

นัทธีวรรณ อุคมศิลป์ : บทบาทของแบคทีเรียกรดแล็กติกต่อองค์ประกอบทางเคมีของ
น้ำปลา (ROLE OF LACTIC ACID BACTERIA ON CHEMICAL COMPOSITIONS OF
FISH SAUCE) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. จิรวัดน์ ยงสวัสดิ์กุล, 141 หน้า.

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาบทบาทของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ชอบเจริญในที่
เค็มที่คัดแยกจากกระบวนการหมักน้ำปลาต่อการเกิดกลิ่นรสและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำปลา
จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากบ่อหมักน้ำปลา ช่วงเดือนที่ 1-12 จำนวน 64 ไอโซเลท
คัดเลือกได้ 18 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการเจริญในอาหารเหลวที่เตรียมจากสารสกัดจากปลา
กะตัก (Fish broth) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 25% (FB25) และสามารถย่อยสลายโปรตีนปลา
จากนั้นได้คัดเลือกต่อ ได้แบคทีเรียจำนวน 7 ไอโซเลท คือ M11 MS33 MRC10-1-3 MRC5-5-2
MCD10-5-10 MCD10-5-15 และ MRC10-7-8 จากความสามารถในการเจริญในอาหารเหลว MRS
ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร่วมกับความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนปลา เมื่อศึกษากิจกรรม
ของเอนไซม์อะมิโนเปปติเดสภายในเซลล์ (Intracellular aminopeptidase) พบว่าแบคทีเรียทั้ง 7
ไอโซเลทแสดงกิจกรรมสูงต่อสารตั้งต้นอะลานีน (Alanine) (2.85-3.67 หน่วย/มิลลิลิตร) และยัง
พบว่ามีกิจกรรมปานกลางต่อสารตั้งต้นเมทไธโอนีน (Methionine) ลิวซีน (Leucine) อาร์จินีน
(Arginine) และกลูตามิก (Glutamic) แบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลทสร้างฮีสตามีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ
เหลว mGYP ที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5% และ 25% ในระดับ 6.62-22.55 และ
13.14-20.39 มิลลิกรัม/100มิลลิลิตร ตามลำดับ สารระเหยเด่นที่พบใน FB25 ที่เติมแบคทีเรียกรด
แล็กติกทั้ง 7 ไอโซเลท คือสารระเหย 1-โพรพานอล (1-Propanol) 2-เมททิลโพรพาแนล (2-
Methylpropanal) และ เบนซัลดีไฮด์ (Benzaldehyde) เมื่อระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่
คัดเลือกได้โดยอาศัยลักษณะพื้นฐานวิทยาและสรีรวิทยาพบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่าง
เซลล์กลม มีการจัดเรียงตัวทั้งเป็นคู่ (Pairs) และแบบสี่เซลล์ (Tetrads) ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลี
โอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรีย 7 ไอโซเลท มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ
Tetragenococcus halophilus ATCC 33315 ในระดับ 99% และแบบแผนของนิวคลีโอไทด์ที่
วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ของทั้ง 7 ไอโซเลท มี
ความเหมือนเช่นเดียวกับ *T. halophilus* ATCC 33315 จึงระบุได้ว่าเป็น *T. halophilus* เมื่อศึกษา
ลักษณะทางสรีรวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลท พบว่ามีความแตกต่างกัน
และแตกต่างจากแบคทีเรียคู่เทียบ *T. halophilus* ATCC 33315

เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก 4 ไอโซเลท คือ *T. halophilus* MS33 *T. halophilus* MRC10-1-3 *T. halophilus* MCD10-5-10 และ *T. halophilus* MRC10-7-8 ในอาหาร FB25 โดยมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น 10^6 CFU/มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการหมักน้ำปลา พบว่าจำนวนแบคทีเรียกรดแล็กติกลดลงจากวันเริ่มต้นประมาณ 3-4 Log CFU/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 60 วัน และไม่พบแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เวลาการหมักมากกว่า 90 วัน ตัวอย่างที่เติมแบคทีเรียกรดแล็กติกหมักเป็นระยะเวลา 6 เดือนมีปริมาณแอลฟาอะมิโน 780-784 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างควบคุม ($P < 0.05$) ตัวอย่างที่เติม *T. halophilus* MRC10-1-3 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 มีปริมาณฮีสตามีนต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม ($P < 0.05$) คุณลักษณะทางเคมีกายภาพของน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อเทียบเท่ากับน้ำปลาที่หมักด้วยวิธีแบบดั้งเดิม และน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อมีปริมาณของกรดอะมิโน อีสระ โพรลีน (Proline) อะลานีน (Alanine) วาลีน (Valine) และไลซีน (Lysine) เพิ่มขึ้น และน้ำปลาที่เติม *T. halophilus* MS33 มีปริมาณกลูตามิก (Glutamic) ทั้งหมดสูงสุด ($P < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์สารระเหยในตัวอย่างน้ำปลาพบว่าสารระเหยเด่นที่พบคือ 2-เมทิล โพรพาแนล (2-Methylpropanal) 2-เมทิลบิวทาแนล (2-Methylbutanal) 3-เมทิลบิวทาแนล (3-Methylbutanal) และเบนซัลดีไฮด์ (Benzaldehyde) และไม่พบสารระเหยในกลุ่ม ไคซัล ไฟด์ ซึ่งเป็นสาเหตุของกลิ่นอุจจาระ (Fecal note) ในตัวอย่างการหมักน้ำปลาที่เติม *T. halophilus* MCD10-5-10 จากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำปลาที่เติมแบคทีเรียกรดแล็กติกพบว่า การยอมรับโดยรวม (Overall acceptance) ไม่มีความแตกต่างจากน้ำปลาทางการค้าที่หมัก 12 เดือน ดังนั้นการใช้แบคทีเรียกรดแล็กติกในการหมักน้ำปลาสามารถปรับปรุงลักษณะทางเคมีและองค์ประกอบสารให้กลิ่นของน้ำปลาได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

