บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างเดือนแรกของการหมักน้ำปลามีความสามารถในการย่อยสลายปลากะตักและเคซีน (Casein) ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10 และ 25 จึงอาจเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพเป็นกล้าเชื้อสำหรับกระบวนการหมักน้ำปลา ซึ่งแนวทางดังกล่าวจะนำไปสู่การพัฒนากระบวนการลดระยะเวลาการหมัก ดังนั้นวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้เพื่อศึกษาแนวทางการผลิตโปรติเนสที่หลั่งออกมานอกเซลล์ (Extracellular proteinase) ของ *Virgibacillus* sp. SK37 โดยใช้ผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหารเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเนส และศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ตรึงอยู่กับเซลล์ (Cell-bound proteinase) ในการหมักน้ำปลา

ผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหารทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ กากถั่วเหลือง รำข้าว โปรตีนถั่วเขียว กากยีสต์ และกากน้ำปลา พบว่ากากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการสร้างโปรติเนสที่หลั่งออกนอกเซลล์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 โดยการใช้กากยีสต์ 1% ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.5% ที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยให้ค่ากิจกรรมสูงกว่าการใช้ยีสต์สกัดทางการค้า (Commercial yeast extract) 1.7 เท่า โปรติเนสที่ตรึงอยู่ที่เซลล์ที่ผลิตจาก *Virgibacillus* sp. SK37 ถูกสกัดโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทริส-มาลิเอต (Tris-maleate) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ผสมสารละลายกรดเอธิลีนไดเอมีนเททราอะซิติก (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ไซโมแกรม (Zymogram) ของโปรติเนสที่ตรึงอยู่ที่เซลล์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 โดยใช้ เพปไทด์สังเคราะห์เป็นสารตั้งต้นแสดงโมเลกุลขนาด 19 20 22 32 34 และ 44 กิโลดาลตัน โปรติเนสนี้แสดงลักษณะของเอนไซม์สับทิลิซิน (Subtilisin) โดยแสดงกิจกรรมสูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 8 และ 11 กิจกรรมของโปรติเนสที่สกัดได้เพิ่มขึ้น 4 เท่า ที่ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์มากกว่าหรือเท่ากับ 100 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้แคลเซียมคลอไรด์ยังเพิ่มความคงทนต่ออุณหภูมิของโปรติเนสด้วย เอนไซม์แสดงกิจกรรมการย่อยสลายกล้ามเนื้อปลา โปรตีนถั่วเหลืองสกัด และเคซีนทั้งในสภาวะที่ไม่มีและมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 10 และ 25% การเติมแคลเซียมคลอไรด์ในระดับ 0.2% ร่วมกับเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 ในกระบวนการหมักน้ำปลา พบว่ามีการย่อยสลายโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) เมื่อวิเคราะห์จากปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน บ่งชี้ได้ว่า โปรติเนสที่ตรึงอยู่กับเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 อาจเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายโปรตีนปลาในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา

การศึกษาผลของโปรติเนสที่ตรึงอยู่ที่เซลล์จาก *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% หลังจากหมักเป็นเวลา 180 วัน ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนของทุกตัวอย่างมีค่า 1046-1162 มิลลิโมลาร์ โดยการลดปริมาณเกลือแต่เพียงอย่างเดียวและการลดปริมาณเกลือร่วมกับการเพิ่มพีเอชเริ่มต้นของกระบวนการหมักมีผลเพิ่มปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนเมื่อเทียบกับการหมักด้วยเกลือ 30% ($P<0.05$) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของทุกตัวอย่างมีค่า 2.2-2.7% การลดเกลือแต่เพียงอย่างเดียวไม่มีผลต่อปริมาณ ไบโอจินิกเอมีนของผลิตภัณฑ์แต่การลดเกลือร่วมกับการเพิ่มพีเอชของกระบวนการหมักเป็น 6.8 ส่งผลให้ปริมาณฮีสตามีนและคาดาเวอรีนเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) การหมักน้ำปลาโดยการลดเกลือร่วมกับปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.8 ส่งผลให้เกิดสารระเหยในปริมาณที่สูงโดยเฉพาะไดเมธิลไดซัลไฟด์ (Dimethyl disulfide) ซึ่งเป็นสาเหตุของกลิ่นอุจจาระ (Fecal note) ในขณะที่การหมักที่ลดเกลือลง 15% แต่เพียงอย่างเดียว ส่งผลให้ได้น้ำปลาที่มีชนิดและปริมาณสารระเหยใกล้เคียงกับการหมักแบบดั้งเดิมที่มีสัดส่วนของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 30% ($P<0.05$)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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 comjuction 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 ($P<0.05$).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี