รายงานวิจัย

เรื่อง

ความสามารถผลิตสารระเหยให้กลิ่นในสภาวะแวดล้อมหลากหลายของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37

Capability to Produce Volatile Compounds in Various Environmental Conditions of Halotolerant Bacterial Strain, *Virgibacillus* sp. SK37

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรชัย สินสุวรรณ

สาขาวิชามนุษยนิเวศศาสตร์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช

ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร.สุรีลักษณ์ รอดทอง

สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนรัตนโกสินทร์สมโภช 200 ปี

ประจำปี พ.ศ. 2558

มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช

ชื่อเรื่อง : ความสามารถผลิตสารระเหยให้กลิ่นในสภาวะแวดล้อมหลากหลายของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37

ชื่อผู้วิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรชัย สินสุวรรณ และผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร.สุรีลักษณ์ รอดทอง
ปีที่แล้วเสร็จ : 2560

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ต่อการสร้างสารระเหยให้กลิ่นในสภาวะความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (10-27%) สภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน อาหารเลี้ยงเชื้อที่อุดมไปด้วยโปรตีนหรือกรดอะมิโนอิสระ และปริมาณโนโตรเจนทั้งหมด (0.1-2%) การศึกษาทำโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากปลากะตักแห้งหรือปลากะตักแห้งที่ผ่านการย่อยด้วยกรด จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตเริ่มต้นประมาณ 6 logCFU/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ การระบุชนิดของสารระเหยให้กลิ่นที่สร้างโดย *Virgibacillus* sp. SK37 ใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟฟี-แทนเดมแมสสเปกโตรเมตรี

ความสามารถในการสร้างสารระเหยให้กลิ่นของ *Virgibacillus* sp. SK37 ขึ้นกับสภาวะแวดล้อมซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเจริญของแบคทีเรีย ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการสร้างสารระเหยให้กลิ่นของแบคทีเรียเกิดขึ้นได้น้อยในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ปริมาณสาร 3-methyl-butanol, 2-methyl-butanoic acid, 3-(methylthio)-1-propanol และ phenylethyl alcohol เพิ่มขึ้นเมื่อ *Virgibacillus* sp. SK37 เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุดมไปด้วยกรดอะมิโนอิสระ นอกจากนั้นยังพบว่าสาร dimethyl disulfide, 3-methyl-1-butanol, pyrazines, 3-mehyl-butanoic acid, 3-(methylthio)-1-propanol และ phenylethyl alcohol มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า *Virgibacillus* sp. SK37 ที่เจริญในความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่ำ (10-15%) สภาวะที่มีออกซิเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุดมไปด้วยโปรตีนหรือกรดอะมิโนอิสระ และปริมาณโนโตรเจนทั้งหมดในช่วงกว้าง (0.1-2%) สามารถสร้างสารระเหยให้กลิ่นได้หลากหลายชนิด ซึ่งบางชนิดจัดเป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นที่สำคัญต่อคุณลักษณะด้านกลิ่นรสของน้ำปลาทางการค้า จึงอาจกล่าวได้ว่าการใช้ *Virgibacillus* sp. SK37 เป็นกล้าเชื้อในการหมักน้ำปลาอาจปรับปรุงคุณภาพด้านกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์น้ำปลาได้

คำสำคัญ : *Virgibaciillus* sp. SK37 แบคทีเรียทนเค็ม สารระเหยให้กลิ่น น้ำปลา

Title : Capability to Produce Volatile Compounds in Various Environmental Conditions of Halotolerant Bacterial Strain, *Virgibacillus* sp. SK37

Researchers : Assistant Professor Dr. Sornchai Sinsuwan and Assistant Professor Dr. Sureelak Rodtong

Year : 2017

Abstract

The effect of halotoerant bacterium, *Virgibacillus* sp. SK37, for flavor compound formation in different NaCl concentrations (10-27%), aerobic and anaerobic conditions, protein- or free amino acid-rich media, and total nitrogen content (0.1-2%) was elucidated. The halotolerant bacterial strain was inoculated with an approximate viable counts of 6 logCFU/ml in media prepared from either dried anchovy or acid-hydrolyzed dried anchovy. Volatile flavor compounds produced by the stain were identified by using gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS)

The ability to produce volatile flavor compounds of *Virgibacillus* sp. SK37 depended upon environmental conditions in relation to its growth. This result revealed that the formation of volatile flavor compounds by the bacterium was limited under anaerobic condition. 3-Methyl-butanol, 2-methyl-butanoic acid, 3-(methylthio)-1-propanol and phenylethyl alcohol were increasingly formed when the strain grew in free amino acid-rich medium. In addition, dimethyl disulfide, 3-methyl-1-butanol, pyrazines, 3-mehyl-butanoic acid, 3-(methylthio)-1-propanol, and phenylethyl alcohol were produced concurrently with increasing total nitrogen content in dried anchovy medium. *Virgibacillus* sp. SK37, grown in low NaCl concentration (10-15%), aerobic condition, either protein- or free amino acid-rich media, and a wide range in total nitrogen concentration (0.1-2%) was able to produce volatile flavor compounds. Some of the compounds were reported to be odor-active compounds in commercial fish sauces, implying that the use of the strain as a starter culture in fish sauce fermentation could improve the flavor of the fish sauce product.

Keywords : *Virgibaciillus* sp. SK37, halotolerant bacterium, volatile flavor compounds, fish sauce

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ที่สนับสนุนงบประมาณอุดหนุนการวิจัย กองทุนรัตนโกสินทร์สมโภช 200 ปี ประจำปีงบประมาณ 2558 ทำให้งานวิจัยนี้ได้ดำเนินงานเสร็จสิ้นตามวัตถุประสงค์ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้คำปรึกษาที่มีคุณค่าสำหรับการดำเนินงานวิจัย งานวิจัยนี้ไม่อาจสำเร็จได้หากปราศจากความอนุเคราะห์จากท่านอาจารย์ ขอขอบพระคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้อนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์สำหรับดำเนินการวิจัยนี้ ขอขอบพระคุณสาขาวิชามนุษยนิเวศศาสตร์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ที่สนับสนุนการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดียิ่ง และสุดท้ายขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยและนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยครั้งนี้

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	1
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	2
กิตติกรรมประกาศ	3
สารบัญ	4
สารบัญภาพ	5
สารบัญตาราง	6
บทที่ 1 บทนำ	8
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	13
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	33
บทที่ 4 ผลการวิจัย	37
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	49
บรรณานุกรม	63

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	การย่อยสลายเปปไทด์โดยโปรติเนสและเปปทิเดสจาก *Lactococcus*.....	16
2.2	การย่อยสลายเปปไทด์โดยโปรติเนสและเปปทิเดสในผลิตภัณฑ์นมหมักและวิถีการสร้างสารระเหยให้กลิ่นที่สำคัญ.....	17
2.3	วิถีทั่วไปของแคทาบอลิซึมของกรดอะมิโน.....	18
2.4	ปฏิกิริยาสเทรคเกอร์และตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาสเทรคเกอร์.....	20
2.5	ปฏิกิริยาการเปลี่ยน methionine เป็นสารประกอบซัลเฟอร์.....	22
2.6	วิถีเมทาบอลิซึมของ tryptophan, phenylalanine, tyrosine.....	23
2.7	ปฏิกิริยาการสลาย leucine และปฏิกิริยา non-enzymatic reaction.....	25
3.1	การดำเนินการวิจัย.....	33

