก *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถย่อยเคซีนได้ดีที่สุดที่โซเดียมคลอไรด์ 0 และ 10% ส่วนที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนของโปรตีนสแตกจาก *Virgibacillus* sp. SK37 ลดลง โดยสามารถย่อยโปรตีนตั้งต้นทั้งสามชนิดไม่ต่างกัน ($P>0.05$) มีรายงานกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนสแตกจาก *St. thermophilus* CNRZ 385 และ *Lc. lactis* subsp. *cremoris* SK11

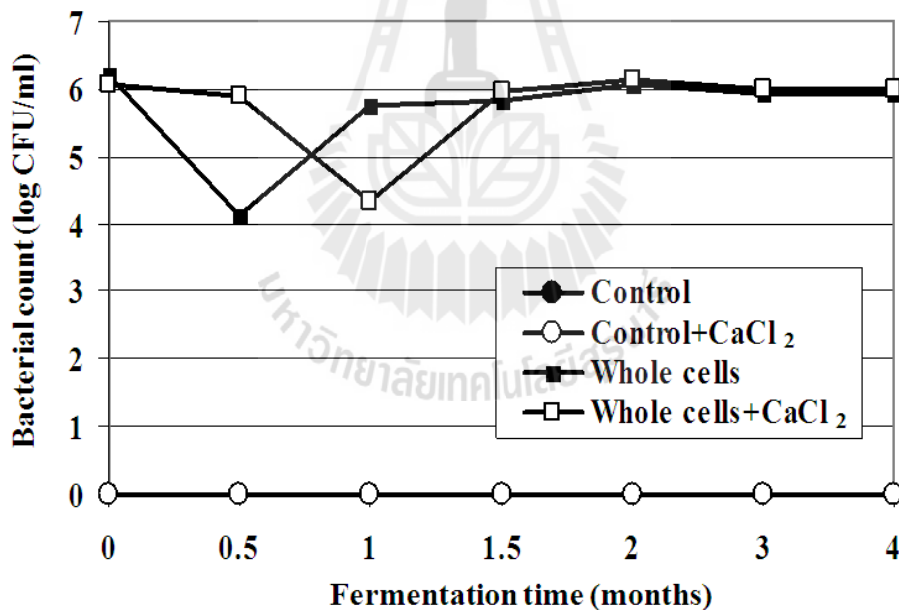


รูปที่ 3.10 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการย่อยสลายโปรตีนปลา โปรตีนถั่วเหลืองสกัด และเคซีนของโปรตีนสแตกจาก *Virgibacillus* sp. SK37

มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นที่ 7 และ 9.4% ตามลำดับ (Exterkate 2000; Fernandez-Espla et al., 2000) งานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าโปรตีนสกัดจาก *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถย่อยสลายโปรตีนทั้งในสภาวะที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์และที่มีโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 25% ดังนั้นเอนไซม์จึงอาจมีผลต่อการย่อยโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาซึ่งเป็นสภาวะที่มีเกลือสูง

3.3 บทบาทของโปรตีนสกัดจาก *Virgibacillus* sp. SK37 ต่อการย่อยปลากระตัก

การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียระหว่างกระบวนการหมัก เมื่อวิเคราะห์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 15% แสดงดังรูปที่ 3.11 ตัวอย่างปลากระตักที่เติมเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2% มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 6 Log CFU/มิลลิลิตร ในช่วง 4 เดือนแรก ยกเว้นเดือนที่ 1 ประชากรแบคทีเรียลดลงประมาณ 1.8 Log CFU/มิลลิลิตร ส่วนตัวอย่างปลากระตักที่เติมเซลล์ *Virgibacillus* sp. SK37 โดยไม่เติมแคลเซียมคลอไรด์มีการเจริญของแบคทีเรียในทำนองเดียวกัน โดย



รูปที่ 3.11 การเปลี่ยนแปลงประชากรแบคทีเรียด้วยเทคนิค spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 15%; Control คือ ปลากระตักไม่เติมเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37, Control+CaCl₂ คือปลากระตักเติม CaCl₂ ในระดับ 0.2%, Whole cells คือตัวอย่างปลากระตักที่เติมเซลล์ (whole cell) ของ *Virgibacillus* sp. SK37, Whole cells + CaCl₂ คือ ตัวอย่างที่เติมเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 และ CaCl₂ เข้มข้น 0.2%

มีประชากรแบคทีเรียในช่วง 4 เดือนแรกที่ 6 Log CFU/มิลลิลิตร และสัปดาห์ที่ 2 มีประชากรเชื้อแบคทีเรียลดลงประมาณ 2 Log CFU/มิลลิลิตร ส่วนตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างควบคุมที่เติมแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2% ไม่พบประชากรแบคทีเรียตั้งแต่เดือนที่ 0-4 แสดงว่าแบคทีเรียที่ตรวจนับได้ในตัวอย่างมีแนวโน้มสูงที่จะเป็น *Virgibacillus* sp. SK37 ที่เติมลงไป แม้ว่าตัวอย่างที่เติม *Virgibacillus* sp. SK37 ไม่ได้มีประชากรแบคทีเรียเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนเพิ่มขึ้นมากกว่าตัวอย่างควบคุม (ตัวอย่างที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ) ดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α -Amino group) ของน้ำปลาที่เติม *Virgibacillus* sp. SK37 ที่มีและไม่มีแคลเซียมคลอไรด์ ในระดับ 0.2% โดยน้ำหนัก

Fermentation time (month)	State of sample	α -Amino acid group ¹			
		Control	Control+CaCl ₂	Cell pellets	Cell pellets +CaCl ₂
0		0.072 ± 0.002 ^a	0.070 ± 0.006 ^a	0.108 ± 0.009 ^a	0.112 ± 0.019 ^a
0.5	Mash	0.386 ± 0.011 ^b	0.415 ± 0.017 ^b	0.520 ± 0.017 ^b	0.467 ± 0.110 ^b
1		0.375 ± 0.025 ^b	0.468 ± 0.006 ^c	0.538 ± 0.009 ^b	0.567 ± 0.001 ^b
1.5		819 ± 25 ^A	916 ± 5 ^A	910 ± 1 ^A	938 ± 45 ^A
2	Liquid	979 ± 11 ^B	949 ± 5 ^B	1205 ± 4 ^B	1237 ± 26 ^B
3		1018 ± 3 ^{BC}	1007 ± 4 ^C	1253 ± 1 ^B	1282 ± 7 ^B
4		1099 ± 53 ^B	1157 ± 12 ^D	1395 ± 53 ^C	1520 ± 5 ^C

¹A unit of α -amino acid group in samples at 0-1 and 1.5-4 months was expressed as mmol leucine/g sample and mM leucine, respectively.

Different superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$) in row

การเพิ่มขึ้นของปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนบ่งบอกถึงการย่อยสลายโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาซึ่งอยู่ในรูปของโอลิโกเปปไทด์ (Oligopeptides) และ/หรือกรดอะมิโน (Amino acids) (Adler-Nissen, 1979) เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ปริมาณแอลฟาอะมิโนของน้ำปลาเพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) โดยตัวอย่างที่เติมเซลล์ *Virgibacillus* sp. SK37 และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2% มีปริมาณแอลฟาอะมิโนสูงสุด ที่ระยะเวลาการหมักเดือนที่ 4 ส่วนตัวอย่างปลากะตักควบคุมมีปริมาณแอลฟาอะมิโนต่ำสุด โปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 อาจมีบทบาทต่อการย่อยสลายโปรตีนปลา เนื่องจากเอนไซม์นี้ได้รับการกระตุ้นด้วยแคลเซียมคลอไรด์ ตัวอย่างที่เติมทั้งเซลล์และแคลเซียมคลอไรด์มีปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนสูงสุด ผลการจำลองการ

หมักนี้บ่งชี้ได้ว่า โปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 อาจเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายโปรตีนปลาในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา

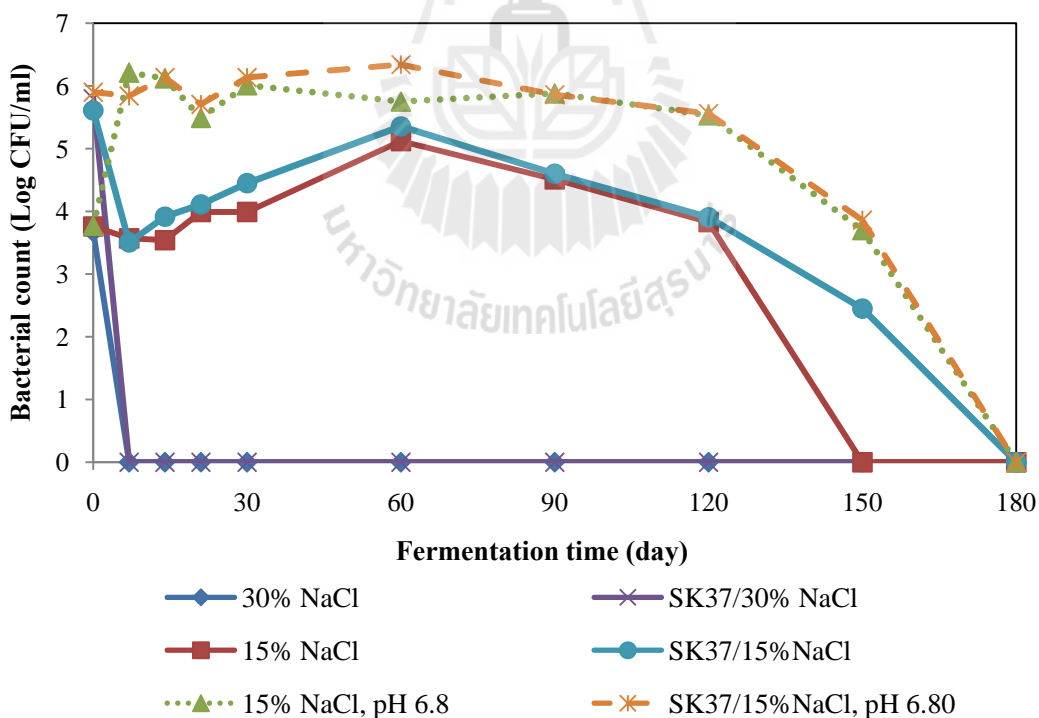
3.4. บทบาทของโปรตีนที่ตรึงกับเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 ต่อกระบวนการหมักน้ำปลาระดับห้องปฏิบัติการ

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำปลาสามารถผลิตโปรตีนที่หลั่งออกนอกเซลล์ (Extracellular proteinase) และโปรตีนที่ตรึงกับเซลล์ (Cell-bound proteinase) โดยแบคทีเรียที่นำมาทดสอบในกระบวนการหมักน้ำปลา คือ *Virgibacillus* sp. SK37 ที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลาเดือนที่ 1 ที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเกลือ 5-20% และผ่านการทดสอบศักยภาพในการใช้เป็นก้ำเชื้อในกระบวนการหมักน้ำปลาระดับห้องปฏิบัติการ แบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 มีรูปร่างเซลล์เป็นท่อนเรียงตัวต่อกันเป็นสายสั้น 2-6 เซลล์ มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ไม่น้อยกว่า 98% กับ *Virgibacillus halodenitrificans* สายพันธุ์อ้างอิง แต่มีลักษณะทางสรีรวิทยาหลายลักษณะที่แตกต่างกัน โดย *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถเจริญได้ที่ pH 6.0-11.0 ในขณะที่ *Virgibacillus halodenitrificans* สายพันธุ์อ้างอิง เจริญได้ที่ pH 5.0-9.0 นอกจากนี้ *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถแสดงกิจกรรมของทั้งโปรตีนที่หลั่งออกนอกเซลล์ และ ตรึงอยู่กับเซลล์ (Sinsuwan *et al.*, 2007, 2008) โดยโปรตีนสามารถแสดงกิจกรรมในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูง (25%) และยังสามารถย่อยสลายพันธะเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนที่หลากหลาย (Broad specificity) มากกว่าโปรตีนทางการค้า นอกจากนี้โปรตีนที่แบคทีเรียนี้ผลิตได้เป็นโปรตีนที่สามารถแสดงกิจกรรมในสภาวะเกลือสูง ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับเอนไซม์ทางการค้าที่มีกิจกรรมลดลงในสภาวะเกลือสูง เนื่องจาก *Virgibacillus* sp. SK37 เจริญได้ดีที่ค่าพีเอชเป็นกลางไปจนถึงด่าง และที่มีความเข้มข้นของเกลือ 5-20% จึงได้เพิ่มสภาวะในกระบวนการหมักน้ำปลาเพื่อเอื้อให้ *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถดำรงอยู่ในกระบวนการหมักได้นานและแสดงกิจกรรมการย่อยได้ดีขึ้น โดยทดลองหมักน้ำปลาโดยใช้เกลือในระดับ 15% และปรับค่าพีเอชของระบบให้มีค่าใกล้เคียงกับความเป็นกลางมากที่สุด และเมื่อนำโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 มาทดสอบการลดระยะเวลาการหมักน้ำปลาได้ผลการศึกษาดังนี้

3.4.1 การเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมัก

การเปลี่ยนแปลงประชากรแบคทีเรียระหว่างกระบวนการหมัก เมื่อวิเคราะห์ด้วยอาหาร JCM 168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% โดยใช้เทคนิค Spread plate จากรูปที่ 3.12 พบว่าแบคทีเรียในตัวอย่างควบคุมทั้ง 3 ตัวอย่าง มีแบคทีเรียเริ่มต้นใกล้เคียงกันคืออยู่ที่ 3.6-3.7 Log CFU/กรัม ในขณะที่ตัวอย่างที่มีการเติมเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นใกล้เคียงกันคือ 5.6-5.9 Log CFU/กรัม และแบคทีเรียที่พบยังมีลักษณะโคโลนีหลากหลายน้อยกว่า

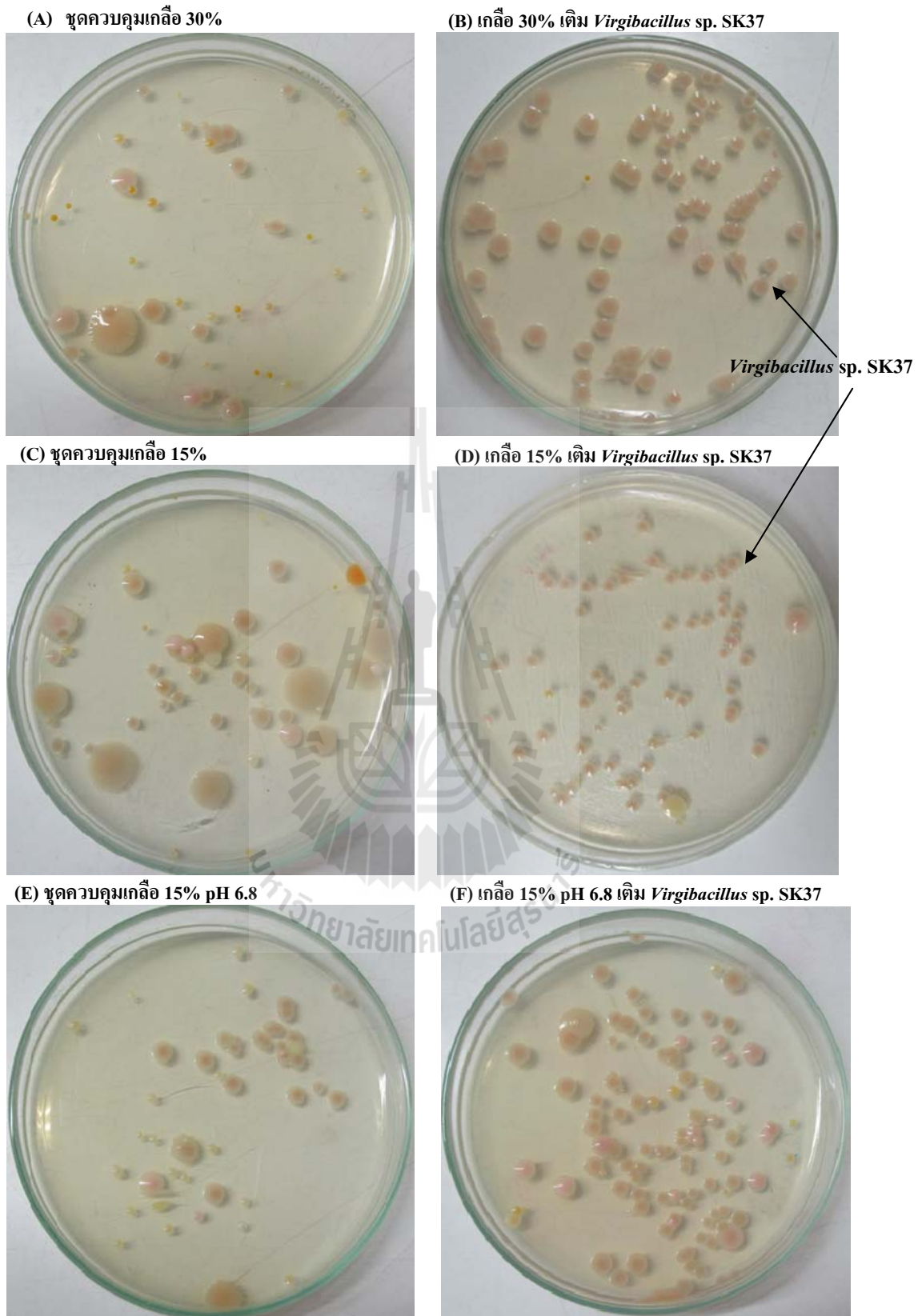
แบคทีเรียในชุดควบคุม (รูปที่ 3.13) เมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป 7 วัน ประชากรแบคทีเรียในตัวอย่างที่หมักสถานะเกลือสูง (ชุดควบคุม, 30% NaCl, และเกลือ 30% เดิม *Virgibacillus* sp. SK37, SK37/30% NaCl) ลดลงจนไม่สามารถตรวจนับได้ (<30CFU/กรัม) ที่ค่าการเจือจาง 2 เท่า และไม่พบแบคทีเรียจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมัก (180 วัน) การลดลงอาจเกิดจากสภาวะการหมักที่เกลือสูง (30%) ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อกลุ่มดังกล่าว สำหรับตัวอย่างในชุดเกลือ 15% ที่เติม *Virgibacillus* sp. SK37 (SK37/15% NaCl) มีจำนวนแบคทีเรียลดลง 2 Log CFU/กรัม ซึ่งใกล้เคียงกับตัวอย่างในชุดควบคุมเกลือ 15% (15% NaCl) ที่มีประชากรแบคทีเรียคงที่ที่ 3.5 Log CFU/กรัม จากนั้นประชากรแบคทีเรียค่อยๆเพิ่มขึ้นที่ระยะการหมัก 60 วัน (5.1-5.3 Log CFU/กรัม) และจำนวนลดลงจนกระทั่งไม่สามารถตรวจนับได้เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก ในขณะที่ประชากรแบคทีเรียในชุดควบคุมของเกลือ 15%, พีเอช 6.8 (15% NaCl, pH 6.8) ในวันที่ 7 ของกระบวนการหมักเพิ่มขึ้นเป็น 6.2 Log CFU/กรัม ซึ่งใกล้เคียงกับประชากรแบคทีเรียในชุดการทดลองที่เติม *Virgibacillus* sp. SK37 ที่สถานะเดียวกัน (SK37/15% NaCl, พีเอช 6.8) (รูปที่ 3.12) ซึ่งมีประชากรจุลินทรีย์คงที่ที่ 5.8 Log CFU/กรัม จนกระทั่งระยะเวลาการหมัก 120 วัน จากนั้นประชากรแบคทีเรียลดลงจนไม่สามารถตรวจนับได้เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก 6 เดือน



รูปที่ 3.12 การเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักน้ำปลาด้วย *Virgibacillus* sp. SK37 ตรวจนับจุลินทรีย์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM 168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10%

