โชคชัย เชื้อหนองทอน : แบคทีเรียกรดแล็กติกและการพัฒนากลิ่นรสในน้ำปลา (LACTIC ACID BACTERIA AND THE DEVELOPMENT OF FLAVOR IN FISH SAUCE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีลักษณ์ รอดทอง, 220 หน้า.

น้ำปลาได้จากกระบวนการหมักที่มีแบคทีเรียหลายกลุ่มเกี่ยวข้องต่อผลิตภัณฑ์และกลิ่นรส จากการศึกษาแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลาระดับการค้า จำนวน 288 ไอโซเลต พบว่ามี 38 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างสารกลิ่นรสในอาหารเหลวประกอบด้วยกลูโคส สารสกัดจากยีสต์ และทริปโตน ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์และลิวซีนความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 1 ตามลำดับ เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกจำนวน 4 ไอโซเลต คือ 3MC10-11, 3MR10-3, 6MR10-7 และ PMC-11-5 จากความสามารถในการเจริญที่ความเข้มข้นเกลือสูงและไม่สร้างสารไบโอจีนิกเอมีนหรือสร้างในปริมาณต่ำ ที่เมื่อระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยลักษณะสัณฐาน สรีรวิทยา ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene และแบบแผนแถบดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Restriction fragment length polymorphism ทั้ง 4 ไอโซเลต จัดเป็นชนิด *Tetragenococcus muriaticus* ที่ต่างสายพันธุ์กัน เมื่อเตรียมการหมักน้ำปลาจากปลากะตักสดผ่านการย่อยและไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปรียบเทียบกัน ในห้องปฏิบัติการทำนองเดียวกับการหมักแบบดั้งเดิม โดยมีชุดควบคุม (ไม่เติมกล้าเชื้อ) และชุดเติมกล้าเชื้อแต่ละเชื้อแยกกันคือไอโซเลต 3MC10-11, 3MR10-3, 6MR10-7 และ PMC-11-5 ที่มีจำนวนเริ่มต้น 7 Log CFU/มิลลิลิตร ปริมาณร้อยละ 10 ปริมาตรต่อน้ำหนัก บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 วัน พบว่าชุดการหมักที่เติมกล้าเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลต จากที่มีจำนวนแบคทีเรียกรดแล็กติกในวันเริ่มต้นเท่ากันโดยเฉลี่ย 5 Log CFU/กรัม เมื่อหมักได้ 180 วัน ในตัวอย่างหมักจากปลากะตักสดผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ยังคงมีจำนวนคงที่ 5 Log CFU/กรัม แต่ในตัวอย่างหมักจากปลากะตักสดไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์พบ 3, 5, 4 และ 5 Log CFU/กรัม ตามลำดับ เป็นจำนวนที่ค่อนข้างลดลง ขณะที่ชุดควบคุมที่เตรียมจากปลากะตักสดผ่านและไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ไม่พบแบคทีเรียกรดแล็กติกและพบจำนวน 4 Log CFU/กรัม ตามลำดับ ในวันเริ่มต้นหมักของตัวอย่าง แต่ที่ 180 วันของการหมัก พบจำนวน 6 และ 3 Log CFU/กรัม ตามลำดับ และไม่พบแบคทีเรียกรดแล็กติกในทุกชุดของการทดลองเมื่อหมักถึง 240 วัน ในตัวอย่างหมักที่ 240 วัน เมื่อใช้ปลากะตักสดผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์พบว่าชุดเติมกล้าเชื้อ 4 ไอโซเลต มีปริมาณแอลฟาอะมิโน 770, 763, 839 และ 850 มิลลิโมลาร์ โอลิโกเพปไทด์ 31, 19, 22 และ 18 มิลลิโมลาร์ ไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 1.59, 1.70, 1.69 และ 1.71 ตามลำดับ และพบสารระเหยเด่น เบนซัลดีไฮด์และกรดบิวทาโนอิก (ให้กลิ่นอัลมอนด์) และกรด 3-เมธิลบิวทาโนอิก (ให้กลิ่นเนยแข็ง) ขณะที่ชุดควบคุมมีปริมาณแอลฟาอะมิโน 763 มิลลิโมลาร์ โอลิโกเพปไทด์ 21 มิลลิโมลาร์

ไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 1.63 และพบสารระเหยเด่น ไดเมทิล ไตรซัลไฟด์ซึ่งเป็นสาเหตุของกลิ่นอุจจาระ สำหรับตัวอย่างหมักจากปลากะตักสดไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่หมักได้ 240 วัน พบว่าชุดเติมกล้าเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลต มีปริมาณแอลฟาอะมิโน 810, 821, 852 และ 958 มิลลิโมลาร์ โอลิโกเพปไทด์ 20, 21, 17 และ 16 มิลลิโมลาร์ ไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 1.58, 1.65, 1.62 และ 1.68 ตามลำดับ และพบสารระเหยเด่น เบนซัลดีไฮด์และกรดบิวทาโนอิก และกรด 3-เมธิลบิวทาโนอิก แบคทีเรียสายพันธุ์ PMC-11-5 มีความสามารถในการสร้างสารระเหยที่ให้กลิ่นดีที่สุด ขณะที่ชุดควบคุมมีปริมาณแอลฟาอะมิโน 808 มิลลิโมลาร์ โอลิโกเพปไทด์ 17 มิลลิโมลาร์ ไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 1.62 และพบสารระเหยเด่น ไดเมทิล ไตรซัลไฟด์ ซึ่งเป็นสาเหตุของกลิ่นอุจจาระในปริมาณสูงกว่าตัวอย่างที่เติมกล้าเชื้อทุกตัวอย่าง จากนั้นได้ศึกษาจีโนมฉบับร่างของกล้าเชื้อที่ใช้ทดลองหมักน้ำปลาแล้วได้กลิ่นรสดี 2 สายพันธุ์ คือ 3MR10-3 และ PMC-11-5 ที่ได้ผลจีโนมขนาด 2.0 และ 2.1 เมกะเบส ประกอบด้วยลำดับรหัสพันธุกรรมของโปรตีน 2,252 และ 2,626 ชนิด ตามลำดับ แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์มีจีนควบคุมไอออนอนินทรีย์ (โพเทสเซียมและโซเดียม) และสารควบคุมความดันออสโมติกสำหรับการปรับตัวในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือสูง และจีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดกลิ่นรสคือ *adh* และ *aldh* การศึกษาครั้งนี้ยังได้ตรวจจับแบคทีเรียในน้ำปลาไทยระดับการค้าระหว่างการหมักช่วง 1-12 เดือน ด้วยวิธี Automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) โดยสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียโดยตรงจากตัวอย่างหมัก ซึ่งพบแอมพลิคอนทั้งสิ้น 232 ขนาด แต่ละขนาดเทียบได้กับแบคทีเรีย 1 สายพันธุ์ ผลของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ได้ลำดับเบสสายสั้น (Read) จำนวน 1,864,163 reads ซึ่งอยู่ในช่วง 23,642 ถึง 87,579 ในแต่ละตัวอย่างน้ำปลา และตรวจพบแบคทีเรียในสกุล *Tetragenococcus* ตลอดกระบวนการหมัก 12 เดือน จากผลการศึกษานี้แสดงถึงแนวโน้มในการใช้ประโยชน์แบคทีเรีย *Tetragenococcus muriaticus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ (3MR10-3 และ PMC-11-5) เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมักเพื่อให้กลิ่นรสที่ดีในน้ำปลา

สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

CHOKCHAI CHUEA-NONGTHON : LACTIC ACID BACTERIA AND THE DEVELOPMENT OF FLAVOR IN FISH SAUCE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUREELAK RODTONG, Ph.D. 220 PP.

FISH SAUCE/VOLATILE COMPOUNDS/*TETRAGENOCOCCUS MURIATICUS*/ /DRAFT GENOME SEQUENCES/ARISA/BACTERIAL COMMUNITY

Fish sauce is produced from fish fermentation process involving with several bacterial groups developing unique flavor of the product. Thirty eight out of 288 lactic acid bacterial isolates obtained from commercial-scale fish sauce fermentation, were selected after screening their flavor compound production capability in glucose yeast extract tryptone medium containing sodium chloride and L-leucine. Four isolates, 3MC10-11, 3MR10-3, 6MR10-7, and PMC-11-5, growing well at high salt concentration and lacking in producing biogenic amines, were chosen as starter cultures for investigating flavor development during fish sauce fermentation. These isolates were identified as belonging to different strains of *Tetragenococcus muriaticus* according to their morphological and physiological characteristics, 16S rRNA gene sequences, and restriction fragment length polymorphism patterns. The fermentation of fish sauce was performed in laboratory scale using fresh anchovy compared to proteinase-digested anchovy, without (control) and with inoculating 10% (v/w, approximately 7 Log CFU/ml) of the selected starter cultures at 35°C for 240 days. Lactic acid bacterial counts were rather constant in all inoculated samples and control (using fresh anchovy) at approximately 3-5 Log CFU/g during 180 day fermentation. At 240 day fermentation of both proteinase-digested and fresh anchovy batches, none of lactic acid bacteria was detected in all samples. The inoculated samples contained the average α-amino at concentrations of 770 and 810, 763 and

821, 839 and 852, and 850 and 958 mM; oligopeptides of 31 and 20, 19 and 21, 22 and 17, and 18 and 16 mM; and total nitrogen of 1.59 and 1.58, 1.70 and 1.65, 1.69 and 1.62, and 1.71 and 1.68%, respectively, whereas controls contained α-amino (763 and 808 mM), oligopeptides (21 and 17 mM), and total nitrogen (1.63 and 1.62%, respectively). Major volatile compounds found in all inoculated samples were benzaldehyde, and butanoic and 3-methylbutanoic acids, contributing to almond and cheesy notes respectively. PMC-11-5 performed the highest volatile compound amounts. Sulfur-containing compounds contributing to fecal note, were easily detected in all control samples. Strains 3MR10-3 and PMC-11-5 were then chosen for draft genome analysis, and the genome sizes of 2.0 and 2.1 Mbp consisting of 2,252 and 2,626 protein coding sequences, respectively, were achieved. These strains contained genes for regulation of inorganic ions (potassium and sodium) and osmoprotectants for adaptation to high saline environments, and genes *adh* and *aldh* involving flavor formation. Bacterial communities in commercial fish sauce samples at 1-12 month fermentation were detected using the automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA). A total of 232 amplicon lengths (ALs) representing 232 bacterial species, were detected. 16S rRNA gene sequences showed 1,864,163 reads in the range of 23,642 to 87,579 per sample. *Tetragenococcus* was found throughout 12 month fermentation. Results from this study reveal the potential application of the selected strains as starter cultures for development of desirable flavor in fish sauce.

School of Microbiology

Academic Year 2013

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____