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สารระเหยให้กลิ่นในชีส.....	14
2.2	สารระเหยให้กลิ่นที่ได้จากการเปลี่ยนจากกรดอะมิโนผ่านอัลฟา-กรดคีโตในกระบวนการทรานอะมิเนชัน.....	20
2.3	สารระเหยให้กลิ่นในน้ำปลา.....	28
4.1	ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในปลากะตักแห้ง.....	37
4.2	ผลของความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่สภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่า pH และการสร้างโปรติเนสของแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ anchovy medium (AM) และ fish acid hydrolysate medium (FH) ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเข้มข้นร้อยละ 0.1 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส.....	41
4.3	ผลของปริมาณไนโตเจนทั้งหมดต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่า pH และการสร้างโปรติเนสของแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ anchovy medium (AM) ที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 10 และ 25 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน.....	42
4.4	ชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของสารระเหยให้กลิ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ anchovy medium (AM) ที่มีแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 เจริญที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (10-27%) ที่สภาวะมีและไม่มีออกซิเจน ณ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเข้มข้นร้อยละ 0.1 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส, pH 7.....	43
4.5	ชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของสารระเหยให้กลิ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ fish acid hydrolysate medium (FH) มีแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 เจริญที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (10-27%) ที่สภาวะมีและไม่มีออกซิเจน ณ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเข้มข้นร้อยละ 0.1 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส, pH 7.....	45

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.6 ชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของสารระเหยให้กลิ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ anchovy medium (AM) ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเข้มข้นร้อยละ 1 และ 2 และมีแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 เจริญที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (10 และ 25%) ที่สภาวะที่มีออกซิเจน บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส, pH 7..... 47

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

น้ำปลาเป็นเครื่องปรุงที่นิยมไม่เฉพาะในประเทศไทย ยังรวมถึงประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ น้ำปลาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักได้จากการผสมคลุกเคล้าปลากะตัก (*Stolephorus* sp.) ทั้งตัวกับเกลือสมุทร อัตราส่วน 3 ต่อ 1 และหมักในถังซีเมนต์ที่ลึกต่ำกว่าผิวดินประมาณ 1 เมตร เป็นเวลา 12-18 เดือน ส่วนใสสีน้ำตาล-แดงเหลืองที่ได้หลังจากการกรองเพื่อกำจัดกากปลาแล้วคือ น้ำปลา (Yongsawatdigul, Rodtong, & Raksakulthai, 2007) การผลิตน้ำปลานับเป็นอุตสาหรกรรมการผลิตอาหารหนึ่งของประเทศไทยที่มีมูลค่าสูงทั้งเพื่อการจำหน่ายในประเทศและส่งออกไปต่างประเทศ ในแต่ละวันคนไทยบริโภคน้ำปลาโดยเฉลี่ยคนละ 17-20 มิลลิลิตร (นิทยา บุญทิม, 2003) ข้อมูลในปี 2555 พบว่าการผลิตน้ำปลาภายในประเทศมีมูลค่ารวมประมาณ 6,000 ล้านบาท (บังอร บุญชู และ ยุทธภูมิ สัมพันธารักษ์, 2555) และส่งออกไปยังต่างประเทศมากกว่า 60 ประเทศ โดยเฉพาะประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าในช่วงเดือน มกราคม-สิงหาคม พ.ศ. 2556 นำเข้าน้ำปลาจากประเทศไทยคิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 79 เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งนำเข้าจากประเทศอื่น (ไทยรัฐออนไลน์, 2556) ประเทศไทยจัดเป็นประเทศผู้ผลิตน้ำปลาส่งออกอันดับหนึ่งของโลก ในปี 2554 พบว่ามูลค่าการส่งออกโดยประมาณ 1,000 ล้านบาท (ผู้จัดการออนไลน์, 2554) แม้ว่าในปัจจุบันประเทศไทยยังคงเป็นผู้นำการส่งออกน้ำปลาของโลกแต่ประเทศคู่แข่งที่สำคัญ เช่น ประเทศเวียดนาม และฟิลิปปินส์ ได้มีการพัฒนาคุณภาพสินค้าและพยายามแย่งตลาดการส่งออกจากประเทศไทย ในด้านหนึ่งสำนักงานส่งเสริมการส่งออกระหว่างประเทศ กระทรวงพานิชย์พยายามส่งเสริมให้ผู้ผลิตขยายตลาดและส่งเสริมการตลาดให้น้ำปลาจากประเทศไทยเป็นที่รู้จักแพร่หลาย (ไทยรัฐออนไลน์, 2556) อีกด้านที่สำคัญคือการพัฒนากระบวนการผลิตน้ำปลาให้ทันสมัย ลดต้นทุน และคงเอกลักษณ์ของน้ำปลาไทย โดยใช้องค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์อาหารและเทคโนโลยีชีวภาพซึ่งในปัจจุบันคงมีอยู่อย่างจำกัด

จุลินทรีย์ที่พบระหว่างการหมักน้ำปลามีบทบาทสำคัญ 2 ประการคือ (1) ย่อยสลายโปรตีนปลาให้เป็นโอลิโกเปปไทด์ (oligopeptides) หรือกรดอะมิโนอิสระ (free amino acids) และ (2) สร้างสารประกอบที่ให้กลิ่นรส (flavor compounds) การใช้จุลินทรีย์ในการหมักน้ำปลาเป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนากระบวนการหมักน้ำปลาให้เป็นระบบมากขึ้น ได้คุณภาพผลิตภัณฑ์น้ำปลาคงที่ระหว่างรุ่นการผลิต ลดระยะเวลาการหมัก และลดต้นทุนการผลิตได้ ปัจจัยคุณภาพที่สำคัญหนึ่งในการผลิตน้ำปลาคือ

กลิ่นที่เป็นคุณลักษณะเฉพาะ โดยทั่วไปสารระเหยให้กลิ่นที่สำคัญในอาหารหมักส่วนใหญ่เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาล และการสลายของกรดอะมิโน เช่น leucine และ methionine และบางส่วนจากการสลายของไขมัน (Yvon & Rijnen, 2001) ปฏิกิริยาการสร้างสารระเหยให้กลิ่นของแบคทีเรียจากกรดอะมิโนประกอบด้วย 2 ปฏิกิริยาหลัก คือ ปฏิกิริยาการกำจัด (elimination reaction) และปฏิกิริยาทรานอะมิเนชัน (transamination) ที่มีเอนไซม์หลายชนิดที่จำเพาะต่อปฏิกิริยาทำงานร่วมกัน และพบได้แตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ จึงทำให้ความสามารถสร้างสารระเหยให้กลิ่นขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย (Smit, Verheul, van Kranenburg, Ayad, Siezen, & Engels, 2000) เช่น ในการบ่มสวิสชีส (Swiss cheese) แบคทีเรียโปรไบโอติก (probiotic bacteria) สายพันธุ์ *Bifidobacterium breve* สร้างสาร dimethyl trisulfide, 2-hexanone, 1-octanol, acetic acid, propionic acid, 2-methylbutanoic acid และ octanoic acid ในขณะที่ *Pediococcus acidilactici* ผลิตสาร 1-octanol, propionic acid, 2-metylbutanoic acid, heptanoic acid และ octanoic acid (Montoya, Boylson, & Mendonca, 2009)