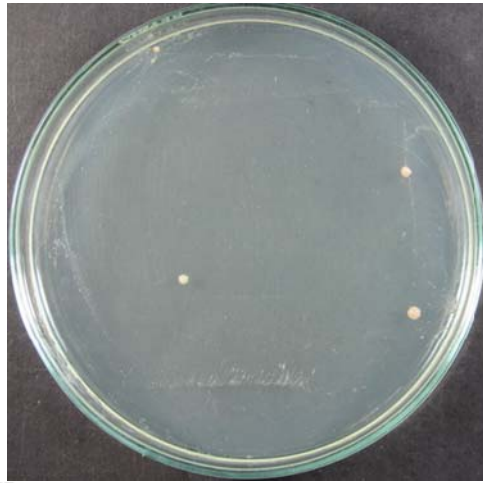
จากโคโลนีที่ตรวจพบบนอาหาร JCM 168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% ในชุดตัวอย่างเกลือ 15% และตัวอย่างเกลือ 15%, พีเอช 6.8 ในช่วงแรกของการหมัก (7-14 วัน) พบว่ามีความหลากหลายของลักษณะโคโลนีเมื่อเปรียบเทียบกับวันเริ่มต้น และยังพบการอยู่รอดของ *Virgibacillus* sp. SK37 ตามลูกศรในรูปที่ 3.2 โดยคุณลักษณะปรากฏของโคโลนีซึ่งมีสีครีมชมพู วาว และมีขอบเรียบ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร และส้อมโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายโคโลนีของ *Virgibacillus* sp. SK37 มาศึกษาสรีระวิทยาเบื้องต้นซึ่งผลที่ได้คือการแสดงออกทางสรีระวิทยาของ *Virgibacillus* sp. SK37 สำหรับ DNA typing ของ *Virgibacillus* sp. SK37 เพื่อนำมาใช้ในการบ่งบอกถึงความอยู่รอดของ *Virgibacillus* sp. SK37 ในระบบการหมักยังอยู่ในระหว่างการศึกษา โคโลนีที่พบในตัวอย่างวันที่ 14 มีลักษณะของ *Virgibacillus* sp. SK37 อยู่น้อยกว่าลักษณะอื่นๆ (รูปที่ 3.13-3.15) และเมื่อกระบวนการหมักผ่านไป ความหลากหลายของลักษณะโคโลนีที่พบลดลงจนกระทั่งเหลืออยู่ 1-2 ลักษณะ คือเป็นโคโลนีสีเหลือง และโคโลนีสีขาวขนาดเล็ก ซึ่งไม่ใช่ลักษณะโคโลนีของ *Virgibacillus* sp. SK37 (รูปที่ 3.16-3.21)

จากผลการทดลองนี้มีความเป็นไปได้ว่าในสถานะที่มีการลดความเข้มข้นของเกลือในระบบหมัก หรือการปรับพีเอชของระบบให้มีค่าพีเอชอยู่ที่ 6.8 ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Virgibacillus* sp. SK37 ไม่สามารถทำให้เชื้อนี้เจริญอยู่ในระบบการหมักได้นานขึ้น แต่ในระบบที่มีการลดความเข้มข้นของเกลือส่งเสริมแบคทีเรียชนิดอื่นให้เจริญมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับหมักที่เติมเกลือในระดับ 30% และการลดความเข้มข้นของเกลือในระบบหมักร่วมกับการปรับพีเอชให้อยู่ที่ 6.8 มีผลเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในระบบหมัก และเป็นสถานะที่เอื้อให้แบคทีเรียสามารถอยู่รอดในระบบหมักได้นาน 150 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับหมักแบบที่เกลือ 30%

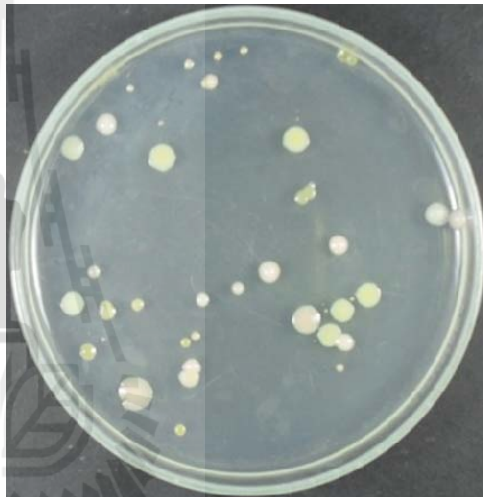


รูปที่ 3.13 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันแรกของการกระบวนการหมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับ 10%

(A) ชุดควบคุมเกลือ 30%

(B) เกลือ 30% เต็ม *Virgibacillus* sp. SK37

(C) ชุดควบคุมเกลือ 15%

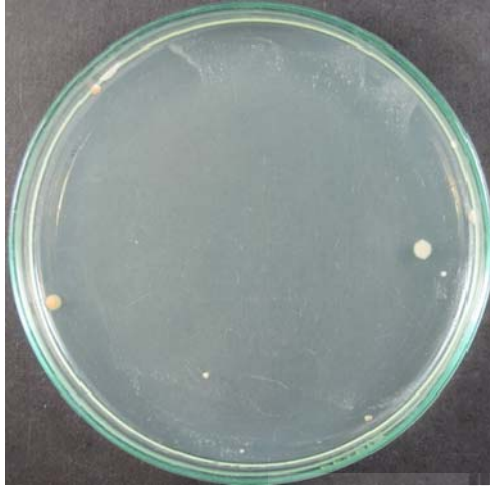
(D) เกลือ 15% เต็ม *Virgibacillus* sp. SK37

(E) ชุดควบคุมเกลือ 15% pH 6.8

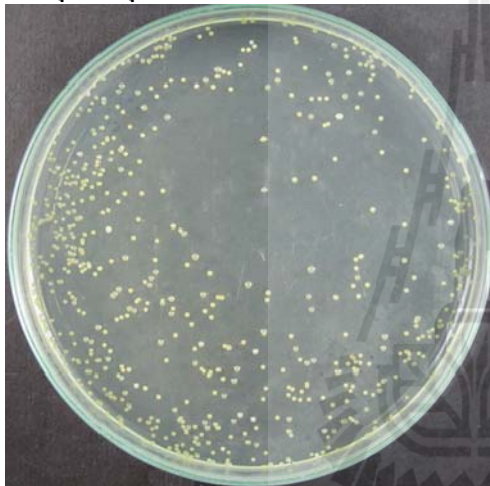
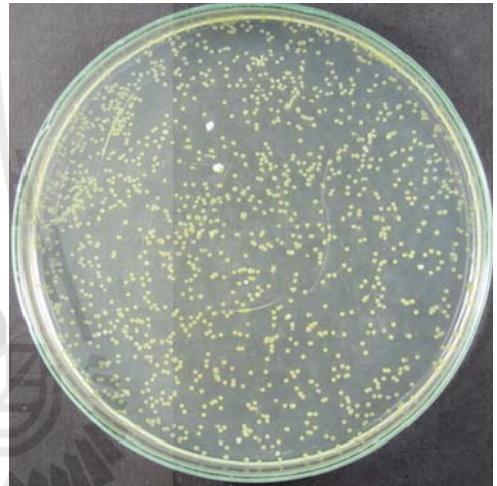
(F) เกลือ 15% pH 6.8 เต็ม *Virgibacillus* sp.

รูปที่ 3.14 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 7 ของกระบวนการหมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับ 10%

(A) ชุดควบคุมเกลือ 30%

(B) เกลือ 30% เติม *Virgibacillus* sp. SK37

(C) ชุดควบคุมเกลือ 15 %

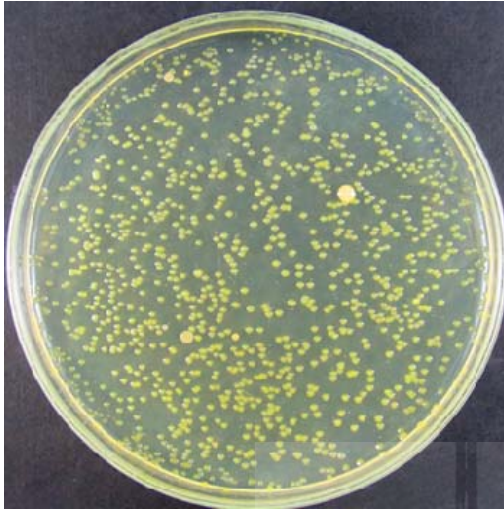
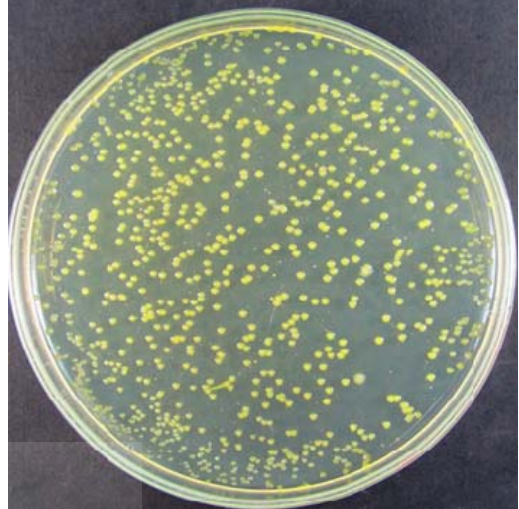
(D) เกลือ 15% เติม *Virgibacillus* sp. SK37

(E) ชุดควบคุมเกลือ 15% pH 6.8

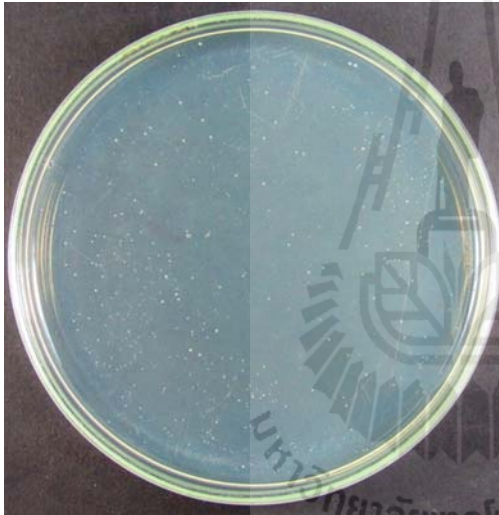
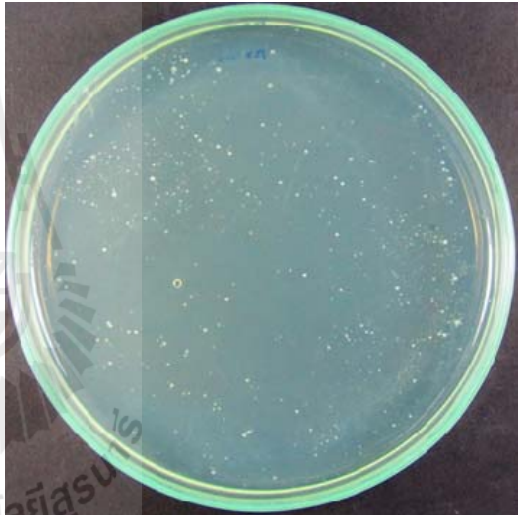
(F) เกลือ 15% pH 6.8 เติม *Virgibacillus* sp. SK37

รูปที่ 3.15 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่เรื้อยที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 14 ของกระบวนการหมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับ 10%

(A) ชุดควบคุมเกลือ 15 %

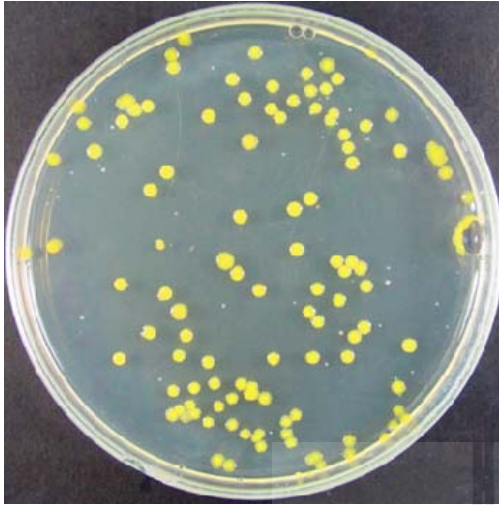
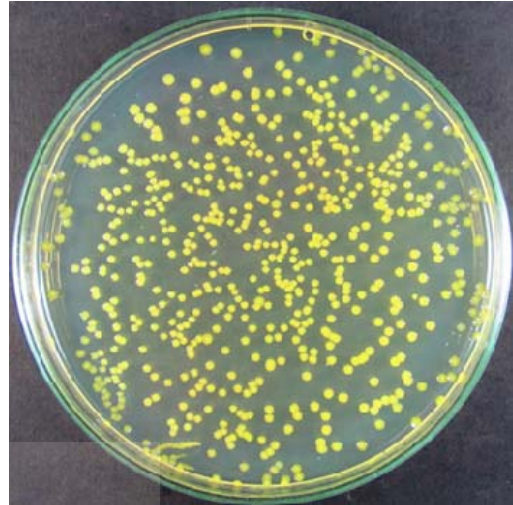
(B) เกลือ 15% เติม *Virgibacillus* sp. SK37

(C) ชุดควบคุมเกลือ 15% pH 6.8

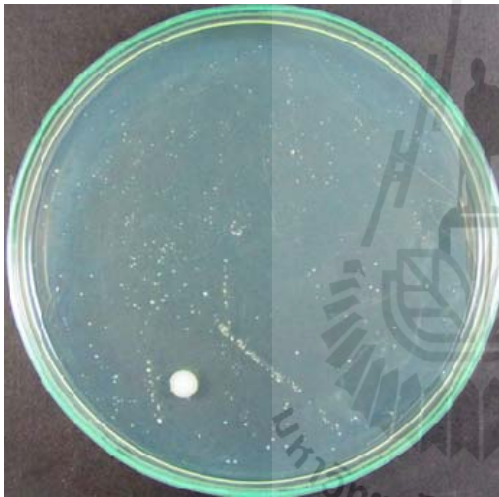
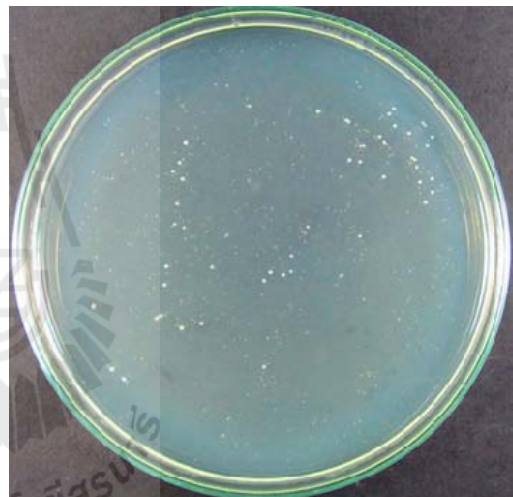
(D) เกลือ 15% pH 6.8 เติม *Virgibacillus* sp. SK37

รูปที่ 3.16 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 21 กระบวนการหมัก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับ 10% (ไม่พบโคโลนีในตัวอย่างชุดควบคุมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 30% และเกลือโซเดียมคลอไรด์ 30% ที่เติม *Virgibacillus* sp. SK37)

(A) ชุดควบคุมเกลือ 15 %

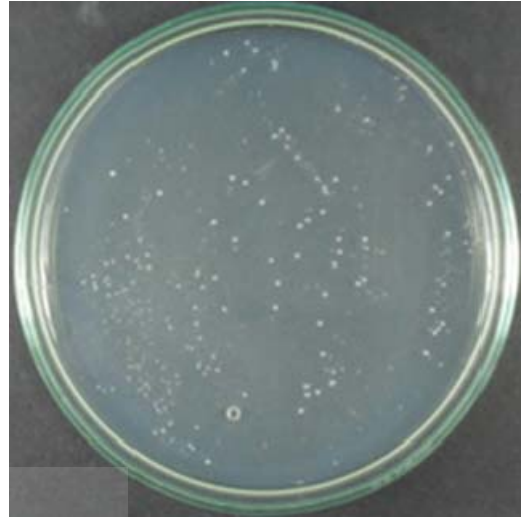
(B) เกลือ 15% เติม *Virgibacillus* sp. SK37

(C) ชุดควบคุมเกลือ 15% pH 6.8

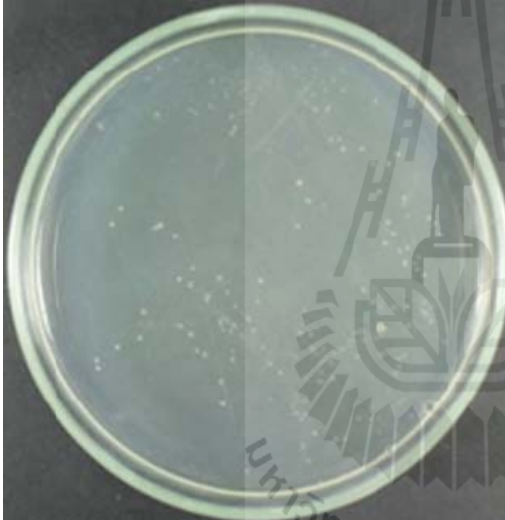
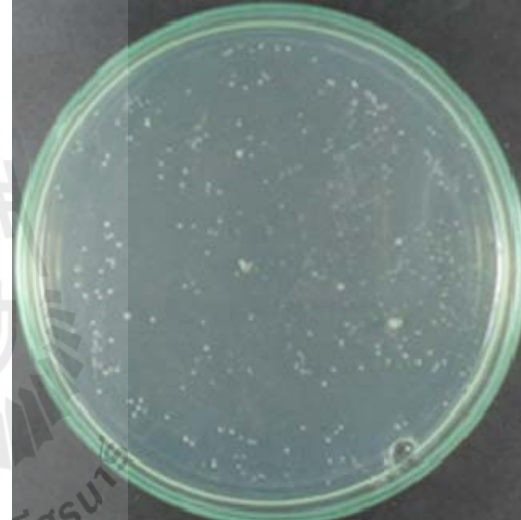
(E) เกลือ 15% pH 6.8 เติม *Virgibacillus* sp. SK37

รูปที่ 3.17 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 30 ของกระบวนการหมัก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดัับ 10% (ไม่พบโคโลนีที่ตัวอย่างชุดควบคุมเกลือ 30% และตัวอย่างที่เติมเกลือ 30% และ *Virgibacillus* sp. SK37)

(A) ชุดควบคุมเกลือ 15 %

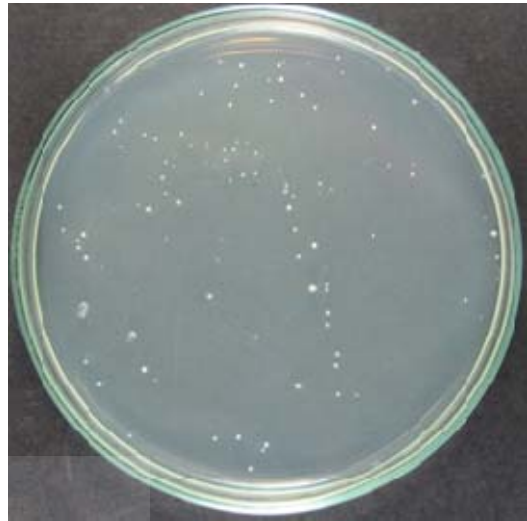
(B) เกลือ 15% เติม *Virgibacillus* sp. SK37

(C) ชุดควบคุมเกลือ 15% pH 6.8

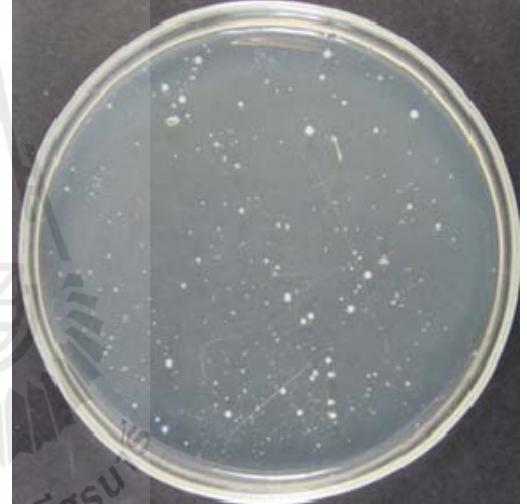
(D) เกลือ 15% pH 6.8 เติม *Virgibacillus* sp. SK37

รูปที่ 3.18 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 60 ของกระบวนการหมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับ 10% (ไม่พบโคโลนีที่ตัวอย่างชุดควบคุมเกลือ 30% และตัวอย่างที่เติมเกลือ 30% และ *Virgibacillus* sp. SK37)