NATTEEWAN UDOMSIL : ROLE OF LACTIC ACID BACTERIA ON
CHEMICAL COMPOSITIONS OF FISH SAUCE. THESIS ADVISOR :
ASSOC. PROF. JIRAWAT YONGSAWATDIGUL, Ph.D., 141 PP.

FISH SAUCE/VOLATILE COMPOUNDS/*TETRAGENOCOCCUS HALOPHILUS*/
/INTRACELLULAR AMINOPEPTIDASE/BIOGENIC AMINES

The objectives of this study were to investigate the role of halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation on flavor formation and chemical composition of fish sauce. Lactic acid bacteria (LAB) were isolated from fish sauce mash fermented at various times ranging from 1 to 12 months. Sixty-four isolates were obtained and 18 of them were selected, based on the ability to grow in fish broth containing 25% NaCl (FB25) and to hydrolyze fish protein. Subsequently, seven isolates were chosen, namely M11, MS33, MRC10-1-3, MRC5-5-2, MCD10-5-10, MCD10-5-15, and MRC10-7-8, based on the growth in MRS containing NaCl and the ability to hydrolyze fish protein. Intracellular aminopeptidase activities of 7 isolates were high toward Ala-*p*-nitroanilide (Ala-*p*NA) (2.85-3.67 U/ml of crude enzyme) and moderate activity toward Met-*p*NA, Leu-*p*NA, Arg-*p*NA and Glu-*p*NA. They produced histamine in mGYF broth containing 5 and 25% NaCl ranging from 6.62-22.55 and 13.14-20.39 mg/100ml, respectively. Predominant volatile compounds of FB25 added LAB 7 isolates were 1-propanol, 2-methylpropanal, and benzaldehyde. Bacterial identification which was based on morphological and physiological characteristics revealed that these isolates were Gram-positive cocci with pairs/tetrads. The result of 16S rRNA gene sequences showed homology to

Tetragenococcus halophilus ATCC 33315 at 99%. The restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns of all isolates were also similar to *T. halophilus* ATCC 33315. Thus, these isolates were identified as *T. halophilus*. Physiological and biochemical characteristics were varied among isolates and differed from *T. halophilus* ATCC 33315.

Four treatments of fish sauce fermentation were prepared by adding *T. halophilus* MS33, *T. halophilus* MRC10-1-3, *T. halophilus* MCD10-5-10 and *T. halophilus* MRC10-7-8 cultured in FB25 with approximate cell count of 10^6 CFU/ml. LAB counts of inoculated samples decreased 3-4 Log CFU/ml at 60 days of fermentation and were not detected after 90 days. α -Amino content of 6-mo-old fish sauce samples were 780-784 mM and higher than the control ($P < 0.05$). Addition of *T. halophilus* MRC10-1-3 and *T. halophilus* MCD10-5-10 resulted in lower histamine content than the control ($P < 0.05$). Physico-chemical characteristics of fish sauce added starter cultures were comparable to those of fish sauce fermented conventionally. Fish sauce inoculated with starter cultures showed an increase in free proline, alanine, valine, and lysine. Fish sauce inoculated *T. halophilus* MS33 showed the highest total glutamic acid content ($P < 0.05$). The major volatile compounds identified in the fish sauce inoculated with LAB starter culture were 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal and benzaldehyde. Dimethyl disulfide, a compound attributing to fecal note, was not detected in the sample added *T. halophilus* MCD10-5-10. Overall acceptance based on sensory evaluation of all fish sauce samples inoculated with starter cultures was comparable to the commercial fish sauce fermented for 12 months. The use of LAB

for fish sauce fermentation appeared to improve chemical characteristics and volatile composition of a fish sauce product.

School of Food Technology

Academic Year 2008

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____