จากงานวิจัยก่อนหน้าพบว่าแบคทีเรียทนเค็ม (halotolerant bacterium) สายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 คัดแยกได้จากการหมักน้ำปลามีความสามารถผลิตโปรติเนสที่แสดงกิจกรรมสูงภายใต้ความเข้มข้นเกลือสูงและสารระเหยให้กลิ่นได้ ตามรายงานวิจัยของ Sinsuwan, Rodtong, & Yongsawatdigul (2008) และ Lopsongphon, Rodtong, & Yongsawatdigul (2013) พบว่าสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง ได้แก่ องค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ pH ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์และอุณหภูมิ มีผลต่อการเจริญและการผลิตโปรติเนสของแบคทีเรียทนเค็มสกุล *Virgibacillus* Yongsawatdigul, Rodtong, & Raksakulthai (2007) ทดลองใช้เชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 ร่วมกับเอนไซม์โปรติเนสทางการค้า (alcalase และ flavourzyme) เร่งกระบวนการหมักน้ำปลาใช้เวลาการหมัก 4 เดือน ได้ผลิตภัณฑ์น้ำปลาที่มีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด (total amino acids) และปริมาณกรดกลูตามิคทั้งหมด (total glutamic acids) ใกล้เคียงกับปริมาณที่พบในน้ำปลาทางการค้าที่หมักเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 12 เดือน ความชอบกลิ่น (flavor preference) ของน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อต่ำกว่าน้ำปลาทางการค้าแต่คงเป็นที่ยอมรับของผู้ชิม (panelists) Lopsongphon, Cadwallader, Rodtong, & Yongsawatdigul (2013) ได้ระบุสารระเหยให้กลิ่นในน้ำปลาที่หมักด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 15-20 เป็นระยะเวลา 3 เดือน พบปริมาณสาร 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, acetic acid, และ 2-methylpropanic acid เพิ่มสูงขึ้น จะเห็นได้ว่า *Virgibacillus* sp. SK37 เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพพัฒนาใช้ในการหมักน้ำปลาได้แต่การศึกษาถึงสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงต่อการสร้างสารระเหยให้

กลิ่นยังคงไม่มีการศึกษาอย่างเป็นระบบ ซึ่งองค์ความรู้ดังกล่าวจะนำไปสู่ความเข้าใจถึงความสามารถของแบคทีเรียทนเค็มในการผลิตสารระเหยให้กลิ่นและใช้เป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่สามารถปรับปรุงคุณสมบัติของแบคทีเรียให้เหมาะสมต่อการหมักน้ำปลาได้ในอนาคต นอกจากนี้บทบาทของแบคทีเรียในการหมักน้ำปลาที่มีและไม่มีออกซิเจนยังไม่มีการศึกษามาก่อน ทั้งที่ในระบบการหมักน้ำปลามีปริมาณออกซิเจนในถังหมักไม่สม่ำเสมอกันขึ้นกับระดับความลึก โดยบริเวณผิวหน้าจะพบความเข้มข้นของออกซิเจนสูง ขณะที่ปริมาณออกซิเจนจะต่ำมากหรืออาจไม่มีเลยบริเวณล่างสุดของถังหมัก (Lopetcharat, Choi, Park & Daeschel, 2001) เป็นผลทำให้การเจริญและความสามารถในการสร้างสารระเหยให้กลิ่นของจุลินทรีย์อาจมีความแตกต่างกันได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้จึงศึกษาการสร้างสารระเหยให้กลิ่นของ *Virgibacillus* sp. SK37 ภายใต้สภาวะแวดล้อมต่างๆ

1.2 วัตถุประสงค์

ศึกษาปัจจัยของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาพแวดล้อม ได้แก่ ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน และสภาวะออกซิเจนที่มีผลต่อการเจริญ การสร้างโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์ และ ชนิดและปริมาณ (เชิงสัมพันธ์กับสารมาตรฐาน) ของสารระเหยให้กลิ่นที่ผลิตจาก *Virgibacillus* sp. SK37

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาผลของความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (10-27%) ปริมาณไนโตรเจน (0.1-2%) แหล่งไนโตรเจนที่เป็นโปรตีนและกรดอะมิโนอิสระ และสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่า pH การสร้างโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์ และระบุชนิดและปริมาณ (เชิงสัมพันธ์กับสารมาตรฐาน) ของสารระเหยให้กลิ่นที่ผลิตจาก *Virgibacillus* sp. SK37

1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย

1.5 สมมุติฐานการวิจัย

ปัจจัยสภาวะแวดล้อมมีผลต่อชนิดและปริมาณของสารระเหยให้กลิ่นที่แบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ผลิตได้

1.6 นิยามศัพท์/นิยามศัพท์เชิงปฏิบัติการ

ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ คือ ร้อยละโดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ anchovy medium (AM) และ fish acid hydrolysate (FH)

ปริมาณไนโตรเจน คือ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM และ FH ตรวจวัดได้จากวิธี Kjeldahl (AOAC Official method 955.04)

แหล่งไนโตรเจนที่เป็นโปรตีนและกรดอะมิโน คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ AM และ FH ที่เตรียมจากปลากะตักอบแห้ง และปลากะตักที่ย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก ตามลำดับ

สภาวะที่มีอากาศ คือ สภาวะที่คลายฝาเกลียวภาชนะปลอดเชื้อและบ่มในตู้เพาะเชื้อตลอดระยะเวลาการเจริญของแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37

สภาวะที่ไม่มีอากาศ คือ สภาวะที่บ่มตัวอย่างใน anaerobic jar และ anaerobic gas generator

ชนิดสารระเหยให้กลิ่น และปริมาณของสารระเหยให้กลิ่น คือ ชนิดและปริมาณสารระเหยให้กลิ่นโดยแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 ทั้งเซลล์ที่มีชีวิต (variable cells) และ/หรือส่วนประกอบจากเซลล์ที่แตกสลาย (disintegrated cells) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM และ FH ที่สามารถตรวจวัดได้โดยวิธีการตามโครงร่างงานวิจัยนี้ด้วยเครื่อง GC-MS/MS แสดงค่าของพื้นที่ใต้กราฟสัมพันธ์ (relative peak area) กับสารมาตรฐาน

จำนวนโคโลนี (เซลล์ที่มีชีวิต) คือ แบคทีเรียที่มีชีวิตตรวจนับบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

ค่า pH คือ ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ AM และ FH ตรวจวัดด้วยเครื่อง pH meter

กิจกรรมของ endoproteinase คือ กิจกรรมของ endoproteinase จากเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK37 ตรวจวัดด้วยวิธีการของ Sinsuwan, Rodtong, & Yongsawatdigul (2007) โดยใช้สารตั้งต้นสังเคราะห์ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่ใช้พัฒนาการใช้แบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 สร้างสารระเหยให้กลิ่นในการหมักน้ำปลา

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

น้ำปลา เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องปรุงรส มีลักษณะใส สีน้ำตาล-แดงเหลือง มีกลิ่นรสเฉพาะตัว และอุดมไปด้วยกรดอะมิโนอิสระ ผลิตจากการหมักปลากะตักที่ความเข้มข้นเกลือสูงประมาณ 20-30% เป็นเวลาประมาณ 12-18 เดือน โดยกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีของน้ำปลาจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ตลอดระยะเวลาการหมัก ในบทที่ 2 นี้จะกล่าวถึง (1) น้ำปลา (2) กระบวนการสร้างสารระเหยให้กลิ่นในอาหารหมัก (3) แคทาบอลิซึมของกรดอะมิโน ประกอบด้วยปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องและแคทาบอลิซึมของกรดอะมิโนที่สำคัญต่อการสร้างสารระเหยให้กลิ่น (4) สารระเหยให้กลิ่นในน้ำปลา และ (5) แบคทีเรียในการหมักน้ำปลาและสภาวะแวดล้อมต่อการสร้างสารระเหยให้กลิ่น

2.1 น้ำปลา

น้ำปลาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากปลากะตักที่ความเข้มข้นเกลือสูง ใช้เป็นสารปรุงรสอาหารที่มีความเค็มและกลิ่นรสที่มีเอกลักษณ์ กระบวนการหมักน้ำปลาเริ่มต้นจากการผสมระหว่างปลากะตัก (*Stolephourus* spp.) ประมาณ 2-3 ส่วนกับเกลือสมุทรประมาณ 1 ส่วน จากนั้นให้เกิดการหมักแบบธรรมชาติในถังหมักซีเมนต์ประมาณ 12-18 เดือน จากนั้นจึงนำของเหลวที่ได้บ่ม (ripening) ประมาณ 2-12 สัปดาห์ก่อนการบรรจุในภาชนะเพื่อจำหน่ายต่อไป ในระหว่างการหมักโปรติเนส (proteinase) จากตัวปลาและจุลินทรีย์ตามธรรมชาติย่อยสลายโปรตีนปลาให้เป็นเปปไทด์และ/หรือกรดอะมิโน (Siringan, Raksakulthai, & Yongsawatdigul, 2006) กรดอะมิโนอิสระสามารถเป็นสารอาหารสำหรับแบคทีเรียอื่น หรือสารตั้งต้นสำหรับสร้างสารระเหยให้กลิ่นได้ (Urbach, 1995) ส่วนไขมันจะถูกย่อยสลายด้วยไลเปส (lipase) จากตัวปลาหรือจุลินทรีย์ทำให้เกิดกรดไขมันอิสระที่ระเหยได้และไม่ได้ เมื่อกรดอะมิโนถูกย่อยสลายเป็นแอมโมเนียสูงขึ้นจะทำให้ค่าพีเอชเพิ่มขึ้น สีของเหลวที่ได้จากการย่อยจะค่อยๆเป็นสีน้ำตาล-แดงเหลืองเนื่องจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลเมลลาร์ด (Millard reaction) และสารระเหยให้กลิ่น เช่น กรดที่ระเหยได้ สารประกอบ aldehyde และ ketone เป็นต้น จะเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมักจนถึงเวลาหนึ่งถึงหนึ่งปีครึ่ง โดยกลิ่นรส (flavor) ในผลิตภัณฑ์น้ำปลาจัดเป็นคุณลักษณะสำคัญในการกำหนดคุณภาพและการยอมรับของผู้บริโภคน้ำปลา

2.2 กระบวนการสร้างสารระเหยให้กลิ่นในอาหารหมัก

กระบวนการสร้างกลิ่นในอาหารหมักมักเกิดขึ้นอย่างช้าๆ จากหลากหลายกระบวนการทางเคมีและชีวเคมี ผลิตภัณฑ์นมหมักเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักต้นแบบที่ใช้ในการอธิบายกระบวนการสร้างกลิ่นรส เนื่องจากมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง กระบวนการสร้างกลิ่นที่สำคัญจะเกิดการเปลี่ยนแปลงจากคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน โดยการเปลี่ยนน้ำตาลแลกโตส (ไกลโคไลซีส) เมทาบอลิซึมของซิเตรต ไขมัน (lipolysis) และโปรตีน (proteolysis) ตัวอย่างสารระเหยให้กลิ่นที่สำคัญในผลิตภัณฑ์ชีส (cheese) ดังตารางที่ 2.1 กระบวนสร้างสารระเหยให้กลิ่น เช่น การเปลี่ยนไพรูเวต (pyruvate) เป็นสาร diacetyl, acetoin, acetaldehyde หรือกรดอะซิติก (acetic acid) ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นในโยเกิร์ตหรือเนย (butter) การเปลี่ยนไขมันเป็นสาร methyl ketones, alcohols, lactones และ esters และการใช้กรดอะมิโนเป็นสารตั้งต้น (precursors) ในการสร้างสารประกอบให้กลิ่น โดยเฉพาะ methionine อะโรมาติก (aromatic) และกรดอะมิโนที่มีโครงร้างแบบกิ่ง (branched-chain amino acids) สามารถถูกเปลี่ยนเป็น alcohols, aldehydes, acids, esters และ sulphur

แม้ว่าแบคทีเรียกลุ่มสร้างแลกติก (lactic acid bacteria) จะไม่สามารถสร้างโปรติเนสได้ดี แต่ด้วยบทบาทในการผลิตผลิตภัณฑ์นมหมักจึงทำให้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางในกระบวนการเมทาบอลิซึมของกรดอะมิโนและสร้างกลิ่นรส ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 กระบวนการสำคัญ คือ การย่อยสลายโปรตีนและการดูดซึมกรดอะมิโนเข้าสู่เซลล์ การเปลี่ยนกรดอะมิโน และการควบคุม

ตารางที่ 2.1 สารระเหยให้กลิ่นในชีส

เมทาบอลิซึม	สารระเหยให้กลิ่น	
กรดอะมิโน	3-methylbutanal	isovaleric acid
	3-methylbutanol	methanethiol
	2-methylpropanol	dimethylsulphide (DMS)
	3-methylbutyate	dimethyldissulphide (DMDS)
	benzaldehyde	dimethyltrisulphide (DMTS)
	phenylacetaldehyde	skatole
	methional	
น้ำตาล	diacetyl	2,3-butanedione
	propionic acid	
ไขมัน	acetic acid	2-undecalactone

ตารางที่ 2.1 สารระเหยให้กลิ่นในชีส (ต่อ)

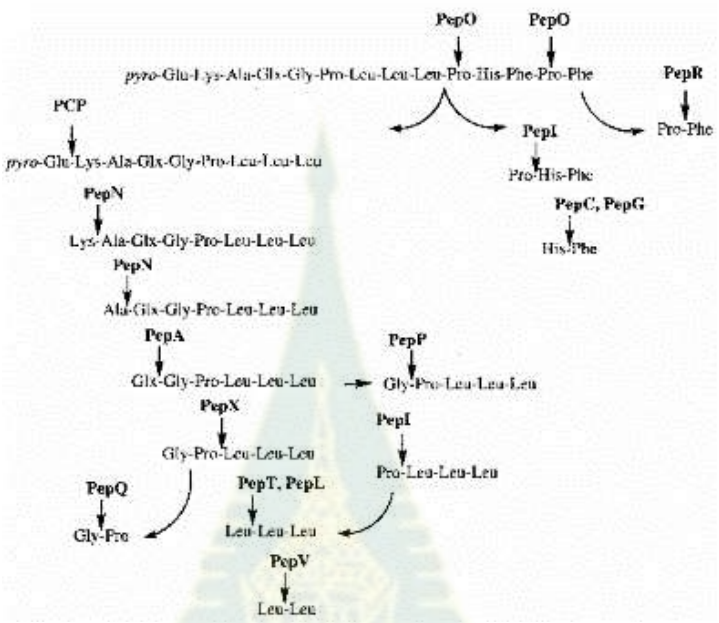
เมทาบอลิซึม	สารระเหยให้กลิ่น	
	butyric acid	γ-decalactone
	butanon	hexanal
	1-octen-3-one	pentanal
	butanone	1-octen-3-ol
สารอื่นๆ	ethyl butyrate	phenylethyl aceate
	ethyl hexanoate	limonene
	ethyl-3-methylbutanoate	