(A) ชุดควบคุมเกลือ 15 %

(B) เกลือ 15% เติม *Virgibacillus* sp. SK37

(C) ชุดควบคุมเกลือ 15% pH 6.8

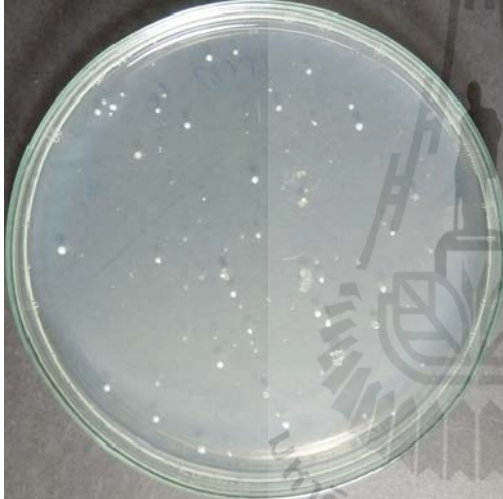
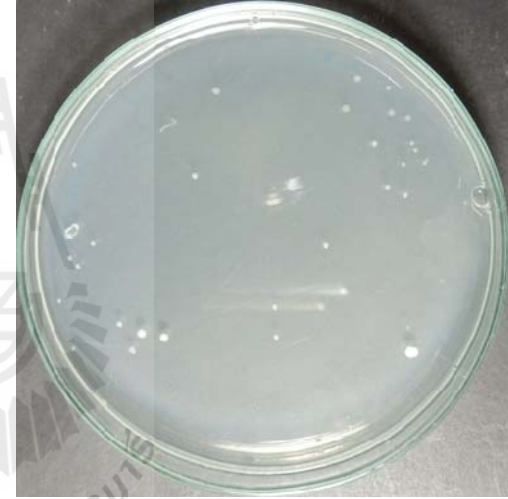
(D) เกลือ 15% pH 6.8 เติม *Virgibacillus* sp. SK37

รูปที่ 3.19 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาระหว่างในวันที่ 90 ของกระบวนการหมัก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ใน ระดับ 10% (ไม่พบโคโลนีที่ตัวอย่างชุดควบคุมเกลือ 30% และตัวอย่างที่เติมเกลือ 30% และ *Virgibacillus* sp. SK37)

(A) ชุดควบคุมเกลือ 15 %

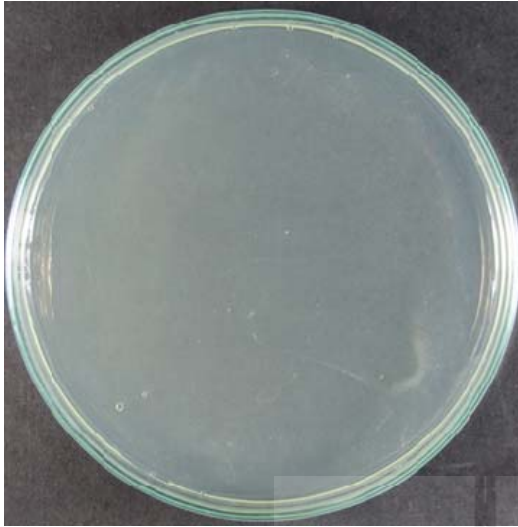
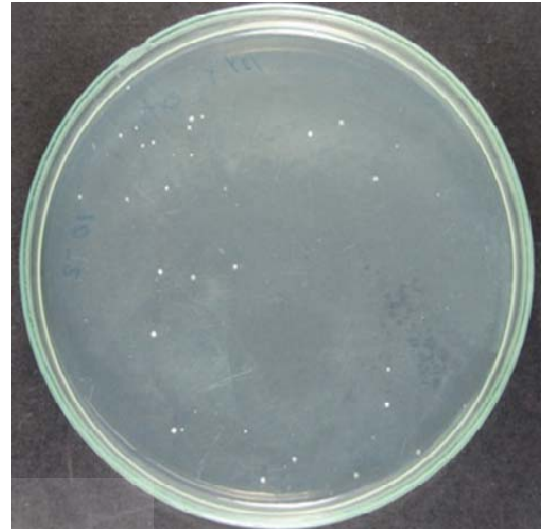
(B) เกลือ 15% เติม *Virgibacillus* sp. SK37

(C) ชุดควบคุมเกลือ 15% pH 6.8

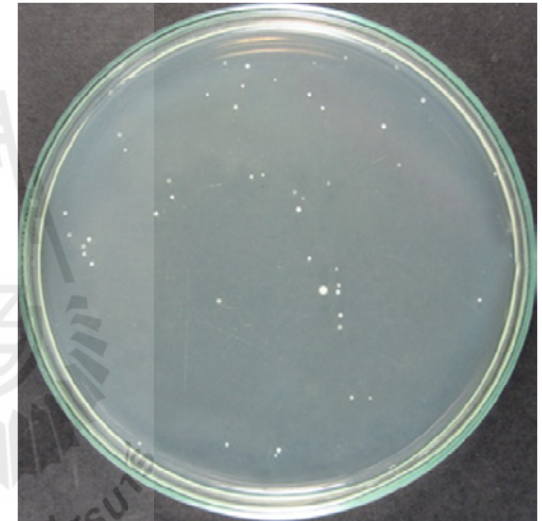
(D) เกลือ 15% pH 6.8 เติม *Virgibacillus* sp. SK37

รูปที่ 3.20 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 120 ของกระบวนการหมัก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับ 10% (ไม่พบโคโลนีที่ตัวอย่างชุดควบคุมเกลือ 30% และตัวอย่างที่เติมเกลือ 30% และ *Virgibacillus* sp. SK37)

(A) ชุดควบคุมเกลือ 15 %

(B) เกลือ 15% เติม *Virgibacillus* sp. SK37

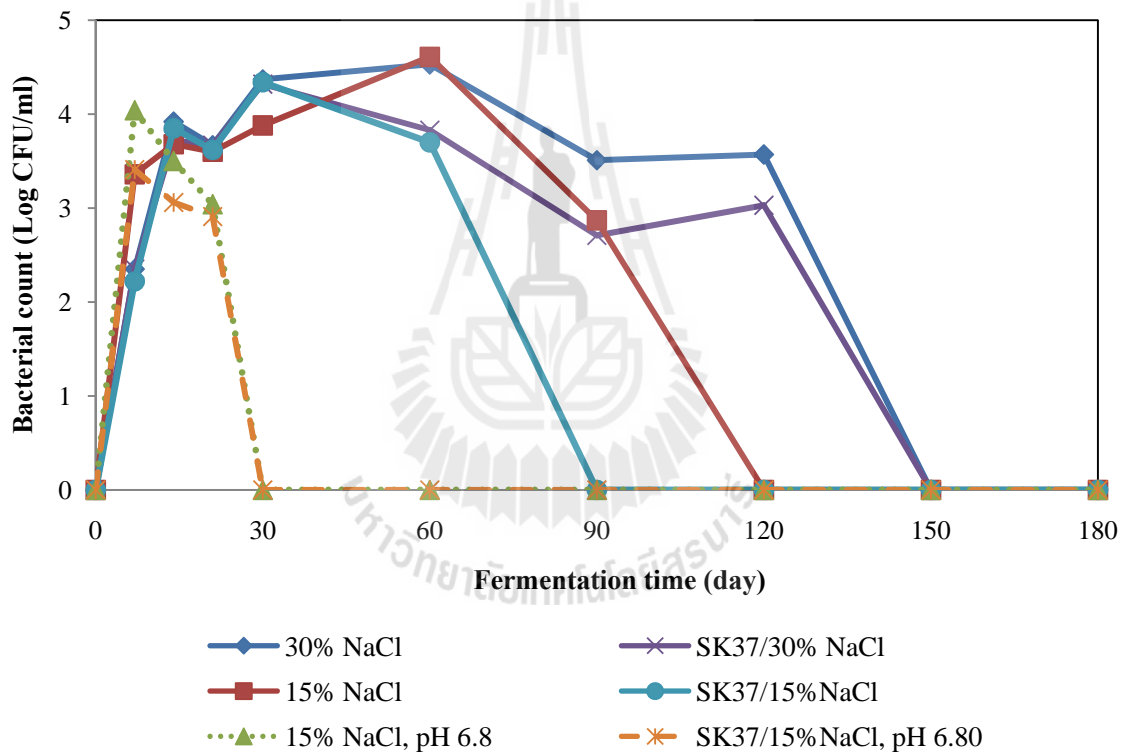
(C) ชุดควบคุมเกลือ 15% pH 6.8

(D) เกลือ 15% pH 6.8 เติม *Virgibacillus* sp. SK37

รูปที่ 3.21 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาระหว่างในวันที่ 150 ของกระบวนการหมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM168 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับ 10% (ไม่พบโคโลนีที่ตัวอย่างชุดควบคุมเกลือ 30% และตัวอย่างที่เติมเกลือ 30% และ *Virgibacillus* sp. SK37)

เมื่อตรวจนับประชากรแบคทีเรียชอบเกลือสูง (Extreme halophiles) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ JCM 169 เกลือโซเดียมคลอไรด์ 25% โดยใช้เทคนิค Spread plate โดยเมื่อเริ่มกระบวนการหมัก (วันที่ 0) ไม่พบแบคทีเรียชอบเค็มในตัวอย่างทั้งหมด แสดงว่า *Virgibacillus* sp. SK37 ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีเกลือสูงได้ และเมื่อกระบวนการหมักผ่านไป 7 วัน สามารถตรวจนับจุลินทรีย์ได้ 2.3-4.0 Log CFU/กรัม (รูปที่ 3.22) โดยแบคทีเรียในตัวอย่าง 15% NaCl และ 15% NaCl, พีเอช 6.8

พบจำนวนแบคทีเรียชอบเค็มมากกว่าตัวอย่าง 30% NaCl และจำนวนแบคทีเรียชอบเค็มสูงในตัวอย่าง 15% NaCl, พีเอช 6.8 ทั้งชุดควบคุมและที่เติม *Virgibacillus* sp. SK37 มีประชากรลดลงและไม่สามารถตรวจนับได้เมื่อกระบวนการหมักผ่านไป 30 วัน (<30CFU/กรัม) ที่ค่าการเจือจาง 2 เท่า (รูปที่ 3.23-3.34) การลดลงอาจเกิดจากสภาวะการหมักมีความเข้มข้นของเกลือและค่าพีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ชอบเกลือสูง ในขณะที่แบคทีเรียในตัวอย่าง 30% NaCl มีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นและค่อนข้างคงที่ที่ 3-4 Log CFU/กรัม จนถึงวันที่ 120 ของกระบวนการหมัก จากนั้นไม่สามารถตรวจนับจำนวนแบคทีเรียได้ และในตัวอย่าง 15% NaCl มีประชากรแบคทีเรียค่อนข้างคงที่ที่ 2-3 Log CFU/กรัม จนวันที่ 90 ของกระบวนการหมัก จากนั้นไม่สามารถตรวจนับจำนวนแบคทีเรียได้เช่นกัน

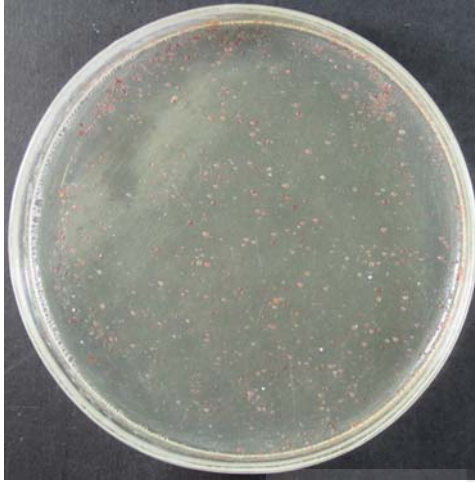
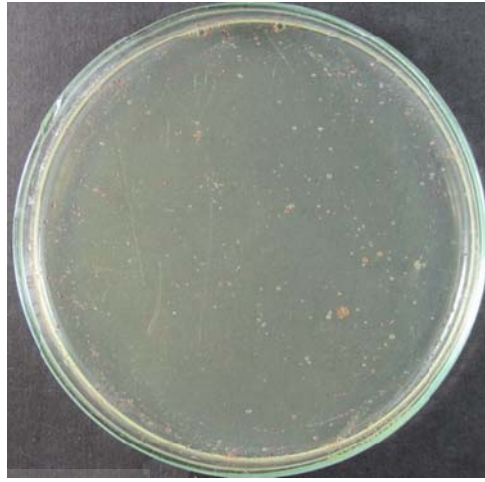


รูปที่ 3.22 การเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ชอบเกลือสูงในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาที่เติม *Virgibacillus* sp. SK37 ตรวจนับจุลินทรีย์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM 169 ที่เติม โซเดียมคลอไรด์ 25%

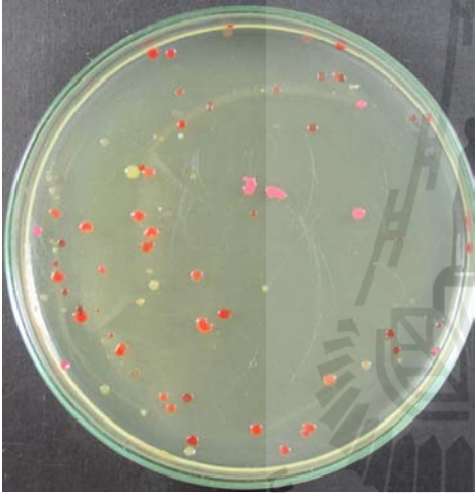
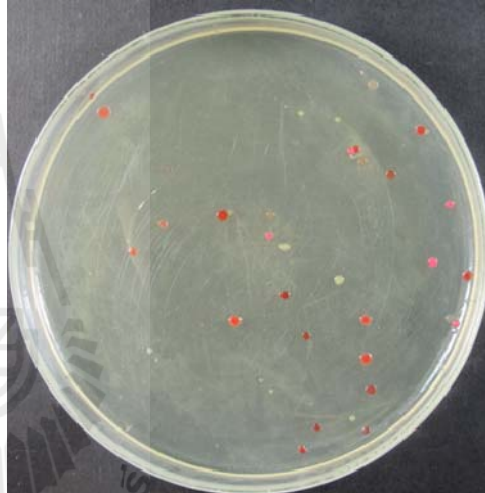
ลักษณะของโคโลนีที่ตรวจพบบนอาหาร JCM 169 ในช่วงแรกของการบ่มการหมักนี้มีความแตกต่างกันคือพบโคโลนีสีแดง สีขาว สีชมพู สีเหลือง (รูปที่ 3.23-3.24) ซึ่ง Oren (2003) ได้รายงานลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ชอบเค็มสูงไว้ว่ามีสีแดงเนื่องจากมีการสร้างสารแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) และในบางครั้งมีการสร้างแก๊สซึ่งสามารถทำหน้าที่เก็บสะสมแก๊ส (Gas vacuoles) ทำให้โคโลนีมีสีชมพูหรือขาว และเมื่อการบ่มการหมักผ่านไปความหลากหลายของลักษณะโคโลนีที่พบลดลงจนกระทั่งเหลืออยู่ 1-2 ลักษณะ คือพบแต่โคโลนีสีแดงและสีเหลือง (รูปที่ 3.25-3.29) จากการทดลองนี้พบว่า การปรับสภาวะ (ความเข้มข้นของเกลือ โซเดียมคลอไรด์และพีเอช) ส่งผลต่อชนิดของแบคทีเรียที่ชอบเค็มสูงที่พบในการบ่มการหมัก สภาวะที่มีเกลือ โซเดียมคลอไรด์เข้มข้นสูง 30% แบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่ตลอดระยะเวลาการหมักมีลักษณะโคโลนีสีแดง ในขณะที่สภาวะการหมักที่มีเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 15% พบแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาวและสีเหลืองเป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่สภาวะการหมักที่มีเกลือ โซเดียมคลอไรด์ 15%, พีเอช 6.8 ไม่เอื้อต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ชอบเค็มสูง ประชากรของแบคทีเรียที่ชอบเค็มสูงที่ต่างกันนี้อาจส่งผลต่ออัตราย่อยสลายโปรตีนและคุณภาพของผลผลิตสุดท้าย



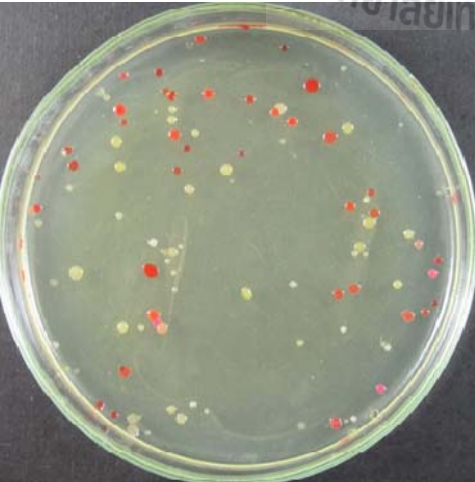
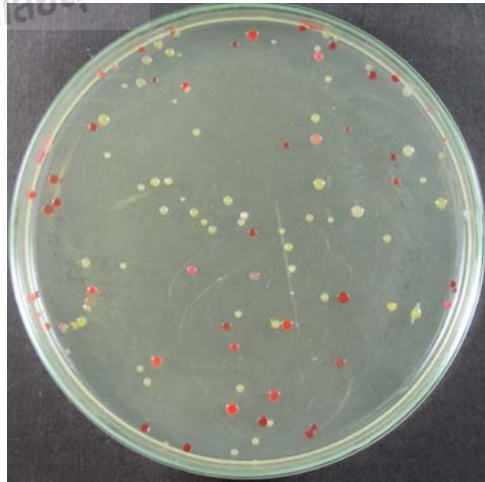
(A) ชุดควบคุมเกลือ 30%

(B) เกลือ 30% เต็ม *Virgibacillus* sp. SK37

(C) ชุดควบคุมเกลือ 15 %

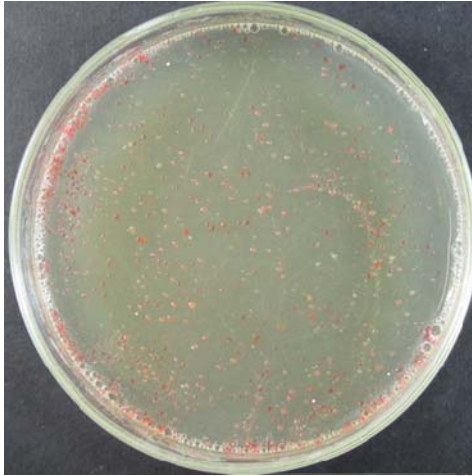
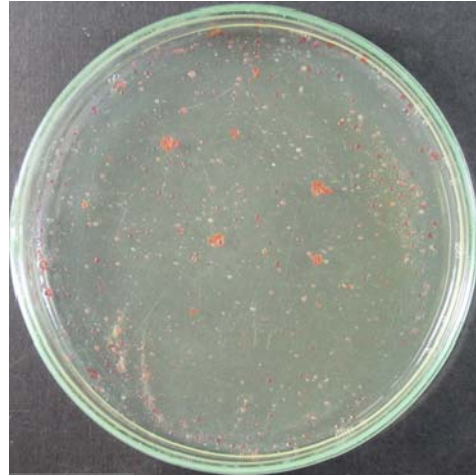
(D) เกลือ 15% เต็ม *Virgibacillus* sp. SK37

(E) ชุดควบคุมเกลือ 15% pH 6.8

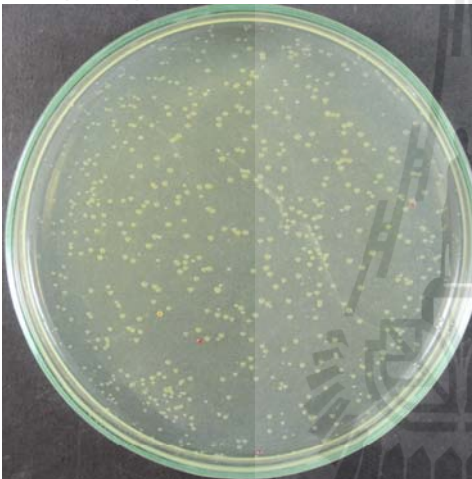
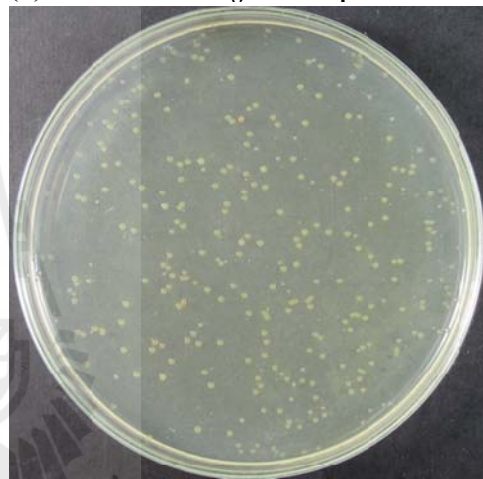
(F) เกลือ 15% pH 6.8 เต็ม *Virgibacillus* sp. SK37

รูปที่ 3.23 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 7 ของกระบวนการหมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM169 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 25%

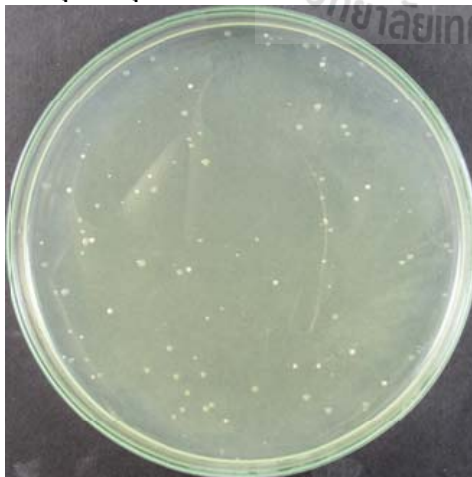
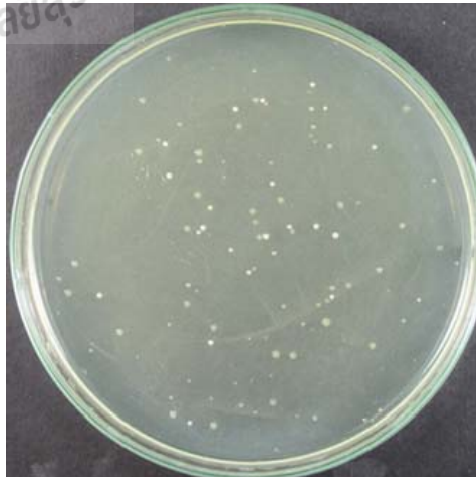
(A) ชุดควบคุมเกลือ 30%

(B) เกลือ 30% เต็ม *Virgibacillus* sp. SK37

(C) ชุดควบคุมเกลือ 15 %

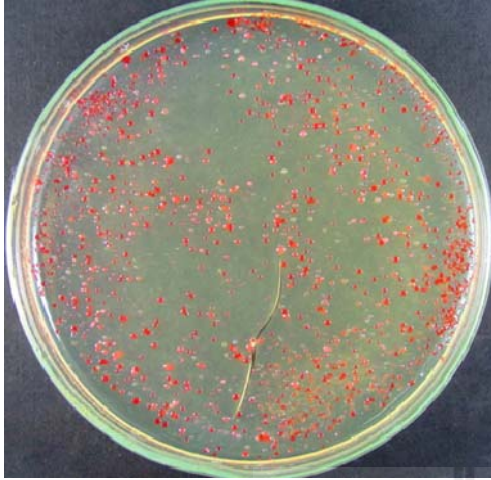
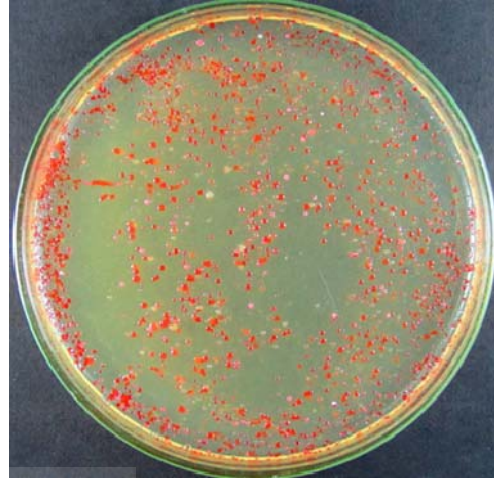
(D) เกลือ 15% เต็ม *Virgibacillus* sp. SK37

(E) ชุดควบคุมเกลือ 15% pH 6.8

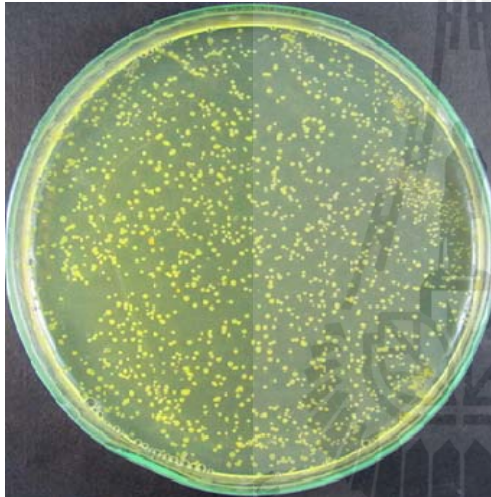
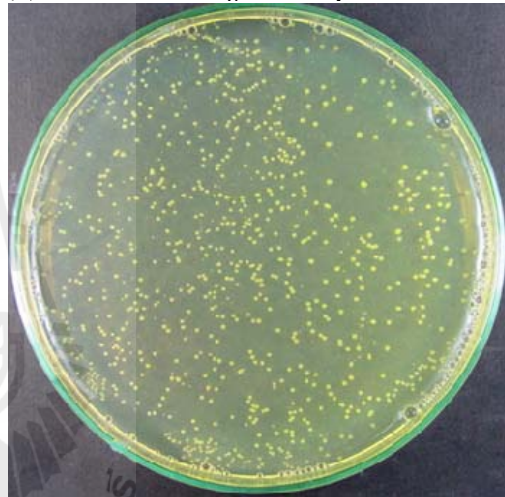
(F) เกลือ 15% pH 6.8 เต็ม *Virgibacillus* sp. SK37

รูปที่ 3.24 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 14 กระบวนการหมัก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM169 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 25%

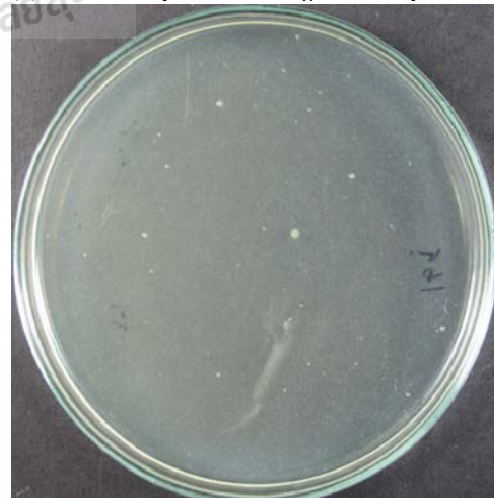
(A) ชุดควบคุมเกลือ 30%

(B) เกลือ 30% เติม *Virgibacillus* sp. SK37

(C) ชุดควบคุมเกลือ 15 %

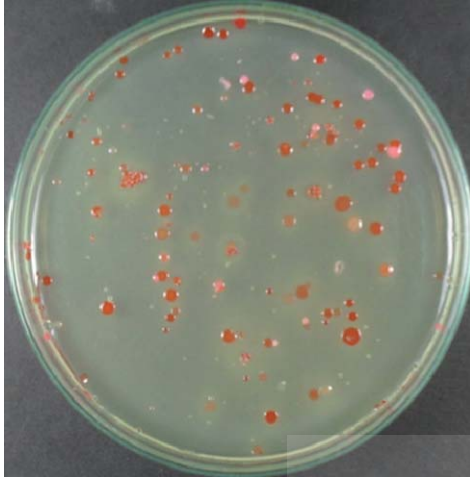
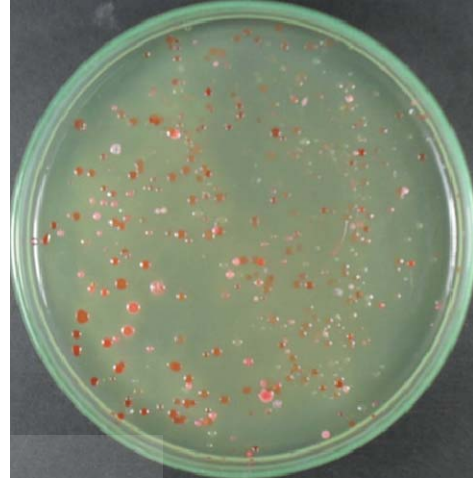
(D) เกลือ 15% เติม *Virgibacillus* sp. SK37

(E) ชุดควบคุมเกลือ 15% pH 6.8

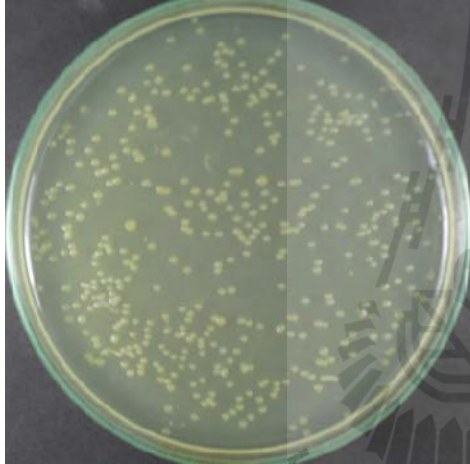
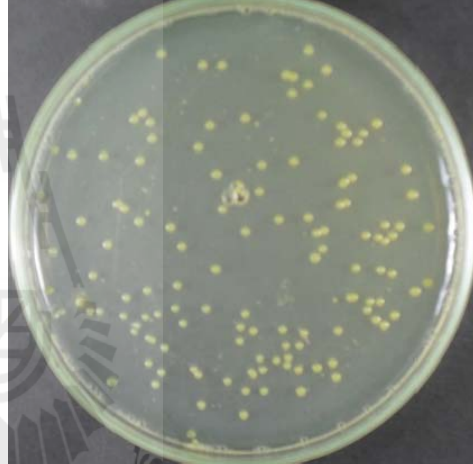
(F) เกลือ 15% pH 6.8 เติม *Virgibacillus* sp. SK37

รูปที่ 3.25 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 21 ของกระบวนการหมัก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM169 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 25%

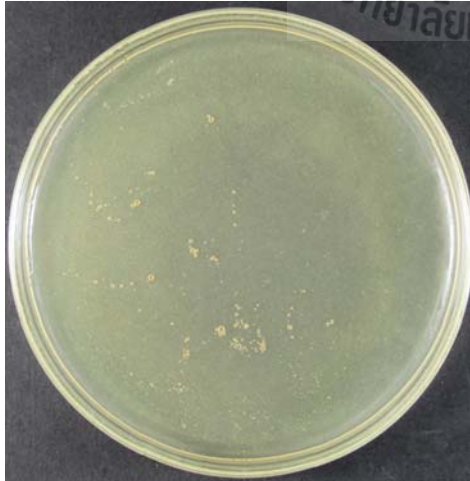
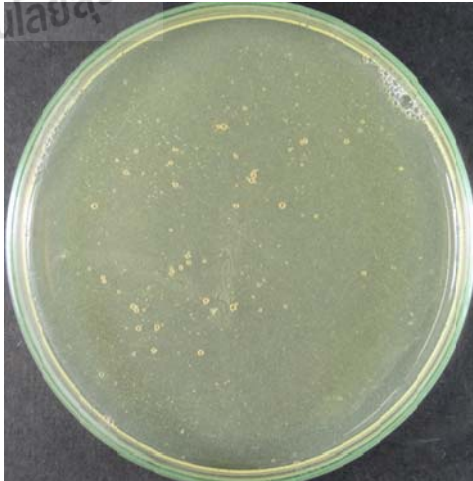
(A) ชุดควบคุมเกลือ 30%

(B) เกลือ 30% เติม *Virgibacillus* sp. SK37

(C) ชุดควบคุมเกลือ 15 %

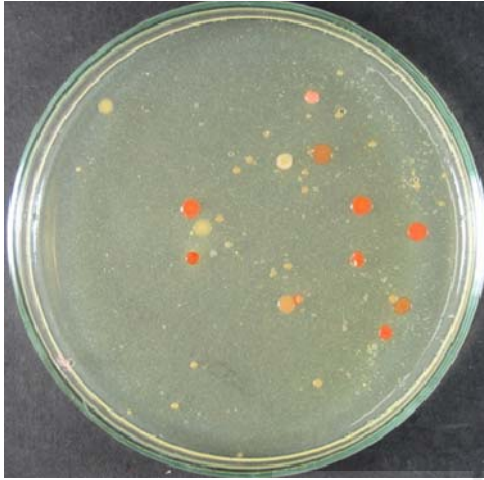
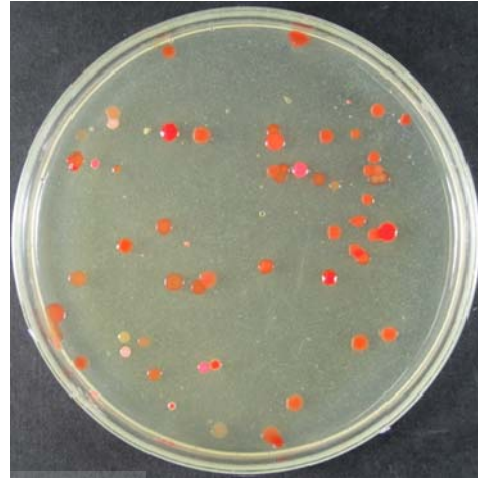
(D) เกลือ 15% เติม *Virgibacillus* sp. SK37

(E) ชุดควบคุมเกลือ 15% pH 6.8

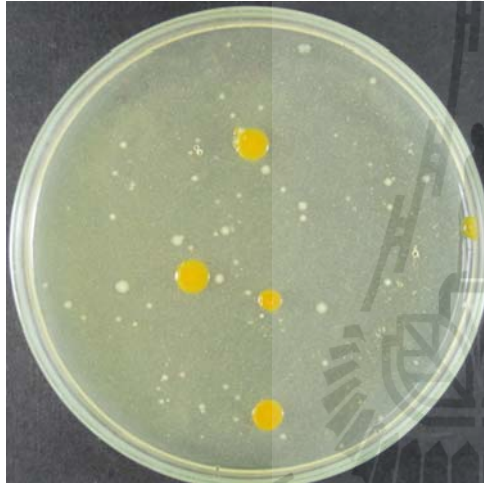
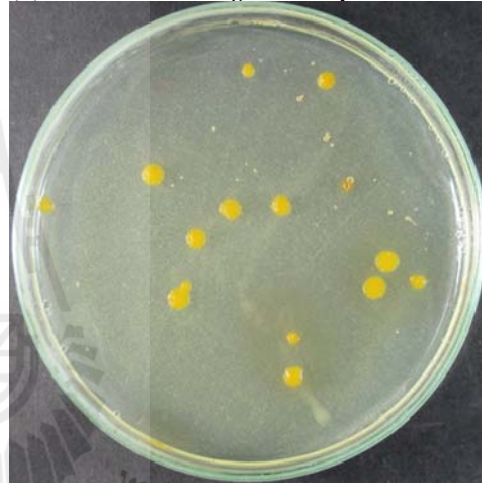
(F) เกลือ 15% pH 6.8 เติม *Virgibacillus* sp. SK37

รูปที่ 3.26 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 30 ของกระบวนการหมัก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM169 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 25%

(A) ชุดควบคุมเกลือ 30%

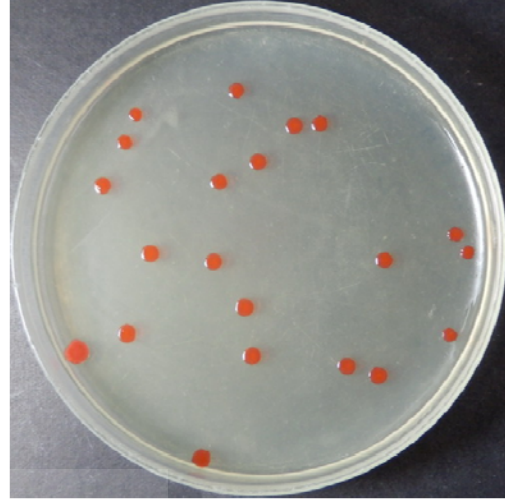
(B) เกลือ 30% เติม *Virgibacillus* sp. SK37

(C) ชุดควบคุมเกลือ 15 %

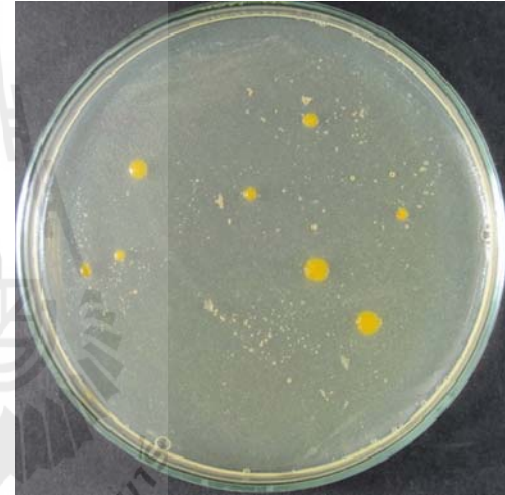
(D) เกลือ 15% เติม *Virgibacillus* sp. SK37

รูปที่ 3.27 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 60 ของกระบวนการหมัก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM169 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 25% (ไม่พบโคโลนีในตัวอย่างชุดควบคุมเกลือ 15%, พีเอช 6.8 และ เกลือ 15%, พีเอช 6.8 ที่เติม *Virgibacillus* sp. SK37)

(A) ชุดควบคุมเกลือ 30%

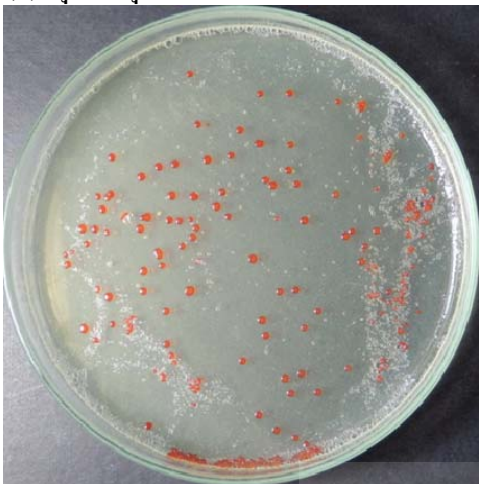
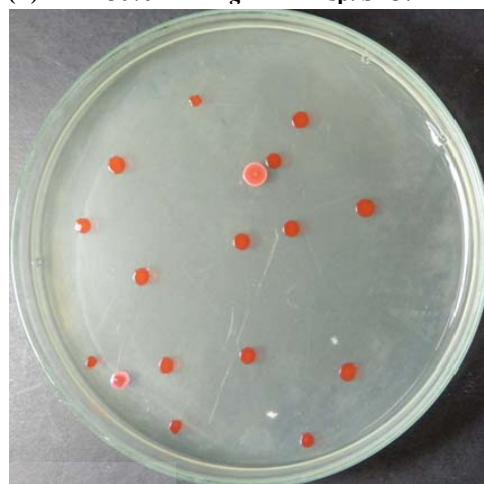
(B) เกลือ 30% เติม *Virgibacillus* sp. SK37

(C) ชุดควบคุมเกลือ 15 %

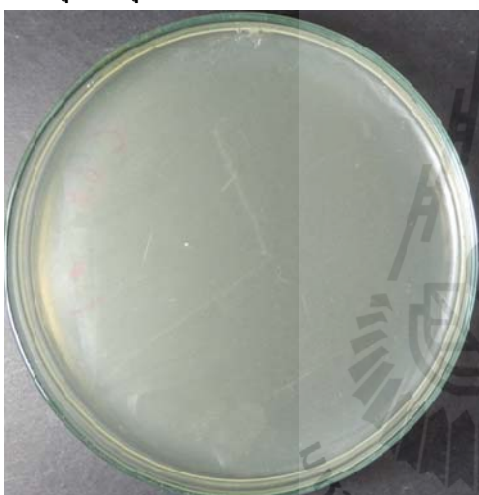
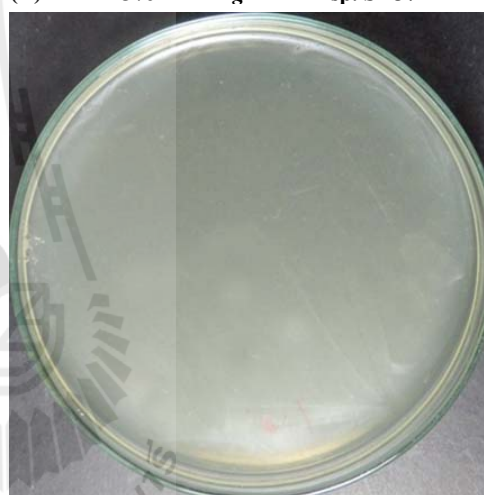
(D) เกลือ 15% เติม *Virgibacillus* sp. SK37

รูปที่ 3.28 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 90 ของกระบวนการหมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM169 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 25% (ไม่พบโคโลนีที่ตัวอย่างชุดควบคุมเกลือ 15%, พีเอช 6.8 และ เกลือ 15%, พีเอช 6.8 ที่เติม *Virgibacillus* sp. SK37)