ที่มา: ดัดแปลงจาก Smit, Smit, & Engels (2005)

แบคทีเรียมีระบบการย่อยสลายโปรตีนในอาหารให้กลายเป็นเปปไทด์ จากนั้นจึงนำเปปไทด์เข้าสู่เซลล์และย่อยสลายต่อไปเป็นกรดอะมิโนเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการเปลี่ยนแปลงทางเมแทบอลิกทุติยภูมิ (secondary catabolic change) เช่น ดีอะมิเนชัน (deamination) ดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) ทรานอะมิเนชัน (transamination) ดีซัลฟูเรชัน (desulphuration) แคทาบอลิซึมของสารประกอบอะโรมาติก (เช่น phenylalanine, tyrosine และ tryptophan) และปฏิกิริยารีดักชัน

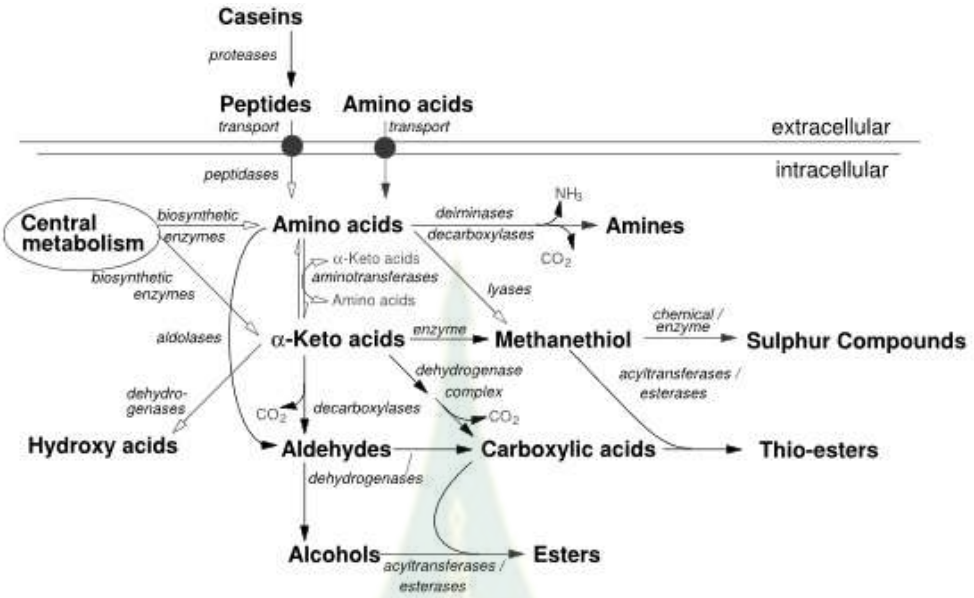
ในแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกมีโปรติเนสหลากหลายชนิด เช่น โปรติเนสที่ตรึงอยู่ที่ผนังเซลล์ (cell-wall-bound extracellular protease, Prt) และโปรติเอสหลั่งออกนอกเซลล์ (extracellular proteinase) ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนภายนอกเซลล์เป็นเปปไทด์ เมื่อนำเปปไทด์เข้าสู่เซลล์แล้วเปปทิเดสภายในเซลล์ (intracellular peptidase) ทำหน้าที่ย่อยสายเปปไทด์ให้เป็นเปปไทด์สายสั้นหรือกรดอะมิโน เช่น intracellular oligoendopeptidase (PepO และ PepF) ทำหน้าที่ย่อยสลายเปปไทด์เป็นเปปไทด์สายสั้น, general amiopeptidase (PepN, PepC และ PepG), glutamyl aminopeptidase (PepA), pyrolidone carboxyl peptidase (PCP), leucyl aminopeptidase (PepL), propyl-dipeptidyl aminopeptidase (PepX), proline iminopeptidase (PepI), aminopeptidase P (PepP), prolinase (PepR), prolindase (PepQ), general dipeptidase (PepV) และ general tripeptidase (PepT) ทำหน้าที่ย่อยสลายเปปไทด์ทางด้านปลายซี (c-terminal) ของเปป-ไทด์ได้เป็นกรดอะมิโนอิสระ ความจำเพาะต่อกรดอะมิโนบนสายเปปไทด์แสดงดังภาพที่ 2.1 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์กลุ่ม endopeptidase, aminopeptidase, di-/tri-peptidase และ proline-specific

peptidases จะเกี่ยวข้องกับการผลิตกรดอะมิโนอิสระซึ่งมีบทบาทเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสร้างกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก



ภาพที่ 2.1 การย่อยสลายเปปไทด์โดยโปรติเนสและเปปทิเดสจาก *Lactococcus*
ที่มา: McSweeney & Sousa (2000)

เมื่อกิจกรรมของ Prt และโปรติเอสหลั่งออกนอกเซลล์ดำเนินไปทำให้ได้เปปไทด์สายสั้น จากนั้นแบคทีเรียจะนำเปปไทด์เข้าสู่เซลล์โดยผ่านระบบทรานสปอร์ตเตอร์หรือระบบขนส่งสารที่ส่วนห่อหุ้มเซลล์ เช่น one/two oligopeptide transport systems (Opp, Opt) และ one/two di-/tri-peptide transporters (DtpT, DtpP) (ภาพที่ 2.2) โดยโปรตีนที่ทำหน้าที่นำกรดอะมิโนเข้าสู่เซลล์หรือทรานสปอร์ตเตอร์มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดอะมิโนตามลักษณะโครงสร้างของกรดอะมิโน เช่น Glu/Gln, Ser/Thr, Ala/Gly, Lys/Arg/Orn, branched chain (Ile/Leu/Val) และ อะโรมาติก (Phe/Tyr/Trp) เมื่อเซลล์นำเปปไทด์เข้าสู่ภายในแล้ว เปปไทด์จะถูกย่อยสลายภายในเซลล์ด้วยเปปทิเดสภายในเซลล์ ดังนั้นผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากระบวนการย่อยสลายโปรตีนโดยแบคทีเรียคือ กรดอะมิโนอิสระ

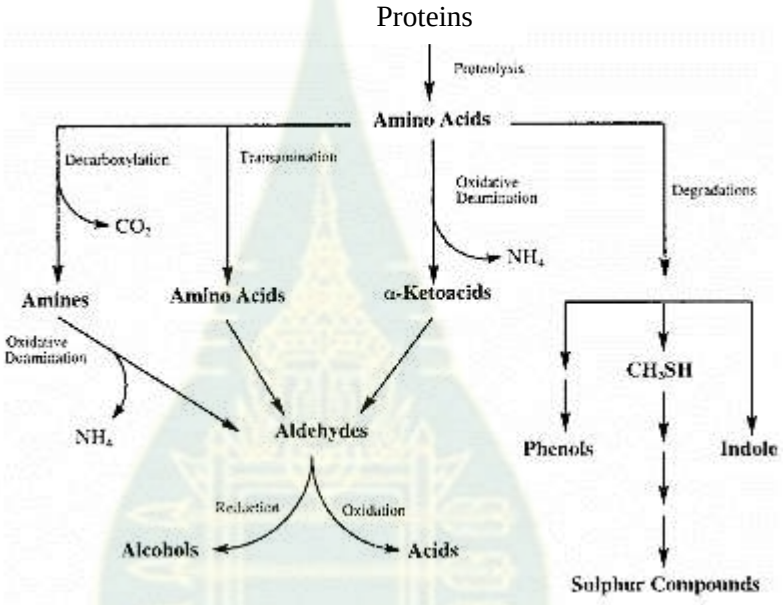


ภาพที่ 2.2 การย่อยสลายเปปไทด์โดยโปรติเนสและเปปทิเดสในผลิตภัณฑ์นมหมักและวิถีการสร้างสารระเหยให้กลิ่นที่สำคัญ
ที่มา: Smit, Smit, & Engels (2005)