(A) ชุดควบคุมเกลือ 30%

(B) เกลือ 30% เติม *Virgibacillus* sp. SK37

(C) ชุดควบคุมเกลือ 15 %

(D) เกลือ 15% เติม *Virgibacillus* sp. SK37

รูปที่ 3.29 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ตรวจพบในโหลหมักน้ำปลาในวันที่ 120 ของกระบวนการหมักโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ JCM169 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 25% (ไม่พบโคโลนีที่ตัวอย่างชุดควบคุมเกลือ 15%, พีเอช 6.8 และ เกลือ 15%, พีเอช 6.8 ที่เติม *Virgibacillus* sp. SK37)

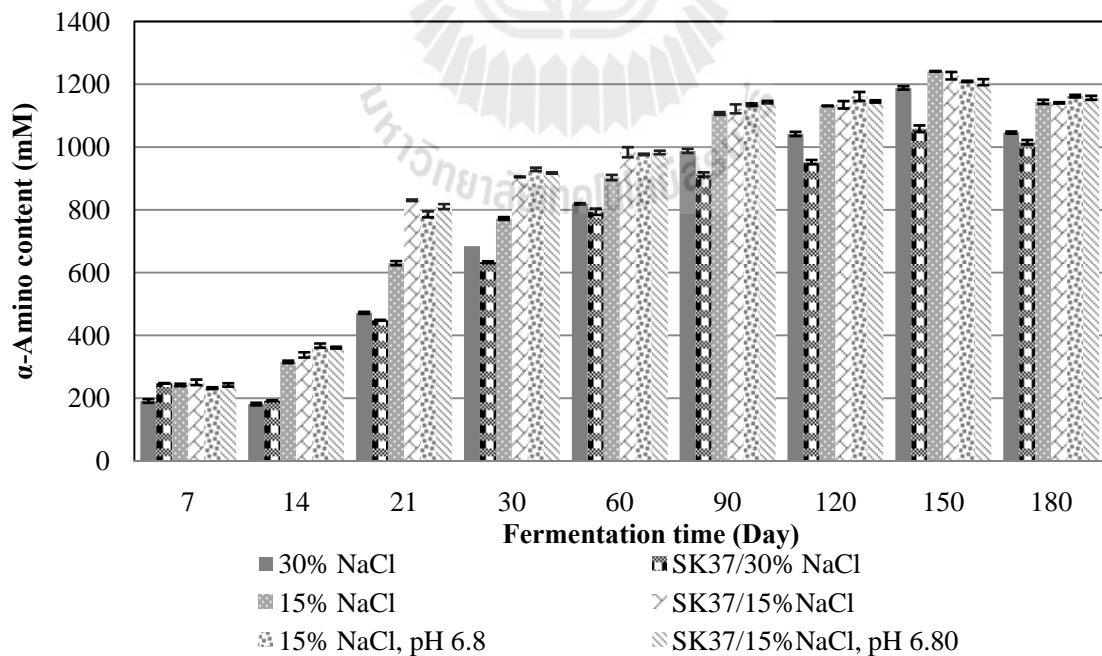
3.4.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพระหว่างกระบวนการหมัก

เมื่อเริ่มต้นกระบวนการหมัก (วันที่ 7) ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนของน้ำปลาในทุกตัวอย่างมีค่าใกล้เคียงกัน (รูปที่ 3.30) แต่ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Lowry มีค่าแตกต่างกัน ($p < 0.05$, รูปที่ 3.31) เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Lowry มีความจำเพาะกับโซ่ข้างของไทโรซีนเป็นสำคัญ ดังนั้นตัวอย่างที่มีเกลือต่ำ (15%) และพีเอช 6.8 มีการย่อยสลายของเปปไทด์ที่มีโซ่ข้างเป็นกลุ่มอะมิโนไทโรซีนมากกว่าตัวอย่างอื่น แต่การย่อยสลายของโปรตีนเป็นโอลิโกเปปไทด์

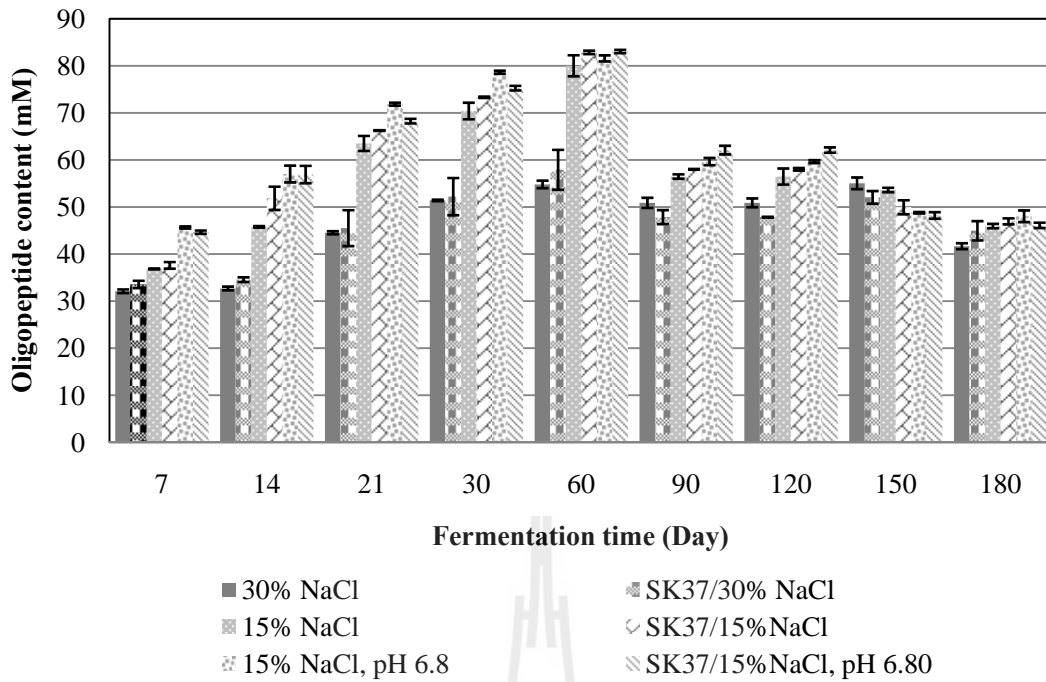
มีค่าไม่แตกต่างกัน จากการวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน สภาวะเกลือต่ำและพีเอช 6.8 ที่เป็นกลางอาจเหนี่ยวนำให้เอนไซม์โปรตีนเอสที่มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนไทโรซีนมีกิจกรรมสูง ส่งผลให้เกิดเพปไทด์ที่มีกลุ่มไทโรซีนสูงกว่าตัวอย่างอื่น เมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนของน้ำปลาที่มีค่าเพิ่มขึ้นในทุกตัวอย่าง โดยเฉพาะตัวอย่างที่มีการหมักโดยใช้เกลือต่ำ (NaCl 15%) และตัวอย่างที่มีการหมักโดยใช้เกลือต่ำร่วมไปกับการปรับพีเอช (15% NaCl, pH 6.8) โดยพบว่าปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 21 วันแรกของการหมัก (รูปที่ 3.30) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lapsongphon et al. (2013) ที่พบว่า *Virgibacillus* sp. SK37 ที่ใช้เป็นก้ำเชื้อในการหมักน้ำปลาเกลือต่ำ (15%) จะมีการย่อยสลายโปรตีนในช่วงแรกของการหมัก และพบว่าปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนสูงสุดเมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป 30 วัน จากผลดังกล่าวบ่งชี้ว่าการลดปริมาณเกลือลงจาก 30% เป็น 15% ช่วยเพิ่มระดับการย่อยสลายของโปรตีนในระยะแรกของการหมักได้ เอนไซม์ในตัวอย่างปลาและจากเชื้อจุลินทรีย์อาจแสดงกิจกรรมได้สูงขึ้นในสภาวะที่มีเกลือ 15% ในระบบหมัก นอกจากนี้การเจริญของแบคทีเรียที่มากขึ้นในสภาวะเกลือ 15% อาจส่งผลให้เกิดการย่อยสลายของโปรตีนปลามากขึ้น นอกจากนี้ตัวอย่างที่เติมก้ำเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 ในสภาวะเกลือ 15% แสดงค่าการย่อยสลายที่สูงกว่าตัวอย่างควบคุมที่ระดับเกลือเท่ากันที่ระยะการหมัก 60 วัน แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนจาก *Virgibacillus* sp. SK37 ในสภาวะที่มีเกลือในการหมัก 15% ส่วนในตัวอย่างที่เติมเกลือ 30% ที่ไม่พบการเจริญของ *Virgibacillus* sp. SK37 หลังจากการหมักผ่านไป 7 วัน (รูปที่ 3.12) เนื่องจากเป็นสภาวะที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญของ *Virgibacillus* sp. SK37 ดังนั้นการเติมก้ำเชื้อไม่มีผลเพิ่มระดับการย่อยสลาย ($p > 0.05$) เนื่องจากสภาวะเกลือ 30% ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของก้ำเชื้อ อย่างไรก็ตามเมื่อระยะเวลาการหมัก 6 เดือน ปริมาณแอลฟาอะมิโนมีค่าใกล้เคียงกัน

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ โอลิโกเพปไทด์ พบว่าการย่อยสลายของโปรตีนมีค่าเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักในทุกตัวอย่าง (รูปที่ 3.31) และในตัวอย่างที่เติมเกลือ 15% และเกลือ 15%, พีเอช 6.8 แสดงปริมาณ โอลิโกเพปไทด์สูงกว่าตัวอย่างที่หมักด้วยเกลือ 30% ซึ่งปริมาณ โอลิโกเพปไทด์มีค่าสูงสุดที่ระยะเวลาการหมัก 60 วัน จากนั้นทุกตัวอย่างมีปริมาณ โอลิโกเพปไทด์ลดลง และมีค่าใกล้เคียงกันคือ 40-45 มิลลิโมลลาร์ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก เพปไทด์ที่มีกลุ่มไทโรซีนมีแนวโน้มที่จะเกิดการจับตัวกันโดยแรงกระทำไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic interaction) ส่งผลให้เกิดการจับตัวกันของเพปไทด์เป็นตะกอน ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะเกิดหลังจากระยะเวลาการหมักผ่านไป 60 วัน ส่งผลให้ปริมาณไทโรซีนในส่วนของเหลวลดลง ในขณะที่การย่อยสลายโปรตีนยังคงเกิดขึ้นหลังจาก 60 วัน ดังจะเห็นได้จากการเพิ่มขึ้นของกลุ่มแอลฟาอะมิโน (รูปที่ 3.30) จากการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนอาจสรุปได้ว่ากระบวนการย่อยของทุกตัวอย่างเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลาของการหมัก 150 วัน (รูปที่ 3.30) การลดลงของกลุ่มแอลฟา-

อะมิโนหลังจากนั้นอาจบ่งชี้ถึงการใช้กรดอะมิโนหรือเพปไทด์ไปใช้ในกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ยังคงอยู่ในระบบหมัก หรือการเกิดตะกอนของเพปไทด์เนื่องจากการจับกันของเพปไทด์ด้วยแรงกระทำต่างๆ หากพิจารณาจากปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนและปริมาณกลุ่มไทโรซีนจะเห็นได้ว่า การเติม *Virgibacillus* sp. SK37 ส่งผลต่อการย่อยสลายโปรตีนเฉพาะในช่วง 60 วันแรกของกระบวนการหมักเท่านั้น โดยเฉพาะในตัวอย่างที่ลดเกลือลงที่ 15% สำหรับการเติม *Virgibacillus* sp. SK37 มีผลต่อการสลายโปรตีนในตัวอย่างที่มีการลดเกลือร่วมกับการปรับพีเอชเป็น 6.8 ส่วนตัวอย่างที่หมักด้วยเกลือ 30% การเติมเชื้อผลต่อการย่อยสลายโปรตีนไม่เด่นชัดการลดเกลือร่วมกับการปรับค่าพีเอชเป็น 6.8 เป็นสถานะที่ส่งเสริมการย่อยสลายโปรตีนของเอนไซม์โปรตีนเอสที่อยู่ในตัวปลาอยู่แล้ว อีกทั้งยังเป็นการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ในระบบหมัก (รูปที่ 3.12-3.21) ส่งผลให้เกิดการย่อยสลายของโปรตีนในระดับสูง บทบาทของ *Virgibacillus* sp. SK37 ต่อการย่อยสลายโปรตีนเมื่อเทียบกับเอนไซม์และเชื้อที่มีอยู่ในระบบจึงไม่โดดเด่น ส่วนในกรณีของการหมักที่เกลือเข้มข้น 30% เป็นสถานะที่ไม่เอื้อต่อการเจริญของ *Virgibacillus* sp. SK37 กิจกรรมของโปรตีนเอสที่ตรึงอยู่กับเซลล์มีแนวโน้มที่จะถูกจำกัดด้วยสถานะเกลือสูง จึงทำให้การย่อยสลายโปรตีนจากกิจกรรมโปรตีนเอสที่ตรึงอยู่กับเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 มีจำกัดเช่นกัน ผลจากการศึกษานี้บ่งชี้ว่าสถานะที่ส่งเสริมต่อการย่อยโปรตีนในระบบการหมักน้ำปลาโดยการเติม *Virgibacillus* sp. SK37 คือการปรับให้สถานะเกลือในระบบหมักมีค่า 15% โดยไม่จำเป็นต้องปรับค่าพีเอช



รูปที่ 3.30 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนของน้ำปลาในระหว่างกระบวนการหมักเป็นเวลา 6 เดือน



รูปที่ 3.31 การเปลี่ยนแปลง โอลิโกเปปไทด์ของน้ำปลาในระหว่างกระบวนการหมักเป็นเวลา 6 เดือน

สมบัติทางเคมีทั่วไปของน้ำปลาทั้ง 6 ตัวอย่างในเดือนที่ 6 แสดงดังตารางที่ 3.5 ปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมด (Total nitrogen) ของตัวอย่างควบคุมที่มีการลดปริมาณเกลือในการหมักเหลือ 15% มีค่าสูงสุด ($P < 0.05$) เป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอย่างที่เติม *Virgibacillus* sp. SK37 ในทุกสภาวะการหมักมีค่าน้อยกว่าตัวอย่างควบคุม ($P < 0.05$) ที่ทุกสภาวะการศึกษา เนื่องจากปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดบ่งชี้ถึงปริมาณเพปไทด์ กรดอะมิโน และแอมโมเนีย Dougan and Howard (1975) รายงานว่า 80% ของไนโตรเจนรวมทั้งหมดของน้ำปลาจะอยู่ในรูปของกรดอะมิโน นอกจากนี้ปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดของน้ำปลาจะขึ้นกับปลาแต่ละชนิด และองค์ประกอบทางเคมีของปลา (Tungkawachara et al., 2003) ซึ่งปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพของน้ำปลา (Park et al., 2001) เกณฑ์มาตรฐานของน้ำปลาคูณภาพชั้นที่ 1 ของประเทศไทยจะต้องมีค่ามากกว่า 2.0% จากผลการวิจัยพบว่าปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดของทุกตัวอย่างมีค่ามากกว่า 2.0% (ตารางที่ 3.4) ซึ่งเป็นเกณฑ์มาตรฐานของน้ำปลาคูณภาพชั้นที่ 1 นอกจากนี้ตัวอย่างที่เติม *Virgibacillus* sp. SK37 มีปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนที่ต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม อาจกล่าวได้ว่าการเติม *Virgibacillus* sp. SK37 มีแนวโน้มลดปริมาณแอมโมเนียในระบบการหมัก ในขณะที่ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนในเดือนที่ 6 มีแนวโน้มไม่ต่างกัน ($P > 0.05$) ระหว่างตัวอย่างที่เติมเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 และตัวอย่างควบคุม ดังนั้นการเติมเชื้อจึงไม่มีผลลดปริมาณกรดอะมิโนหรือเพปไทด์ในระบบการหมัก และเมื่อพิจารณาปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนในตัวอย่างที่มีการลดปริมาณเกลือในการหมักเหลือ 15% และมีการปรับค่าพีเอชเท่ากับ 6.8 มีปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนสูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ ($P < 0.05$)

เป็นไปได้ว่าตัวอย่างที่เติมเกลือ 15%, พีเอช 6.8 อาจทำให้เกิดการสร้างสรรค์ที่มีผลต่อค่าแอมโมเนียไนโตรเจนในผลิตภัณฑ์เกลือที่ต่ำส่งผลให้เกิดการย่อยสลายของโปรตีนอย่างรวดเร็ว และส่งผลให้เกิดสารประกอบของกลุ่มแอมโมเนียซึ่งเป็นสาเหตุให้ค่าพีเอชมีค่าสูง ซึ่งค่าพีเอชของตัวอย่างเกลือ 15%, พีเอช 6.8 สูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ ($P<0.05$) เมื่อพิจารณาค่าเกลือจะพบว่าตัวอย่างที่หมักด้วยเกลือ 15% มีค่าเกลือในช่วง 24-24.8% ซึ่งต่ำกว่าตัวอย่างที่หมักด้วยเกลือ 30% ($P<0.05$) ที่มีค่าเกลือในผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ประมาณ 27% จะเห็นได้ว่าแม้ระบบการหมักจะลดเกลือลง ประมาณครึ่งหนึ่ง (จาก 30% เป็น 15%) แต่ปริมาณเกลือในผลิตภัณฑ์สุดท้ายมิได้มีค่าต่างกันครึ่งหนึ่งทั้งนี้เนื่องจากปริมาณน้ำในตัวอย่างมีจำกัด ความชื้นของปลาที่ใช้เป็นวัตถุดิบมีค่าประมาณ 65-70% ซึ่งเป็นปัจจัยจำกัด (Limiting factor) ต่อการละลายของเกลือ การเติมเกลือในระดับเกลือสูง (30%) หรือการลดเกลือลงครึ่งหนึ่ง (15%) จึงไม่มีผลให้เกิดความแตกต่างในการละลาย แม้จะลดเกลือลงเหลือเพียง 15% ผลิตภัณฑ์สุดท้ายยังคงมีค่าเกลือตามมาตรฐานของผลิตภัณฑ์น้ำปลาซึ่งกำหนดให้มีเกลือไม่ต่ำกว่า 20% และยังคงลักษณะจำเพาะของผลิตภัณฑ์ปลา ค่าพีเอชเริ่มต้นของกระบวนการหมักในชุดการทดลองที่มีเกลือ 30% มีค่า 5.55-5.57 สำหรับชุดการทดลองที่มีเกลือ 15% มีค่า 5.71-5.72 การหมักเป็นระยะเวลา 6 เดือนส่งผลให้ค่าพีเอชมีค่าลดลง ในชุดการทดลองที่มีเกลือ 15%, พีเอช 6.8 มีค่า พีเอชเริ่มต้นอยู่ที่ 6.81-6.83 หลังจากหมักเป็นระยะเวลา 6 เดือน ค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีค่าสูงเกินมาตรฐานอุตสาหกรรม (สมอ.) ที่กำหนดไว้ว่าน้ำปลาต้องมีค่าพีเอชไม่เกิน 5.9 ค่าพีเอชที่สูงขึ้น แสดงถึงการย่อยสลายของโปรตีนในระดับสูงซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกลุ่มอะมิโนแอลฟา (รูปที่ 3.26) และทำให้เกิดกลิ่นฉุนของแอมโมเนียซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ แม้การเติม *Virgibacillus* sp. SK37 จะช่วยลดค่าแอมโมเนียไนโตรเจนแต่ยังคงมีกลิ่นฉุนแอมโมเนียในผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการปรับลดเกลือลงเหลือ 15% ในการหมักร่วมกับการปรับค่าพีเอชเป็น 6.8 แม้จะช่วยเพิ่มการย่อยสลายของโปรตีนแต่ส่งผลให้เกิดลักษณะทางกลิ่นที่ไม่ใช่ลักษณะของน้ำปลา

ตารางที่ 3.5 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำปลาที่หมักด้วยสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 6 เดือน

ตัวอย่าง	pH	ปริมาณไนโตรเจน รวมทั้งหมด(%)	ปริมาณแอมโมเนีย ไนโตรเจน(%)	ปริมาณเกลือ (%)
ชุดควบคุมเกลือ 30%	5.41 ^a	2.43 ± 0.05 ^b	0.27 ± 0.00 ^b	26.85 ± 0.41 ^c
เกลือ 30% เติม SK37	5.40 ^a	2.20 ± 0.09 ^a	0.18 ± 0.00 ^a	27.42 ± 0.21 ^c
ชุดควบคุมเกลือ 15%	5.57 ^b	2.75 ± 0.00 ^c	0.27 ± 0.01 ^b	24.33 ± 0.21 ^{ab}
เกลือ 15% เติม SK37	5.55 ^b	2.43 ± 0.02 ^b	0.27 ± 0.03 ^b	24.84 ± 0.10 ^b
ชุดควบคุมเกลือ 15%, pH 6.8	7.47 ^c	2.66 ± 0.00 ^c	0.56 ± 0.00 ^d	24.18 ± 0.42 ^{ab}
เกลือ 15% pH 6.80 เติม SK37	7.43 ^c	2.42 ± 0.05 ^b	0.49 ± 0.00 ^c	23.96 ± 0.31 ^a

Different superscripts within a column indicate significant differences ($P<0.05$)

3.4.2.1 ค่าสี

ตัวอย่างน้ำปลาทั้ง 6 ตัวอย่างมีค่าสีในระบบ L*, a*, และ b* ซึ่งตรวจวัดโดยใช้เครื่อง ColorQuest XE (Hunter Associate Laboratory, Virginia, USA) แสดงดังตารางที่ 3.6 ในภาพรวมทุกตัวอย่างมีลักษณะปรากฏเป็นสีน้ำตาลอมแดง ซึ่งสอดคล้องกับค่าสีที่วัดได้คือมีค่า +b* สูง ตัวอย่างที่หมักด้วยเกลือ 15% และเกลือ 30% พีเอชเป็น 6.8 มีค่า L*ต่ำสุด (P<0.05) ซึ่งบ่งชี้ว่ามีสีเข้มที่สุด ในขณะที่ตัวอย่างที่หมักด้วยเกลือ 15% และหมักด้วยเกลือ 30% มีค่าความสว่างมากขึ้นตามลำดับ การเติมกลูต้าเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 ส่งผลให้ค่า L* เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมของแต่ละสถานะ ซึ่งบ่งชี้ว่าการเติมกลูต้าเชื้อส่งผลให้ตัวอย่างน้ำปลามีค่าความสว่าง (L*) มากขึ้น หรือมีสีที่จางลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ระดับการย่อยสลายที่สูงของตัวอย่างที่หมักด้วยเกลือ 15% ร่วมกับการปรับพีเอชเป็น 6.8 ส่งผลให้มีค่าความแดง (a*) สูงที่สุด (P <0.05) ในขณะที่ตัวอย่างที่หมักด้วยเกลือ 30% ซึ่งมีค่าการย่อยสลายต่ำสุด มีค่าความแดง (a*) ต่ำสุด (P <0.05) เช่นกัน การเติมกลูต้าเชื้อที่ทุกสถานะการหมักส่งผลให้ค่าความแดงต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม (P <0.05) ตัวอย่างที่หมักด้วยเกลือ 15% ร่วมกับการปรับพีเอชเป็น 6.8 มีค่าความเหลือง (b*) ต่ำสุด (P <0.05) และตัวอย่างควบคุมที่หมักด้วยเกลือ 30% มีค่าความเหลืองสูงสุด (P <0.05) จากลักษณะปรากฏ ตัวอย่างที่หมักด้วยเกลือ 15% และปรับพีเอชเป็น 6.8 มีสีน้ำตาลอมแดงเข้มดำ ลักษณะคล้ายซีอิ๊ว ในขณะที่ตัวอย่างที่หมักด้วยเกลือ 30% มีสีน้ำตาลอมแดงซึ่งเป็นลักษณะของสีน้ำปลาทั่วไป ส่วนตัวอย่างที่เติมเกลือ 15% จะมีสีน้ำตาลอมแดงเข้มกว่าตัวอย่างที่หมักด้วยเกลือ 30% ซึ่งสอดคล้องกับค่าสีที่วัดได้ โดยตัวอย่างที่มีสีเข้มคล้ำจะมีค่า L* ต่ำและค่า a* สูง สีของน้ำปลาเกิดจากการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard browning) ด้วยกรดอะมิโนและกลุ่มคาร์บอนิลของน้ำตาลรีดิวซ์ ตัวอย่างที่หมักด้วย

ตารางที่ 3.6 ค่าสีในระบบ L* a* และ b* ของตัวอย่างน้ำปลาที่หมักด้วยสถานะต่างๆ เป็นเวลา 6 เดือน

Sample	L*	a*	b*
ชุดควบคุมเกลือ 30%	60.46±0.02 ^b	29.77±0.03 ^c	87.74±0.16 ^a
เกลือ 30% เติม SK37	67.47±0.01 ^a	22.50±0.02 ^f	83.86±0.05 ^c
ชุดควบคุมเกลือ 15%	53.63±0.05 ^d	34.65±0.03 ^c	84.49±0.08 ^b
เกลือ 15% เติม SK37	57.44±0.01 ^c	30.76±0.01 ^d	84.46±0.14 ^b
ชุดควบคุมเกลือ 15%, pH 6.8	44.78±0.02 ^f	37.45±0.02 ^a	73.86±0.15 ^c
เกลือ 15% pH 6.80 เติม SK37	47.72±0.05 ^c	36.13±0.01 ^b	77.72±0.08 ^d

Note : Different superscript indicate significant difference (P<0.05) in column

เกลือ 15%, พีเอช 6.8 มีระดับการย่อยสลายโปรตีนสูงสุด จึงเกิดปฏิกิริยาแอมัลลาร์ดมากที่สุด การเพิ่มขึ้นของค่า L^* และการลดลงของค่า a^* ซึ่งแสดงถึงค่าสีที่ซีดจากกลางจากสีน้ำตาลอมแดงในตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 ที่ทุกสภาวะ มีนัยว่าการเติมเชื้ออาจส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาแอมัลลาร์ดน้อยกว่าตัวอย่างควบคุม ซึ่งเป็นไปว่าตัวอย่างที่เติม *Virgibacillus* sp. SK37 อาจมีการนำกรดอะมิโนและเพปไทด์ไปใช้ส่งผลให้สารตั้งต้นของปฏิกิริยาแอมัลลาร์ดลดลง

3.4.2.2 ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในน้ำปลา

จากการวิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนพบว่าคาตาเวอรินและฮีสตามีนเป็นไบโอจีนิกเอมีนหลักที่ตรวจพบ และตรวจไม่พบ ทริปตามีน พิวเทรซีน และ สเปนอร์มีน (ตารางที่ 3.7) ไบโอจีนิกเอมีนที่สำคัญคือฮีสตามีนซึ่งสามารถทำให้เกิดอาการเป็นพิษในผู้บริโภคได้ โดยอาการที่พบคือ เป็นผื่นที่คอและหน้า เหนื่อออกมา ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง (Zaman et al., 2009) ปริมาณฮีสตามีนที่ตรวจพบในทุกตัวอย่างมีค่าต่ำกว่ามาตรฐานที่ CODEX ได้กำหนดไว้ในน้ำปลาคือ 400 ppm ในตัวอย่างน้ำปลาหมักที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 15% และ 30% พบว่าการเติม *Virgibacillus* sp. SK37 ไม่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีน ส่วนตัวอย่างน้ำปลาที่หมักด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ 15% และปรับพีเอช 6.8 ที่ส่งผลให้มีปริมาณฮีสตามีนเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลจาก *Virgibacillus* sp. SK37 หรือเชื้ออื่นที่เจริญและสร้างฮีสตามีนในสภาวะการหมักนี้ (รูปที่ 3.12-3.21)

ส่วนตัวอย่างที่หมักด้วยเกลือ 30% และเติม *Virgibacillus* sp. SK37 มีปริมาณฮีสตามีนไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุม แม้ว่าจะปรับสภาวะการหมักให้มีเกลือต่ำกว่าจาก 30% เป็น 15% มิได้ก่อให้เกิดการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีนเมื่อเทียบกับการหมักด้วยเกลือ 30% สอดคล้องกับการทดลองของ Yongsawatdigul et al. (2007) ที่ได้รายงานว่าการหมักน้ำปลาโดยใช้กล้าเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 ร่วมกับการใช้เอนไซม์ Alcalase ที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 25% ใช้น้ำปลาที่หมักเป็นเวลา 4 เดือนที่มีปริมาณฮีสตามีนไม่แตกต่างกับตัวอย่างควบคุม และสรุปว่า *Virgibacillus* sp. SK37 ไม่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของปริมาณฮีสตามีน

อย่างไรก็ตามการลดเกลือร่วมกับการปรับพีเอช เป็น 6.8 ส่งผลให้ปริมาณคาตาเวอรินเพิ่มขึ้น 2 เท่า ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็นสภาวะที่ก่อให้เกิดการสะสมของคาตาเวอริน แบคทีเรียชอบเกลือปานกลางที่เจริญที่สภาวะนี้อาจมีส่วนร่วมต่อการผลิตสารคาตาเวอริน นอกจากนี้ แม้สภาวะในการหมักที่ศึกษาจะมีผลต่อไทรามิน แต่ปริมาณไทรามินมีน้อยมากในทุกตัวอย่าง ส่วนสภาวะในการหมักไม่มีผลต่อปริมาณสเปนอร์มีดินในผลิตภัณฑ์น้ำปลาที่ได้

ตารางที่ 3.7 ปริมาณโอจินิกเอมีน (ppm) ของตัวอย่างน้ำปลาหมักที่เติมกล้าเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน

Sample	Cadaverine	Histamine	Tyramine	Sperimidine
Control 30%NaCl	15.50±2.11 ^a	7.42±1.32 ^{bc}	0.34±0.31 ^a	7.06±1.16
30%NaCl+SK37	17.22±3.18 ^a	8.76±0.63 ^{bc}	0.08±0.21 ^a	11.15±4.93
Control 15%NaCl	21.13±0.43 ^a	5.87±1.72 ^{ab}	4.48±0.16 ^c	5.21±2.80
15%NaCl+SK37	21.02±3.23 ^a	4.73±0.09 ^a	0.46±0.25 ^{ab}	ND
Control pH6.8	52.44±3.31 ^b	6.74±0.01 ^{ab}	0.57±0.00 ^{ab}	4.50±1.88
pH6.8+SK37	46.74±7.66 ^b	9.40±0.73 ^c	0.97±0.23 ^b	3.38±1.30

ND: Not detected;

Different superscripts indicate significant difference (P<0.05) in column.

3.4.2.3 สารระเหยในน้ำปลา

พบสารระเหยในตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำปลาทั้งหมด 35 ชนิด ประกอบด้วยสารในกลุ่มแอลกอฮอล์ 10 ชนิด แอลดีไฮด์ 7 ชนิด คีโตน 1 ชนิด สารที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ 4 ชนิด สารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ 8 ชนิด กรด 4 ชนิด และ ฟิวเรน 1 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3.8

พบสารระเหยประเภทแอลกอฮอล์หลายชนิดในตัวอย่างน้ำปลาหมักทั้ง 3 สภาวะ โดยตัวอย่างที่หมักด้วยเกลือ 15%, พีเอช 6.8 มีปริมาณแอลกอฮอล์มากกว่าตัวอย่างอื่น โดยเฉพาะ 1-Pentanol, 1-Hexanol, 1-Octanol และ 2,7-Octadien-1-ol ในขณะที่การลดเกลือลง 15% โดยไม่ปรับ พีเอช ไม่ส่งผลให้มีปริมาณสารระเหยแอลกอฮอล์แตกต่างจากตัวอย่างที่มีเกลือ 30% แสดงให้เห็นว่าการปรับพีเอชเป็นกลางมีผลต่อการเกิดสารระเหยในระหว่างกระบวนการหมักอย่างมาก ทั้งนี้อาจเกิดจากการเจริญเติบโตของเชื้อชอบเค็มปานกลางทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีน ไขมัน และสารอื่นๆ เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารในกลุ่มแอลกอฮอล์

มีรายงานว่า 3-Methylbutanal ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแอลดีไฮด์ให้กลิ่นเนื้อต้ม (Udomsil et al., 2011) ซึ่งเป็นกลิ่นหลักในน้ำปลา Dougan และ Haward (1975) อธิบายถึงกลิ่นหลักของน้ำปลา 3 กลิ่นใหญ่ที่บ่งชี้ลักษณะของน้ำปลาเอเชียคือ กลิ่นคาวปลาและกลิ่นรุนแรงของสารแอมโมเนียคัล (Fishy ammoniacal) กลิ่นหอมเนยแข็ง (Cheesy) และกลิ่นเนื้อต้ม (Meaty notes) โดยกลิ่นเหล่านี้ถือเป็นกลิ่นในเชิงบวก จากการทดลองพบว่าการเติมเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสาร 3-Methylbutanal ตัวอย่างที่มีการปรับค่าพีเอชเป็น 6.8 พบว่ามีปริมาณสาร Nonanal และ Benzaldehyde ซึ่งให้กลิ่นไขมัน และ อัลมอนด์ ตามลำดับสูงกว่าตัวอย่างที่หมัก

ด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ 15% และ 30% ทั้งที่เติมและไม่เติมสารละลายเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 มีการรายงานว่าสารที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบทำให้เกิดกลิ่นในเชิงลบ Gram และ Huss (1996) รายงานว่าสารที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ทำให้เกิดสารกลุ่มซัลไฟด์ ที่ให้กลิ่นไม่ดี (Off-odor) Shimoda et al. (1996) รายงานว่า Dimethyl sulfide, Dimethyl disulfide และ Dimethyl trisulfide ทำให้เกิดกลิ่นอูจระในน้ำปลา รวมทั้งสารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มีค่าระดับการเริ่มรับรู้ (Threshold) ที่ต่ำ ทำให้สารที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบมีความสำคัญต่อกลิ่นของน้ำปลา จากผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างน้ำปลาหมักที่มีการปรับพีเอชเป็น 6.8 มีปริมาณของ Dimethyl disulfide, Dimethyl trisulfide และ 3-(Methylthio)propanol สูงกว่าการหมักวิธีอื่นๆ ($P < 0.05$) ซึ่งบ่งชี้ถึงลักษณะกลิ่นรสที่ไม่ดี ในตัวอย่างที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 30% ที่เติมกล้ำเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 มีปริมาณ 3-(Methylthio)propanal เพิ่มขึ้นสูงกว่าตัวอย่างควบคุม ($P < 0.05$)

ตารางที่ 3.8 สารระเหยของตัวอย่างน้ำปลา ที่หมักด้วยเกลือและค่าพีเอชต่างๆร่วมกับการเติม ตะกอนเซลล์ *Virgibacillus* sp. SK37 เป็นระยะเวลา 6 เดือน

RI	Peak name	Relative peak area					
		30%NaCl NaCl	SK37/30%	15%NaCl %NaCl	SK37/15 , pH6.8	15%NaCl NaCl, pH6.8	SK37/15%
Alcohol							
961	Ethanol	0.003 ^a	0.059 ^a	0.078 ^a	0.169 ^a	0.56 ^a	1.393 ^b
1156	1-Butanol	ND	ND	ND	ND	0.053	0.051
1168	1-Penten-3-ol	0.005 ^a	0.003 ^a	0.005 ^a	0.007 ^a	ND	0.073 ^b
1210	3-Methyl, 1-butanol	0.010 ^a	0.009 ^a	0.008 ^a	0.037 ^b	0.046 ^b	0.017 ^a
1251	1-Pentanol	0.012 ^a	0.013 ^a	0.025 ^a	0.031 ^a	0.401 ^b	0.411 ^b
1347	1-Hexanol	0.018 ^a	0.005 ^a	0.004 ^a	0.008 ^a	0.471 ^c	0.213 ^b
1482	2-Ethyl, 1-hexanol	0.021	0.021	0.017	0.02	ND	ND
1551	1-Octanol	0.018 ^a	0.007 ^a	0.009 ^a	0.009 ^a	3.190 ^c	1.280 ^b
1616	Ethanol,2-(2-ethoxyethoxy)	0.146 ^d	0.027 ^{ab}	0.093 ^c	0.023 ^a	0.041 ^b	ND
1677	2,7-Octadien-1-ol	ND	ND	0.024 ^a	0.025 ^a	0.381 ^b	0.296 ^b
Aldehyde							
924	3-Methylbutanal	0.03	0.118	0.081	0.096	0.392	0.755
1081	Hexanal	0.018	0.004	0.003	0.007	0.018	0.01
1088	2-Methyl,2-butenal	ND	ND	0.007 ^a	0.009 ^a	0.026 ^b	0.027 ^b
1381	Nonanal	0.031 ^a	0.016 ^a	0.016 ^a	0.027 ^a	0.117 ^b	0.193 ^c

ตารางที่ 3.8 (ต่อ)

RI	Peak name	Relative peak area					
		30%NaCl	SK37/30% NaCl	15%NaCl	SK37/15% %NaCl	15% NaCl, pH6.8	SK37/15% NaCl, pH6.8
1512	Benzaldehyde	0.142 ^a	0.122 ^a	0.113 ^a	0.113 ^a	0.897 ^c	0.469 ^b
1591	Benzonitrile	ND	ND	ND	ND	0.302	0.172
1634	Benzeneacetaldehyde	0.098	0.09	0.159	0.164	ND	ND
Ketone							
1280	Cyclohexanone	0.054 ^a	0.046 ^a	0.041 ^a	0.044 ^a	0.425 ^c	0.248 ^b
Sulfur-containing compound							
1070	Dimethyl disulfide	0.001 ^c	0.001 ^c	0.001 ^c	0.002 ^c	0.117 ^a	0.071 ^b
1364	Dimethyl trisulfide	0.007 ^c	0.001 ^c	0.007 ^c	0.004 ^c	0.161 ^a	0.087 ^b
1441	3-(Methylthio)propanal	0.085 ^b	0.128 ^a	0.087 ^b	0.075 ^b		
1712	3-(Methylthio)propanol	0.089 ^c	0.064 ^c	0.036 ^c	0.068 ^c	0.258 ^b	0.671 ^a
Nitrogen-containing compound							
1261	Methyl pyrazine	0.011 ^c	0.010 ^c	0.011 ^c	0.018 ^c	0.164 ^a	0.090 ^b
1315	2,5-Dimethyl, pyrazine	0.101 ^c	0.100 ^c	0.125 ^c	0.132 ^c	0.384 ^a	0.286 ^b
1321	2,6-Dimethyl, pyrazine	0.034 ^b	0.026 ^b	0.034 ^b	0.041 ^b	0.322 ^a	0.240 ^a
1338	2,3-Dimethyl, pyrazine					1.505	1.741
1376	2-Ethyl-6-methyl pyrazine,	0.015 ^b	0.005 ^b	0.011 ^b	0.016 ^b	0.249 ^a	0.215 ^a
1437	2,6-Diethyl pyrazine	0.005 ^b		0.003 ^b	0.003 ^b	5.940 ^a	6.845 ^a
1458	2-methyl-6-propyl pyrazine					0.38	0.493
1470	Tetramethylpyrazine,					7.516	9.313
Acid							
1535	Propanoic acid	0.028 ^b	0.005 ^b	0.007 ^b		0.302 ^a	0.355 ^a
1562	2-Methylpropanoic acid	0.069	0.026	0.037	0.007	0.228	0.097
1622	Butanoic acid	0.021 ^b	0.021 ^b	0.043 ^b	0.002 ^b	0.068 ^b	0.226 ^a
1663	3-Methylbutanoic acid	0.647 ^a	0.436 ^b	0.428 ^b	0.128 ^c		
Furan							
1651	2-Furanmethanol	0.087 ^a	0.137 ^{ab}	0.069 ^a	0.062 ^a	0.570 ^c	0.245 ^b

Note: ^A The value represents ratio of peak area of any compound to that of internal standard (cyclohexanol);

ND, Not detected;

RI, Retention indices calculated for DB-WAX column using n-alkanes as standards

Different superscripts within a row indicate significant differences (P<0.05).