นอกเหนือจากการใช้โปรตีนเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญแล้ว การย่อยสลายโปรตีนของแบคทีเรียยังเกี่ยวข้องกับการสร้างสารระเหยให้กลิ่นในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก โดยกลิ่นจะถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการทางเคมีและชีวเคมี โดยจุลินทรีย์กล้าเชื้อหรือเชื้อในธรรมชาติที่มีบทบาทในการหมักสามารถผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกลิ่นที่มีลักษณะเฉพาะในอาหาร เมื่อได้กรดอะมิโนอิสระจากกระบวนการย่อยสลายโปรตีนแล้ว แบคทีเรียสามารถเปลี่ยนกรดอะมิโนอิสระเหล่านี้เป็นผลิตภัณฑ์จากแคทาบอลิก (catabolic product) ได้ ทั้งนี้ชนิดและสัดส่วนของกรดอะมิโนแต่ละชนิดรวมถึงสายพันธุ์ของแบคทีเรียมีผลต่อคุณลักษณะกลิ่นรสที่มีลักษณะเฉพาะได้ อย่างไรก็ตามในการผลิตชีสพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างปริมาณกรดอะมิโนอิสระและการสร้างกลิ่นรส แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนไม่ใช่ปฏิกิริยาย่อยที่เกิดขึ้นช้าที่สุด (rate-limiting step) ในกลไกการสร้างสารระเหยให้กลิ่น ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นช้าที่สุดอาจเป็นขั้นตอนการเปลี่ยนกรดอะมิโนเป็นสารระเหยให้กลิ่นด้วยเอนไซม์หรือเคมี (enzymatic หรือ chemical modification) (McSweeney & Sousa, 2000)

แคทาบอลิซึมของกรดอะมิโนทำให้เกิดสารระเหยให้กลิ่นหลายชนิด ได้แก่ แอมโมเนีย (ammonia) เอมีน (amine) อัลดีไฮด์ (aldehyde) ฟีนอล (phenols) อินโดล (indole) และอัลกอฮอล์ (alcohol) ขั้นตอนแรกของแคทาบอลิซึมของกรดอะมิโนจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาดีอะมิเนชัน ดีคาร์บอก-

ซิเลชัน ทรานอะมิเนชัน ดีซัลฟูเรชัน และ การย่อยสลาย amino-acid side-chain ขั้นที่สองคือ การเปลี่ยนสารจากปฏิกิริยาขั้นแรก (เช่น เอมีน อัลฟา-กรดคีโต (α-ketoacids) และกรดอะมิโน) เป็นสารกลุ่มอัลดีไฮด์ โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีอะมีเนส (deaminases) ที่ใช้เอมีนเป็นสารตั้งต้น และขั้นสุดท้ายของแคทาบอลิซึมของกรดอะมิโนคือ ปฏิกิริยารีดักชันของสารอัลดีไฮด์เป็นอัลกอฮอล์ การออกซิเดชันกลายเป็นกรด กรดอะมิโนที่มีหมู่ซัลเฟอร์กลายเป็นสารพวกมีเทนไธออล (methanethiol) หรืออนุพันธ์อื่นๆ ดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 วิถีทั่วไปของแคทาบอลิซึมของกรดอะมิโน
ที่มา: ดัดแปลงจาก McSweeney & Sousa (2000)

2.3 แคทาบอลิซึมของกรดอะมิโน

2.3.1 ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารระเหยให้กลิ่น

(1) การสร้างสารเอมีน (amine) และไพราซีน (pyrazine) การเปลี่ยนกรดอะมิโนด้วยปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันทำให้ได้เอมีน เช่น tyramine และ histamine ซึ่งสามารถก่ออาการแพ้ในผู้บริโภคได้ สารเอมีนที่ระเหยให้กลิ่นพบได้ในผลิตภัณฑ์ชีส เช่น methylamine, ethylamine, *n*-propylamine, isopropylamine, *n*-butylamine, 1-methylpropylamine, *n*-amylamine, iso-amylamine, anteiso-amylamine, *n*-hexylamine, ethanolamine, dimethylamine, diethylamine, dipropylamine, และ dibutylamine เนื่องจากไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ

กรดอะมิโนอิสระและการสร้างเอมีน การวิเคราะห์เอนไซม์ในปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันจึงสามารถอธิบายได้เฉพาะการสร้างเอมีนในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก แต่ไม่สามารถอธิบายการสร้างเอมีนแบบทุติยภูมิและตติยภูมิ (secondary and tertiary amines) ได้

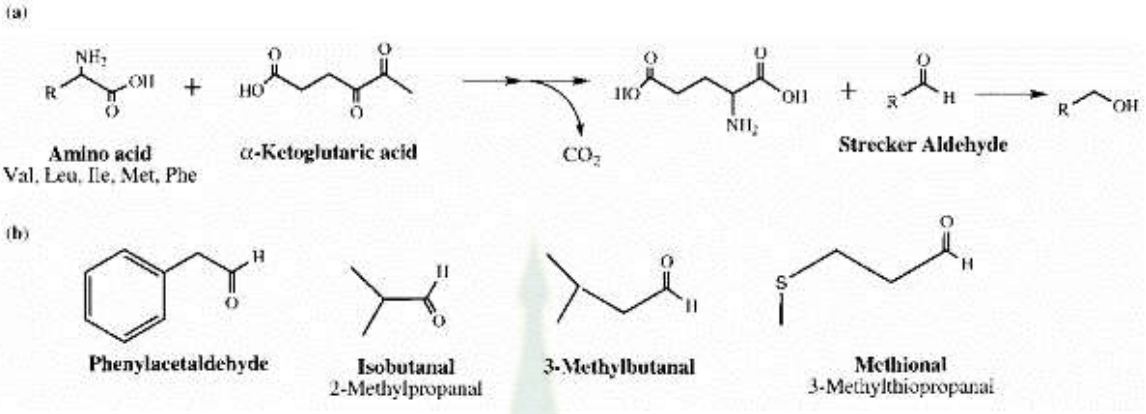
ขณะที่สารกลุ่มไพราซีนที่พบในชีส เช่น 2,5-dimethylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine, ethylpyrazine, 2,3-dimethylpyrzine, ethyl-methylpyrazine, trimethylpyrazine, tetramethylpyrazine และ ethyltrimethylpyrazine พบว่าเกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรีย

(2) การสร้างกรดและเบส กระบวนการออกซิเดทีพดีอะมิเนชัน (oxidative deamination) ทำให้เกิดแอมโมเนียและอัลฟา-กรดคีโต ซึ่งอัลฟา-กรดคีโตสามารถเปลี่ยนได้เป็นสารกลุ่มอัลดีไฮด์ต่อไป อย่างไรก็ตามในรายงานการวิจัยไม่พบสารกลุ่มอัลฟา-กรดคีโตนมากนัก เนื่องจากเป็นสารที่วิเคราะห์ได้ยากด้วยเทคนิค gas chromatography