ตัวอย่างน้ำปลาหมักที่มีการปรับพีเอชเป็น 6.8 พบกลุ่มสารไพราซีนสูงกว่าตัวอย่างอื่น สอดคล้องกับงานของ Shimoda et al (1996) ที่วิเคราะห์การระเหยในน้ำปลาที่ไม่ได้ปรับ พีเอช และ น้ำปลาที่ปรับพีเอชเป็น 11 พบว่าที่ค่าพีเอชที่สูงขึ้นทำให้สารระเหยที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบมี ปริมาณมากขึ้น โดยตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 ที่พีเอช 6.8 ตรวจพบ Methylpyrazine ซึ่งให้กลิ่นคล้ายกระเทียม และ 2,5-Dimethylpyrazine ที่ให้กลิ่นฉุนคั่ว ต่ำกว่า ตัวอย่างควบคุม ($P < 0.05$) ในขณะที่การเติม *Virgibacillus* sp. SK37 ในตัวอย่างที่ไม่ได้ปรับพีเอชที่ ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ทั้ง 2 ระดับ ไม่มีผลต่อปริมาณสารในกลุ่มนี้ ($P > 0.05$)

กรดที่ระเหยได้ที่ตรวจพบในการทดลองนี้คือ Propanoic acid และ 2-Methylpropanoic acid โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่เติมและไม่เติมเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 ที่ทุก สภาวะการหมัก สำหรับ Butanoic acid และ 3-Methylbutanoic acid เป็นกรดที่ให้กลิ่นในเชิงลบคือ กลิ่นหืน โดยตัวอย่างที่เติมสารละลายเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 และปรับพีเอช 6.8 มีปริมาณ Butanoic acid สูงสุด นอกจากนี้ในการศึกษานี้พบสารฟูแรนเพียง 1 ชนิด คือ 2-Furanmethanol ซึ่งให้ กลิ่นน้ำตาลไหม้ โดยน้ำปลาหมักที่ปรับค่าพีเอชเป็น 6.8 พบในปริมาณที่สูงกว่าสภาวะอื่นๆ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามสารดังกล่าวไม่มีบทบาทต่อกลิ่นของน้ำปลามากนักเนื่องจากมีค่าการรับรู้ที่สูง (Giri et al., 2010)

การหมักน้ำปลาโดยปรับพีเอชของระบบให้มีค่า 6.8 ส่งผลให้เกิดสารระเหยในปริมาณ สูงกว่าการหมักที่ค่าพีเอช 5.5-5.8 โดยเกิดสารระเหยในปริมาณสูงหลายชนิดซึ่งเป็นสารระเหยที่ให้ กลิ่นไม่พึงประสงค์ ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางประสาทสัมผัสที่มีกลิ่นฉุนและมีกลิ่นแตกต่างไป จากน้ำปลา ในขณะที่การหมักที่เกลือ 15% ส่งผลให้ได้น้ำปลาที่มีชนิดและปริมาณสารระเหย ใกล้เคียงกับการหมักที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 30% ดังนั้นการหมักน้ำปลาด้วยสัดส่วนของเกลือ 15% นอกจากจะสามารถเร่งกระบวนการย่อยสลายโปรตีนแล้ว ยังคงให้กลิ่นรสและสารระเหย ใกล้เคียงกับตัวอย่างที่หมักด้วยเกลือ 30% การใช้ตะกอนเซลล์ *Virgibacillus* sp. SK37 ทั้งที่สภาวะ เกลือ 30% และ 15% มีแนวโน้มในการลดการเกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ เช่นกลิ่นอูจระและกลิ่นหืน ได้แก่ 3-methylbutanoic acid



บทที่ 4
บทสรุป

บทที่ 4

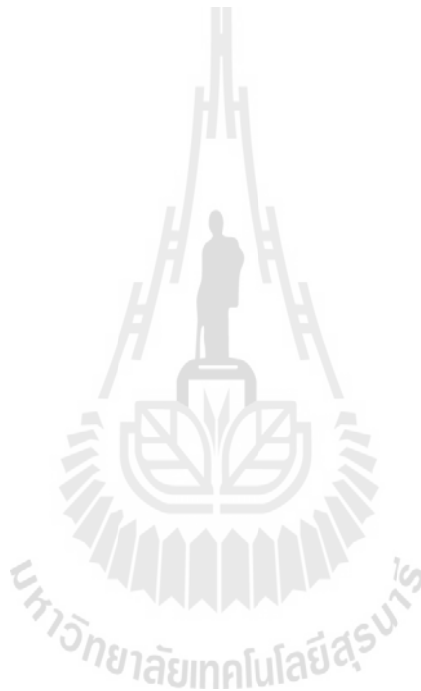
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

การสร้างโปรตีนที่หึ่งออกนอกเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนจากผลลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหาร พบว่ากากยีสต์ซึ่งเป็นผลผลิตพลอยได้จากโรงงานผลิตเบียร์เป็นแหล่งไนโตรเจนราคาถูกที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนจาก *Virgibacillus* sp. SK37 โดยปริมาณกากยีสต์ที่เหมาะสมคือ 1% (w/v) และสภาวะที่เหมาะสมในเห็ยวนำการสร้างโปรตีนคือ ที่พีเอช 7.5 โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5% ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน สภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 คือ การใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-มาเลต (Tris-maleate), พีเอช 7 แข็งเย็น ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มี EDTA เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และโปรตีนที่สกัดได้มีขนาดโมเลกุลประมาณ 19 20 22 32 34 และ 44 กิโลดาลตัน สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ที่สกัดได้คือ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 8 และ 11 โปรตีนดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่มซีรีนและมีคุณลักษณะคล้ายซับทิลิซิน (Subtilisin-like) กิจกรรมของโปรตีนที่สกัดได้ถูกกระตุ้นด้วยเกลือแคลเซียมคลอไรด์ โดยมีกิจกรรมเพิ่มขึ้น 4 เท่า เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์มากกว่าหรือเท่ากับ 100 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้แคลเซียมคลอไรด์ยังเพิ่มเสถียรภาพของเอนไซม์ให้มีความคงทนต่ออุณหภูมิ การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ทำให้ค่ากิจกรรมของการย่อยสลายโปรตีนเพิ่มขึ้น โดยโปรตีนสกัดจาก *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถย่อยเคซีนได้ดีที่สุดที่โซเดียมคลอไรด์ 0 และ 10% ส่วนที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อปลา (fish muscle) โปรตีนถั่วเหลืองสกัด และเคซีนของโปรตีนสกัดลดลงโดยสามารถย่อยโปรตีนตั้งต้นทั้งสามชนิดไม่ต่างกัน ($P > 0.05$) การใช้โปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ที่ผลิตจาก *Virgibacillus* sp. SK37 ในการย่อยปลากระดูกในสภาวะการหมักน้ำปลา พบว่าการเติมแคลเซียมคลอไรด์ร่วมกับเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 ส่งผลให้การย่อยสลายโปรตีนปลาเพิ่มขึ้น ผลการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าโปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 อาจเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายโปรตีนปลาในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา

จากการทดลองหมักปลากระดูกร่วมกับการใช้โปรตีนที่ตรึงอยู่กับเซลล์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 และร่วมกับการลดปริมาณเกลือ หรือ การลดปริมาณเกลือร่วมกับการเพิ่มพีเอช ของการหมักเป็น 6.8 พบว่าการปรับแปรสภาวะการหมักทั้งสองปัจจัยมิได้มีผลเพิ่มการอยู่รอดของ *Virgibacillus* sp. SK37 แต่มีผลเพิ่มความหลากหลายของแบคทีเรียอื่นในระบบการหมัก โดยเฉพาะการลดเกลือในกระบวนการหมักร่วมกับการปรับค่าพีเอชเป็น 6.8. ส่งผลให้ระดับการย่อยสลายโปรตีนมีค่าสูงกว่าการหมักที่เกลือ 30% นอกจากนี้พบว่าการลดเกลือเพียงอย่างเดียว ไม่มีผลต่อ

ปริมาณไบโอจินิกเอมีนในผลิตภัณฑ์สุดท้าย แต่การลดเกลือรวมกับการเพิ่มค่าพีเอชเป็น 6.8 ส่งผลให้ปริมาณไบโอจินิกเอมีนเพิ่มขึ้น การหมักน้ำปลาโดยปรับค่าพีเอชของระบบให้มีค่า 6.8 ส่งผลให้เกิดสารระเหยในปริมาณที่สูง โดยเฉพาะไดเมทิลไดซัลไฟด์ซึ่งให้กลิ่นอุจจาระ (Fecal note) และกลิ่นไม่พึงประสงค์อื่นๆ ในขณะที่การหมักที่เกลือ 15% ส่งผลให้ได้น้ำปลาที่มีชนิดและปริมาณสารระเหยใกล้เคียงกับการหมักแบบดั้งเดิมที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 30%

เพื่อให้เกิดการใช้กล้าเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพ ควรมีการพัฒนาสายพันธุ์ของกล้าเชื้อให้สามารถอยู่รอดในกระบวนการหมักได้นานขึ้นพร้อมกับสามารถย่อยสลายโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมัก อีกทั้งควรพัฒนาแนวทางในการติดตามการคงอยู่ของกล้าเชื้อด้วยการตรวจนับสารพันธุกรรมเพื่อที่จะได้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงประชากรกล้าเชื้ออย่างแท้จริง



เอกสารอ้างอิง

- วิไลลักษณ์ กลมกลาง. 2538. การศึกษาการหมักน้ำปลาโดยใช้เชื้อแบคทีเรียชอบเกลือร่วมกับโคจิ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. **Journal of agricultural and food chemistry**. 27:1256–1262.
- Arahal, D. R., Carmen-Marquez, M. Volcani, B., Schleifer, K.H. and Ventosa, A. (1999). *Bacillus marismortui* sp. nov., a new moderately halophilic species from the Dead Sea. **International journal of systematic bacteriology**. 49: 521-530.
- Argyle, P. J., Mathison, G. E. and Chandan, R. C. (1976). Production of cell-bound proteinase by *Lactobacillus bulgaricus* and its location in the bacterial cell. **The Journal of applied bacteriology**. 41: 175-184.
- Barrett, A. J. and Kirschke, H. (1981). Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. **In Methods in enzymology**. Vol 80. New York: Academic Press. pp. 535-561.
- 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. **International Journal of Food science and Technology**. 14:603–612.
- Beddows, C. G., Ardeshir, A. G., and Daud, W. J. (1979). Biochemical changes occurring during the manufacture of Budu. **Journal of the science of food and agriculture**. 30(11): 1097-1103.
- Beg, Q. K., and Gupta, R. (2003). Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. **Enzyme and Microbial Technology**. 32(2): 294-304.
- Boominadhan, U. and Rajakumar, R. (2009). Optimization of protease enzyme production using *Bacillus* sp. isolated from different wastes. **Botany Research International**. 2: 83-87.
- Capiralla, H., Hiroi, T., Hirokawa, T. and Maeda, S. (2002). Purification and characterization of a hydrophobic amino acid-specific endopeptidase from *Halobacterium halobium* S9 with potential application in debittering of protein hydrolysates. **Process biochemistry**. 38: 571-579.
- Carrasco, I. J., Márquez, M. C. and Ventosa, A. (2009). *Virgibacillus salinus* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium from sediment of a saline lake. **International journal of**

- systematic and evolutionary microbiology.** 59:3068-3073.
- 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. **Systematic and applied microbiology.** 22: 360-365.
- Chamroensaksri, N., Akaracharanya, A., Visessanguan, W., and Tanasupawat, S. (2008). Characterization of halophilic bacterium NB2-1 from Pla-Ra and its protease production. **Journal of food biochemistry.** 32: 536-555.
- Chen, Y. G., Cui, X. L., Fritze, D., Chai, L. H., Schumann, P., Wen, M. L., et al. (2008). *Virgibacillus kekensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt lake in China. **International journal of systematic and evolutionary microbiology.** 58: 647-653.
- Chen, Y. G., Cui, X. L., Wang, Y. X., Zhang, Y. Q., Tang, S. K., Li, W. J., et al. (2009). *Virgibacillus sediminis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt lake in China. **International journal of systematic and evolutionary microbiology.** 59: 2058-2063.
- Chen, Y. G., Liu, Z. X., Peng, D. J., Zhang, Y. Q., Wang, Y. X., Tang, S. K., et al. (2009). *Virgibacillus litoralis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from saline soil. **Antonie van Leeuwenhoek.** 96: 323-329.
- Dadakova, E., Krizek, M., and Pelikanova, T. 2009. Determination of biogenic amines in foods using ultraperformance liquid chromatography (UPLC). **Food Chemistry.** 116: 365-370.
- Deng, A., Wu, J., Zhang, Y., Zhang, G., and Wen, T. (2010). Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001. **Bioresource technology.** 101(18): 7100-7106.
- Devi Rajeswari, V., Jayaraman, G., and Sridharan, T. B. (2012). Purification and characterization of extracellular protease from Halotolerant bacterium *Virgibacillus dokdonensis* VITP14. **Asian Journal of Biochemistry.** 7(3): 123-132.
- do Nascimento, R.P., Junior, N.A. and Coeho, R.R.R. (2011). Brewer's spent grain and corn steep liquor as alternative culture medium substrates for proteinase production by *Streptomyces malaysiensis* AMT-3. **Brazilian Journal of Microbiology.** 42: 1384-1389.
- Dougan, J. and Howard, G. E. (1975). Some flavoring constituents of fermented fish sauces. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** 26:887-894.

- Exterkate, F.A. (2000). Structural changes and interactions involved in the Ca^{2+} -triggered stabilization of the cell-bound cell envelope proteinase in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11. **Applied and environmental microbiology**. 66:2021–2028.
- Exterkate, F. A., and de Veer, G. J. C. M. (1985). Partial isolation and degradation of casein by cell wall proteinase (s) of *Streptococcus cremoris* HP. **Applied and environmental microbiology**. 49: 328-332.
- Ezzat, N., El Soda, M. E., and Shafei, H. (1988). The cell-bound proteinase system of *Lactobacillus casei*-purification. **International journal of food microbiology**. 6: 327-332.
- Fernandez-Espla, M.D., Garault, P., Monnet, V., and Rul., F. (2000). *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. **Applied and environmental microbiology**. 66: 4772-4778.
- Ferna'ndez de Palencia P., Pela'ez C., and Marti'n-Herna'ndez M.,C. (1997). Specificity of the bound and free forms of the cell-envelope proteinase of *Lactobacillus casei* subsp. IFPL 731 towards the α_{s-1} -casein-(1-23)-fragment. **Letters in applied microbiology** 25:388–392.
- Fields, R. (1972). The rapid determination of amino groups with TNBS. **Method Enzymol**. 25(B): 464-468.
- Fricke, B., Buchmann, T., and Friebe, S. (1995). Unusual chromatographic behavior and one-step purification of a novel membrane proteinase from *Bacillus cereus*. **Journal of Chromatography**. 715:247–258.
- Fricke, B., Dr"oßler, K., Willhardt, I., Schierhorn, A., Menge, S., and R"ucknagel, P. (2001). The cell envelopebound metalloprotease (camelysin) from *Bacillus cereus* is a possible pathogenic factor. **Biochimica et biophysica acta**. 1537:132–46.
- 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. **Journal of Food Science**. 69(2): 45-49.
- Garabito, M. J., Arahall, D. R., Mellado, E., Marquez, M. C., and Ventosa, A. (1997). *Bacillus salexigens* sp. nov., a new moderately halophilic *Bacillus* species. **International journal of systematic bacteriology**. 47: 735-741.
- García-Carreño., F., L., Dimes, L., E., and Haard, N., F. (1993). Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinase or proteinaceous proteinase inhibitors.

- Analytical biochemistry.** 214: 65-69.
- Geis, A., Bockelmann, W., and Teuber, M. (1985). Simultaneous extraction and purification of a cell wall-associated peptidase and β -casein specific protease from *Streptococcus cremoris* AC1. **Applied microbiology and biotechnology.** 23:79–84.
- Giri, A., Osako, K., and Ohshima, T. (2010). Identification and characterization of headspace volatiles of fish miso, a Japanese fish meat based fermented paste, with special emphasis on effect of fish species and meat washing. **Food Chemistry.** 120: 621-631.
- Godfrey, T., and West, S. (1996). **Industrial enzymology.** (2nd ed.). New York: Macmillan Publishers.
- Gram, L., and Huss, H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. **International journal of food microbiology.** 33. 121-137.
- Graycer, T., P., Ballinger, M., D., and Wells, J., A. (2004). Subtilisin. In: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF (eds) **Handbook of proteolytic enzymes**, 2nd edn. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp 1786–1792.
- Gupta, A., Joseph, B., Mani, A., and Thomas, G. (2008). Biosynthesis and properties of an extracellular thermostable serine alkaline proteinase from *Virgibacillus pantothenicus*. **World journal of microbiology and biotechnology.** 24: 237-243.
- Heyrman, J., Vos, P. D. and Logan, (2003). Genus XIX *Virgibacillus* In P. D. Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, E. A. Rainey, K. H. Schleifer and W. B. Whitman (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** (Vol. 3, 2nd ed., 193-204). New York: Springer.
- Hiraga, K., Nishikata, Y., Namwong, S., Tanasupawat, S., Takada, K., and Oda, K. 2005. Purification and characterization of serine proteinase from a halophilic bacterium, *Filobacillus* sp. RF2-5. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry.** 38: 38-44.
- Hua, N. P., Hamza-Chaffai, A., Vreeland, R. H., Isoda, H., and Naganuma, T. (2008). *Virgibacillus salarius* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Saharan salt lake. **International journal of systematic and evolutionary microbiology.** 58: 2409-2414.
- Hutadilok-Towatana, N., Painupong, A., and Suntainalert, P. (1999). Purification and Characterization of an Extracellular Protease from Alkaliphilic and Thermophilic *Bacillus* sp. PS719. **Journal of bioscience and bioengineering.** 87: 581-587.

- Jeon, C. O., Kim, J. M., Park, D.-J., Xu, L.-H., Jiang, C.-L. and Kim, C.-J. (2009). *Virgibacillus xinjiangensis* sp. nov., isolated from a Salt Lake of Xin-jiang Province in China. **Journal of Microbiology**. 47: 705-709.
- Karbalaee-Heidari, H. R.; Ziaee, A. A.; Schaller, J. and Amoozegar, M. A. (2007). Purification and characterization of an extracellular haloalkaline protease produced by the moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. **Enzyme and microbial technology**. 40: 266–272.
- Kim, J., Jung, M. J., Roh, S. W., Nam, Y.-D., Shin, K. S. and Bae, J. W. (2011). *Virgibacillus alimentarius* sp. Nov., a novel bacterium isolated from traditional Korean. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. 61: 2851-2855.
- Kim, S. B., Lee, D.W., Cheigh, C.I., Choe, E.A., Lee, S.J., Hong, Y.H., Choi, H.J., Pyun, Y.R. (2006). Purification and characterization of a fibrinolytic subtilisin-like protease of *Bacillus subtilis* TP-6 from an Indonesian fermented soybean, tempeh. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 33: 436-444.
- Kobayashi, T., Hakamada, Y., Hitomi, J., Koike, K., Ito, S. (1996). Purification of alkaline proteases from a *Bacillus* strain and their possible interrelationship. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 45:63–71.
- Kojic, M., Fira, D., Banina, A., and Topisirovic, L. (1991). Characterization of the cell wall-bound proteinase of *Lactobacillus casei* NH14. **Applied and environmental microbiology**. 57: 1753-1757.
- Kumar, C.G. and Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology advances**. 17: 561-594.
- Laan, H., Konings, W., N. (1989). Mechanism of proteinase release from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris Wg2. **Applied and environmental microbiology**. 55:3101–3106.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227:680–685.
- Laloi, P., Atlan, D., Blanc, B., Gilbert, C. and Portalier, R. (1991). Cell-wall-associated proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ 397: differential extraction, purification and properties of the enzyme. **Applied microbiology and biotechnology**. 36:196–204.

- Lapsongphon, N., Cadwallader, K. R., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2013). Characterization of Protein Hydrolysis and Odor-Active Compounds of Fish Sauce Inoculated with *Virgibacillus* sp. SK37 under Reduced Salt Content. **Journal of agricultural and food chemistry**. 61:6604-6613.
- Lee, S.-Y., Kang, C.-H., Oh, T.-K. and Yoon, J.-H. (2011). *Virgibacillus campisalis* sp. nov., isolated from a marine solar saltern in the west coast of Korean. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. 62: 347-351.
- Lee, J. S., Lim, L. M., Lee, K. C., Lee, J. C., Park, Y. H. and Kim, C. J. (2006). *Virgibacillus koreensis* sp. nov., a novel bacterium from a salt field, and transfer of *Virgibacillus picturae* to the genus *Oceanobacillus* as *Oceanobacillus picturae* comb. nov. with emended descriptions. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. 56: 251- 257.
- Lopetcharat, K., Choi, Y. J., Park, J. W., and Daeschel, M. A. (2001). Fish sauce products and manufacturing : a review. **Food Review International** 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. **Journal of Biological Chemistry**. 193:265–275.
- Manachini P.L., Fortina M.G. (1998). Production in sea-water of thermostable alkaline proteases by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letter**. 20: 565-568.
- Manachini, P. L.; Fortina, M. G. and Parini, C. (1988), Alkaline protease produced by *Bacillus thermorubera* new species of *Bacillus*. **Applied microbiology and biotechnology**. 28, 409-413.
- Margot, P. and Karamata, D. (1996). The *wprA* gene of *Bacillus subtilis* 168, expressed during exponential growth, encodes a cell-wall-associated protease. **Microbiology**. 142:3437–44.
- Martín-Hernández, M.C., Altling, A.C., and Exterkate, F. A. (1994). Purification and characterization of the mature, membrane-associated cell-envelope proteinase of *Lactobacillus helveticus* L86. **Applied microbiology and biotechnology**. 40: 828-834.
- Maurer, K-H. (2004). Detergent proteases. **Current Opinion Biotechnology**. 15(4): 330-334.
- McKane, L., and Kandel, J. (1985). **Microbiology: essentials and applications**. New York: McGraw-Hill.
- Mehta, V. J., Thumar, J. T. and Singh, S. P. (2006). Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. **Bioresource technology**. 97(14): 1650-1654.