(3) ปฏิกิริยาทรานอะมิเนชัน (transamination) และปฏิกิริยาสเทรคเกอร์[1] (Strecker reaction) กระบวนการทรานอะมิเนชันทำให้เกิดกรดอะมิโน ซึ่งสามารถถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นสารกลุ่มอัลดีไฮด์ได้จากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (ภาพที่ 2.3) หรือปฏิกิริยาสเทรคเกอร์ (ภาพที่ 2.4) โดยเฉพาะในสภาวะที่ค่า pH สูง สารกลุ่มอัลดีไฮด์เป็นสารระเหยให้กลิ่นที่สำคัญในอาหารหมักทั้งผลิตภัณฑ์จากนมหมักและน้ำปลา แต่มักพบในปริมาณน้อยเนื่องจากสารกลุ่มอัลดีไฮด์เปลี่ยนเป็นสารกลุ่มอัลกอฮอล์หรือกรดได้ง่าย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าปริมาณกรดอะมิโนอิสระไม่มีผลต่อการสร้างสารให้กลิ่นรสจากปฏิกิริยาสเทรคเกอร์ ตัวอย่างสารจากปฏิกิริยาสเทรคเกอร์ เช่น phenylacetaldehyde, isobutanal, 3-methylbutanal, และ methional (เปลี่ยนแปลงมาจากกรดอะมิโน Phe, Leu/Ile, Val และ Met ตามลำดับ) acetaldehyde (เปลี่ยนแปลงมาจากกรดอะมิโน Thr) benzaldehyde (เปลี่ยนแปลงมาจาก phenyl acetaldehyde), phenol และ *p*-cresol

กระบวนการทรานอะมิเนชันเป็นวิถีการสร้างสารระเหยให้กลิ่นที่สำคัญในอาหารหมัก เนื่องจากสารระเหยให้กลิ่นหลายชนิดที่พบในอาหารหมักจากกระบวนการทรานอะมิเนชันจัดเป็นสาร key flavor compounds ในอาหาร โดยเฉพาะสารกลุ่มอัลดีไฮด์เช่น methional, 3-methylbutanal, และ benzaldehyde โดยปฏิกิริยาเริ่มต้นของกระบวนการทรานอะมิเนชันคือ กิจกรรมจากเอนไซม์ aminotransferase และมีรายงานว่าเป็นปฏิกิริยาที่ควบคุมอัตราเร็ว (rate-controlling) การสร้างสารระเหยให้กลิ่นในเชื้อจุลินทรีย์ ตัวอย่างสารระเหยให้กลิ่นจากกระบวนการทรานอะมิเนชัน ดังตารางที่ 2.2

[1] ปฏิกิริยาทางเคมีที่เปลี่ยนอัลฟา-อะมิโนเป็นสารประกอบอัลดีไฮด์



ภาพที่ 2.4 ปฏิกิริยาสเทรคเกอร์ (a) และตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาสเทรคเกอร์ (b)
ที่มา: McSweeney & Sousa (2000)

ตารางที่ 2.2 สารระเหยให้กลิ่นที่ได้จากการเปลี่ยนจากกรดอะมิโนผ่านอัลฟา-กรดคีโตในกระบวนการทรานอะมิเนชัน

กรดอะมิโน	กรดคีโต	อัลดีไฮด์	กรดอินทรีย์	อัลกอฮอล์	เอสเธอร์
Ile	α-keto-3-methyl-pentanoic acid	2-methylbutanal	2-methyl butyric acid	2-methyl butanol	-
Leu	α-ketoisocaproic acid	3-methylbutanal *2-methylpropanal*	3-methyl butyric acid	3-methylbutanol 2-methylpropanol	Ethyl-3-methylbutanoate
Val	α-ketoisovaleric acid	2-methylpropanal	2-methyl propanoic acid	2-methylpropanol	Ethyl isobutaoate
Phe	Phenyl pyruvate	*Benzaldehyde* Phenylacetaldehyde	Benzoic acid Phenylacetic acid	Phenylmethanol Phenylethanol	Ethyl benzoate Phenylethyl acetate
Trp	Indole-3-pyruvate	Indole-3-acetaldehyde	Indole-3-acetic acid	-	-
Met	α-keto methylthio	Methional *Methylthio-acetaldehdye*	Methylthiobutyric acid	Methionol Methanethiol	Ethyl-3-methylthio propionate

ตารางที่ 2.2 สารระเหยให้กลิ่นที่ได้จากการเปลี่ยนจากกรดอะมิโนผ่านอัลฟา-กรดคีโตในกระบวนการทรานอะมิเนชัน (ต่อ)

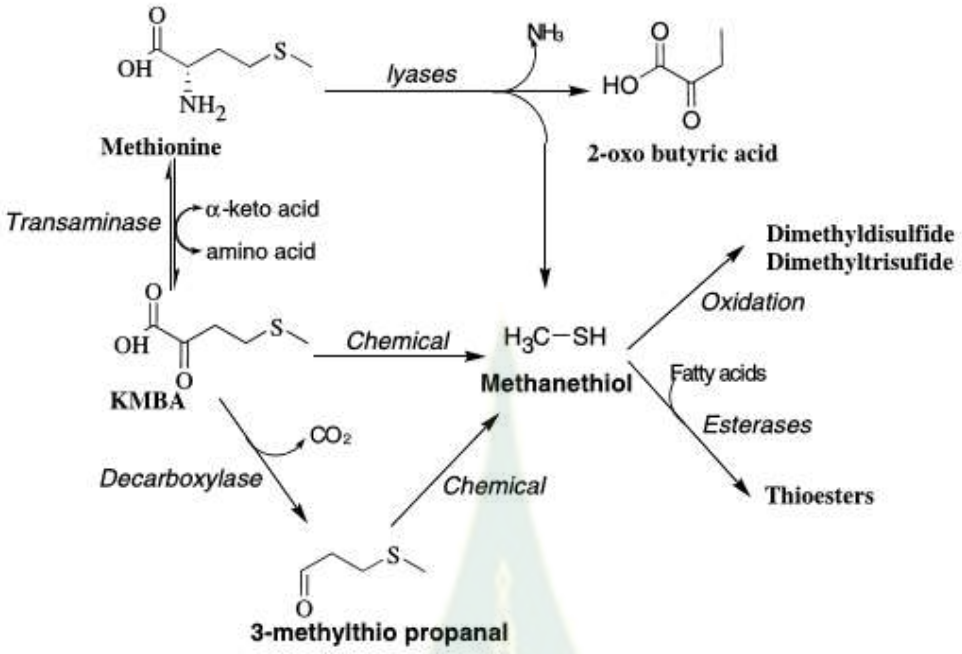
กรดอะมิโน	กรดคีโต	อัลดีไฮด์	กรดอินทรีย์	อัลกอฮอล์	เอสเธอร์
	butyrate				Methylthioacetate

อักษรเอียง หมายถึง สารประกอบที่สร้างจากปฏิกิริยา non-enzymatic reaction

ที่มา: Smit, Smit, & Engels (2005)