- Monnet, V., Bockelmann, W., Gripon, J. C., and Teuber, M. (1989). Comparison of cell wall proteinases from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AC1 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763. **Applied microbiology and biotechnology**. 31: 112-118.
- Monnet, V., Le Bars, D. and Gripon, J-C. (1987). Purification and characterization of a cell wall proteinase from *Streptococcus lactis* NCDO 763. **The Journal of dairy research**. 54:247–55.
- Morihara, K. (1974). Comparative specificity of microbial proteinases. **Advances in enzymology and related areas of molecular biology**. 41: 179-243.
- Moon, S-H. and Parulekar S.J. (1991). A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*. **Biotechnology and bioengineering**. 37: 467-483.
- Naes, H., Chrzanowska, J. and Blom, H. (1991). Partial purification and characterization of a cell wall bound proteinase from *Lactobacillus casei*. **Food Chemistry**. 42:65–79.
- Namwong, S., Hiraga, K., Takada, K., Tsunemi, M., Tanasupawat, S., and Oda, K. (2006). A halophilic serine proteinase from *Halobacillus* sp. SR5-3 isolated from fish sauce: purification and characterization. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**. 70:1395–401.
- Namwong, S., Tanasupawat, S., Smitinont, T., Visessanguan, W., Kudo, T. and Iton, T. (2005). Isolation of *Lentibacillus salicampi* strains and *Lentibacillus juripiscarius* sp. nov. from fish sauce in Thailand. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. 55: 315-320.
- Niederberger, T. D., Steven, B., Charvet, S., Barbier, B., and Whytent, L. G. (2009). *Virgibacillus arcticus* sp. nov., a moderately halophilic, endospore-forming bacterium from permafrost in the Canadian high Arctic. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. 59: 2219-2225.
- Noguchi, H., Uchino, M., Shida, O., Takano, K., Nakamura, L.K., and Komagata, K. (2004). *Bacillus vietnamensis* sp. Nov., a moderately halotolerant, aerobic, endospore-forming bacterium isolated from Vietnamese fish sauce. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. 54: 2117-2120.
- Oren, A. (2003). Halophilic microorganisms and their environments. **International Microbiology**. 6(2): 151-152.

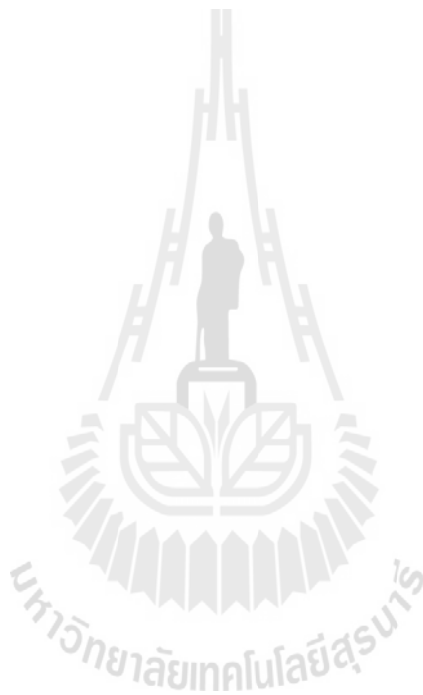
- Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*. [On-line serial] 4. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18412960>
- Park J. N., Fukumoto, Y., Fujita, E., Tanaka, T., Washio, T., Otsuka, S., Shimazu, T., Watanabe, K., and Abe, H. (2001). Chemical composition of fish sauces produced in Southeast and East Asian countries. **Journal of Food Composition Analysis**. 14: 113-125.
- Peng, Q. Z., Chen, J., Zhang, Y. Q., Chen, Q. H., Peng, D. J., Cui, X. L., et al. (2009). *Virgibacillus zhanjiangensis* sp. nov., a marine bacterium isolated from sea water. **Antonie van Leeuwenhoek**. 96: 645-652.
- Pham, A.J., Schilling, M.W., Yoon, Y., Kamadia, V.V., and Marshall, D.L. (2008). Characterization of fish sauce aroma-impact compounds using GC-MS, SPME-Osmegco, and Stevens' power law exponents. **Journal of Food Science**. 73. 268-274.
- Phrommao, E., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2011). Identification of novel halotolerant bacillopeptidase F-like proteinases from a moderately halophilic bacterium, *Virgibacillus* sp. SK37. **Journal of Applied Microbiology**. 110(1): 191-201.
- Pornraveewat, 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.
- Rahman, R.N.Z.A., Razak, C.N., Ampon, K., Basri, M., Yunus, W.M.Z.W. and Salleh, A.B. (1994). Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. **Applied microbiology and biotechnology**. 40:822-827.
- Rajeswari, V. D., Jayaraman, G., and Sridharan, T. B. (2012). Purification and Characterization of Extracellular Protease from Halotolerant Bacterium *Virgibacillus dokdonensis* VITP14. *Asian Journal of Biochemistry*. 7(3): 123-132.
- Raksakulthai, N., and Haard, N. F. (1992). Peptides and amino acids and the flavor of fish sauce. **Asean Food Journal**. 77-86.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatege, M. S., and Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Review**. 62(3): 597-635.
- Rawlings, N. D., and Barrett, A. J. (1993). Evolutionary families of peptidases. **Biochemical Journal**. 290 (Pt 1): 205-218.

- Rohban, R., Amoozegar, M. A., and Ventosa, A. (2009). Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. **Journal of industrial microbiology and biotechnology**. 36:(3) 333-340.
- Ryu, K. and Dordick, J.S. (1994). Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile. **Enzyme and Microbial Technology**. 16: 266-275
- Sa' nchez-Porro, C., Mellado, E., Bertoldo, C., Antranikian, G., and Ventosa, A. (2003). Screening and characterization of the protease CP1. produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76. **Extremophiles**. 7. 221–228.
- Scopes RK. (1994). **Protein purification: principles and practice**. 3rd ed. New York: Springer-Verlag. 380 p.
- Seiler, H. and Wenning, M. (2013). *Virgibacillus halotolerans* sp. nov., isolated from a dairy product. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. 63: 3358-3363.
- Shahbal, S., Hemme, D., and Renault, P. (1993) Characterization of a cell envelope-associated proteinase activity from *Streptococcus thermophilus* H-strains. **Applied and environmental microbiology**. 59:177–182.
- Shimizu, Y., Nishino, T., and Muraio, S. (1983). Purification and characterization of a membrane bound serine protease of *Bacillus subtilis* IFO 3027. **Agricultural and biological chemistry**. 47:1775–82.
- Shimoda, M., Rossana, R., Peralta, R., Osajima, Y., (1996). Headspace gas analysis of fish sauce. **Journal of agricultural and food chemistry**. 44. 3601-3605.
- Shimogaki, H., Takeuchi, K., Nishino, T., Ohdera, M., Kudo, T., Ohba, K., et al. (1991). Purification and properties of a novel surface-active agent- and alkaline-resistant protease from *Bacillus* sp. **Agricultural and biological chemistry**. 55:(9) 2251-2258.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2007). NaCl-activated extracellular proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 isolated from fish sauce fermentation. **Journal of food science**. 72:(5) 264-269.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2008a). Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. **Process Biochemistry**. 43: 185-192.

- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2008b). Characterization of Ca^{2+} -activated cell-bound proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 isolated from fish sauce fermentation. **LWT-Food Science and Technology**. 4: 2166-2174.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2010a). A NaCl-stable serine proteinase from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from Thai fish sauce. **Food Chemistry**. 119: 573-579.
- Sinsuwan S, Rodtong S, Yongsawatdikul, J. (2010b). Purification and characterization of a salt-activated and organic solvent-stable heterotrimer proteinase from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from Thai fish sauce. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58 (1): 248-56.
- Sinsuwan S, Rodtong S, Yongsawatdigul J. (2011). Evidence of cell-associated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. **Journal of Food. Science**. 76: 413-419.
- Sung, J. H., Ahn, S. J., Kim, N. Y., Jeong, S. K., Kim, J. K., Chung, J. K. and Lee, H. H. (2010). Purification, molecular cloning, and biochemical characterization of subtilisin JB1 from a newly isolated *Bacillus subtilis* JB1. **Applied biochemistry and biotechnology**. 162: 900-911.
- Tanasupawat, S., Chamroensaksri, N., Kudo, T., and Itoh, T. (2010). Identification of moderately halophilic bacteria from Thai fermented fish (pla-ra) and proposal of *Virgibacillus siamensis* sp. nov. **The Journal of general and applied microbiology**. 56: 369-379.
- Tanasupawat, S., Taprig, T., Akaracharanya, A. and Visessanguan W. (2011). Characterization of *Virgibacillus* strain TKNR13-3 from fermented shrimp paste (*ka-pi*) and its protease production. **African journal of microbiology research [electronic resource]**: 4714-4721.
- Thongthai, C., and Suntinanalert, 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., Suntinanalert, P., and Grant, W. D. (1992). Isolation and characterization of an extremely halophilic archaeobacterium from fermented Thai fish sauce (nam pla). **Letters in applied microbiology**. 14: 111-114.
- Tsakalidou, E., Anastasiou, R., Vandenberghe, I., van Beeumen, J., Kalantzopoulos, G. (1999). Cell-wall-bound proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ACA-DC 178: characterization and specificity for β -casein. **Applied and environmental microbiology**. 65:2035–2040.

- Tungkawachara, S., Park, J. W., and Choi, Y. J. (2003). Biochemical properties and consumer acceptance of pacific whiting fish sauce. **Journal of Food Science** 68 (3): 855-860.
- Udomsil, N., Rodtong, S., Choi, Y.J., Hua, Y. and Yongsawatdigul, J. (2011). Use of *Tetragenococcus halophilus* as a starter culture for flavor improvement in fish sauce fermentation. **Journal of Agriculture Food Chemistry**. 59. 8401-8408.
- Usharani, B., and Muthuraj, M. (2010). Production and characterization of protease enzyme from *Bacillus laterosporus*. **African journal of microbiology research**. 4 (11): 1057-1063.
- Ventosa, A., Nieto, J.J. and Oren, A. (1998). Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Review**. 62(2): 504-544.
- Visser, S., Exterkate, F., A., Slangen, C. J., and de Veer, G. J. C. M. (1986). Comparative study of action cell wall proteinases from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine α_{S-1} β and κ -Casein. **Applied and environmental microbiology**. 52: 1162-1166.
- Wang, C. Y., Chang, C. C., Ng, C. C., Chen, T. W., and Shyu, Y. T. (2008). *Virgibacillus chiguensis* sp. nov., a novel halophilic bacterium isolated from Chigu, a previously commercial saltern located in southern Taiwan. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. 58: 341-345.
- Wang, X., Xue, Y. and Ma, Y. (2010). *Virgibacillus subterraneus* sp. nov., a moderately halophilic Gram-positive bacterium isolated from subsurface saline soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. 60: 2763-2767.
- Xiros, C. and Christakopoulos, P. (2012). Biotechnological potential of brewers spent grain and its recent applications. **Waste and Biomass Valorization**. 3: 213-232.
- Yang, J.-K., Shih, I.-L., Tzeng, Y.-M., Wang, S.-L. (2000). Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. **Enzyme and microbial technology**. 26:406–13.
- Yasothersrikul, S., and Hook, V.,Y. (2000). Detection of proteolytic activity by fluorescent zymogram in-gel assays. **Biotechniques**. 28:1166–1173.
- Yoon, J. H., Oh, T. K. and Park, Y. H. (2004). Transfer of *Bacillus halodenitrificans* Denariáz et al. 1989 to the genus *Virgibacillus* as *Virgibacillus halodenitrificans* comb. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. 54: 2163-2167.

- Yongsawatdigul, J., Rodtong, S., and Raksakulthai, N. (2007). Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter cultures. **Journal of Food Science**. 72(9): 382-390.
- Zaman, M. Z., Abdulmir, A. S., Bakar, F. A., Selamat, J., and Bahar, J. (2009). Microbiological, physicochemical and health impact of high level of biogenic amines in fish sauce. **American journal of applied sciences**. 6.:1199-1211.



ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

1. Fish broth (ที่เติม 25% NaCl)

ปลากะตัก	500.0	กรัม
Sodium chloride	250.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0 ± 0.2

การเตรียม Fish broth :

ต้มน้ำกลั่นให้เดือด เติมปลากะตัก ต้มนาน 30 นาที กรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกกากออก จากนั้นเติมเกลือ

โซเดียมคลอไรด์ ปรับ pH หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. JCM 168 agar

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	180.0	กรัม
FeCl ₂ ·4H ₂ O	36.0	มิลลิกรัม
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.36	มิลลิกรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000	มิลลิกรัม

pH 7.0 ± 0.2

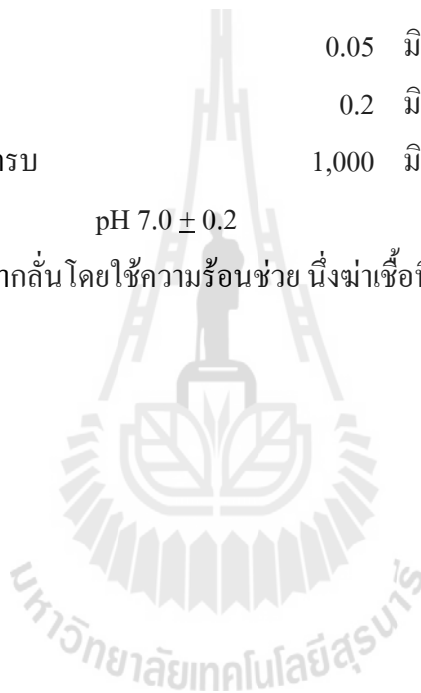
ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อนช่วย หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. JCM 169 agar

Casamino acids (Peptone 5, GIBCO หรือ Acidicase, BBL หรือ L41, Oxoid)	7.5	กรัม
Yeast extract	10.0	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
FeSO ₄ ·4H ₂ O	0.05	มิลลิกรัม
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.2	มิลลิกรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000	มิลลิกรัม

pH 7.0 ± 0.2

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อนช่วย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



ประวัติผู้วิจัย

- ชื่อ(ภาษาไทย) นาย จิรวัดณ์ นามสกุล ขงสวัสดิกุล
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Jirawat Yongsawatdigul
- 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@sut.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

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

- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
- Food proteins, Food enzymes
- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพ
ในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละ
ข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น
 - หัวหน้าโครงการวิจัย :
 - Factors affecting histamine in fish sauce fermentation
 - 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 fishball 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

- Wiriyaphan, C., Chitsomboon, B., Roytrakul, S., Yongsawatdigul, J. 2013. Isolation and identification of antioxidtive peptides from hydrolysate of threadfin bream surimi processing byproduct. J. Functional Food. In press. DOI:10.1016/j.jff201307009
- Lapsongphon, N, Cadwallader, K.R., Rodtong, S., Yongsawatdigul, J. 2013. Characterization of protein hydrolysis and odor-active compounds of fish sauce inoculated with *Virgibacillus* sp. SK37 under reduced salt content. J. Agric. Food Chem. DOI: 10.1021/jf4014923
- Lapsongphon, N. and Yongsawatdigul, J. 2013. Production and purification of antioxidant peptides from a mungbean meal hydrolysate by *Virgibacillus* sp. SK37 proteinase. Food Chem. 992-999.
- Lapsongphon, N., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. 2013. Spent Brewery Yeast Sludge as a Single Nitrogen Source for Fibrinolytic Enzyme Production of *Virgibacillus* sp. SK37. Food Science and Biotechnology. Food Sci. Biotechnol. 22(1): 71-78.
- Montriwong, A, Kaewphuak, S., Rodtong, S., Roytrakul S., Yongsawatdigul, J. 2012. Novel fibrinolytic enzymes from *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 isolated from fish sauce fermentation. Process Biochem. 47: 2379–2387

- Siriangkanakun, S. and Yongsawatdigul, J. 2012. Trypsin inhibitory activity and gel-enhancing effect of sarcoplasmic proteins from common carp. *J. Food Sci.* 77(10): 1124-1130
- Hemung, B, Benjakul, S., Yongsawatdigul, J. 2013. pH-dependent characteristics of gel-like emulsion stabilized by threadfin bream sarcoplasmic proteins. *Food Hydrocolloids* 30: 315-322.
- Sinsuwan, J. Rodtong, S., Yongsawatdigul, J. 2012. Hydrolytic activity of *Virgibacillus* sp. SK37, a starter culture of fish sauce fermentation, and its cell-bound proteinases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 28: 2651-2659.
- Yongsawatdigul, J., Pivisan, S., Wongngam, W., Benjakul, S. 2012. Gelation characteristics of mince and washed mince from small scale mud carp and common carp. *Journal Aquatic Food Product Technology.* DOI:10.1080/10498850.2012.664251.
- Wiriyapan, A., Chitsomboon, B., 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., 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., 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., Yamabhai M. 2011. A novel subtilase with NaCl-activated and oxidant-stable activity from *Virgibacillus* sp. SK37. *BMC Biotechnology*, 11:65.
- Sinsuwan, S, Rodtong, S., 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., 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., Yongsawatdigul, J. 2010. Proteinase-producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds. *International Journal of Food Microbiology* 141: 186–194.

- Tadpitchayangkoon, P., Park, J., Mayer, S., 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., 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., 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., 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 glutaminyl 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 Science and Technology.* 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., Yongsawatdigul, J. 2008. Characterization of Ca²⁺-activated cell-bound proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 isolated from fish sauce fermentation. LWT-Food Sci Tech. 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., Yongsawatdigul, J. 2008. Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. Process Biochem. 43:185-192.
- Park, J.D., Yongsawatdigul, J., Choi, Y.J., 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., Raksakulthai, N. 2007. Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter culture. J. Food Sci. 72: M382-M390.
- Panpipat, V, Yongsawatdigul, J. 2008. Stability of potassium iodide and omega-3 fatty acids in fortified freshwater fish emulsion sausage. LWT-Food Sci Tech. 41:483-492.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., 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., Sinsuwan, S. 2007. Aggregation and conformational changes of tilapia actomyosin as affected by calcium ion during setting. Food Hydrocolloids. 21: 359-367.
- Sirighan, P., Raksakulthai, N., 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., 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., 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., Yongsawatdigul, J. 2006. Autolytic activity and biochemical characteristics of endogenous proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). Food Chem. 98(4): 678-684.
- Young, K., Yongsawatdigul, J., Park, J., Thawornchinsombat, S. 2005. Characteristics of sarcoplasmic proteins and their interaction with myofibrillar proteins. 29: 517-532.
- Hemung, B. and Yongsawatdigul, J. 2005. Ca²⁺ 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., 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., 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

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุรีลักษณ์ รอดทอง
(ภาษาอังกฤษ) MISS SUREELAK RODTONG
2. ตำแหน่งวิชาการปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่สังกัดและที่อยู่
สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ 044-22 4297, 044-22 4633 โทรสาร 044-22 4185
e-mail sureelak@sut.ac.th
4. ประวัติการศึกษา

วท.บ. (ชีววิทยา เลือุกจุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ประเทศไทย
วท.ม. (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ประเทศไทย
PGDip. Sc. (Biotechnology) with Credit	University of Otago	New Zealand
Ph.D. (Microbiology)	University of Otago	New Zealand
5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญ
พันธุศาสตร์และสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ การหมักของจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและเชื้อรา)
และความหลากหลายของชนิดและการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกและเชื้อรา
6. ผลงานทางวิชาการ
 1. ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ
วารสารระดับชาติ จำนวน 17 เรื่อง และวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 37 เรื่อง
 2. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ใน Proceedings จำนวน 26 เรื่อง
 3. ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับชาติ จำนวน 86 เรื่อง
 4. ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 86 เรื่อง
 5. สิทธิบัตรที่ยื่นคำขอจดทะเบียน ณ กรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์ ประเทศไทย จำนวน 6 คำขอ