2.3.2 แคทาบอลิซึมของกรดอะมิโนที่สำคัญต่อการสร้างสารระเหยให้กลิ่น

(1) แคทาบอลิซึมของกรดอะมิโนที่มีหมู่ซัลเฟอร์ (sulphur) สารประกอบซัลเฟอร์ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักโดยเฉพาะในนมหมักเกิดการเปลี่ยนแปลงมาจาก methionine ดังภาพที่ 2.5 สาร สารประกอบซัลเฟอร์ที่ให้กลิ่นที่สำคัญในอาหารหมัก ได้แก่ methanethiol, hydrogen sulphide, dimethylsulphide, dimethyldisulphide, dimethyltrisulphide และ carbonyl sulphide สารเหล่านี้อาจเกิดจากปฏิกิริยาโดยเอนไซม์หรือจากปฏิกิริยาสเทรคเกอร์ เช่น methanethiol เกิดจากปฏิกิริยาโดยเอนไซม์จากแบคทีเรีย *Brevibaacterium linens* หรืออาจเกิดจากปฏิกิริยาทางเคมี โดย hydrogen sulphide จากการปฏิกิริยาออกซิเดชันของ cystine/cysteine (จากสาร reducing agent ในระบบหมัก) เข้าทำปฏิกิริยากับ methionine จนได้เป็น methanethiol, *S*-methylthioacetate เกิดจากแบคทีเรีย *Br. linens*, 3-methylthiopropanal เกิดจากปฏิกิริยาทรานอะมิเนชันของ methionine และจากนั้นจึงเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน สาร dimethylsulphide เกิดจากเมทาบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดโปรพิโอนิก (propionic acid bacteria) ขณะที่สาร dimethyldisulphide และ methional เกิดจากปฏิกิริยาสเทรคเกอร์ และ benzothiazole ยังไม่สามารถระบุวิถีการสร้างในอาหารหมักได้

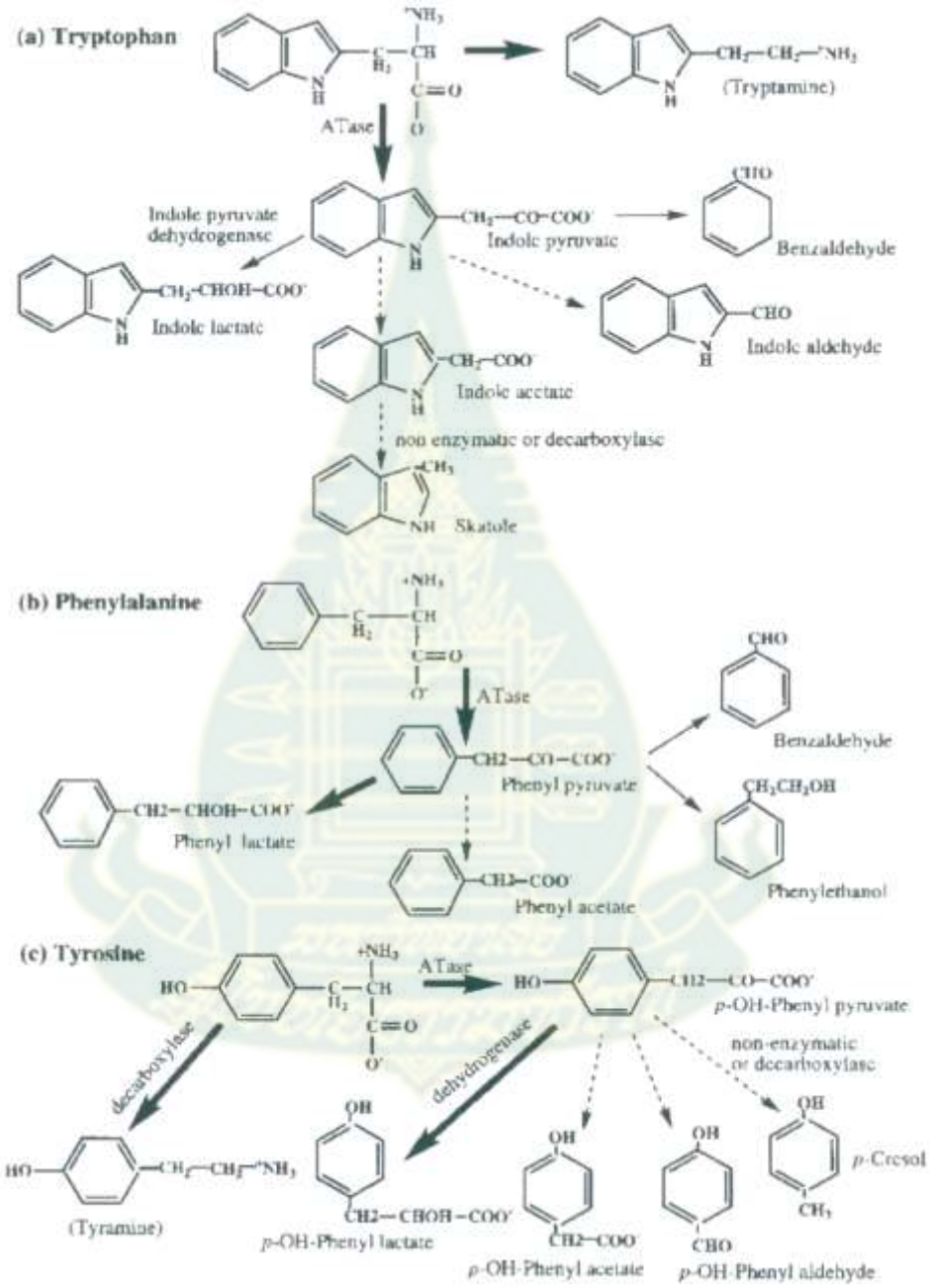


ภาพที่ 2.5 ปฏิกิริยาการเปลี่ยน methionine เป็นสารประกอบซัลเฟอร์
ที่มา: Smit, Smit, & Engels (2005)

(2) แคทาบอลิซึมของ phenylalanine, tyrosine และ tryptophan กรดอะมิโน phenylalanine, tyrosine และ tryptophan มีความสำคัญต่อการสร้างกลิ่นในอาหารหมัก วิถีของกระบวนการแคทาบอลิซึมแสดงดังภาพที่ 2.6 แคทาบอลิซึมของ tryptophan จะผลิตสาร indole pyruvate ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปจนได้เป็น indole lactic acid, indole acetic acid, indole aldehyde และ benzaldehyde

แคทาบอลิซึมของ phenylalanine ทำให้ได้ phenyl pyruvate ด้วยกิจกรรมของ aminotransferase จากนั้นสามารถเปลี่ยนเป็นสารระเหยให้กลิ่น เช่น phenyl lactate และ phenyl acetate ส่วน phenyl pyruvate สามารถเปลี่ยนเป็น benzaldehyde และ phenyl ethanol ได้ด้วยปฏิกิริยา nonenzymatic breakdown (ภาพที่ 2.6b) มีรายงานการพบสารระเหยให้กลิ่นในผลิตภัณฑ์ชีสที่เกิดจากแคทาบอลิซึมของ phenylalanine เช่น phenyl methanol, phenyl propanone, methylphenyl hydroxyl-acetate, phenyl acetaldehyde McSweeney & Sousa (2000) กล่าวว่า phenylethanol อาจเกิดจากปฏิกิริยาทรานอะมิเนชัน ดีคาร์บอกซิเลชัน หรือรีดักชัน โดยเชื้อยีสต์ที่เจริญที่ผิวของชีส ส่วน phenyl acetaldehyde และ phenyl ethanol เกิดจากปฏิกิริยาสเทรคเกอร์

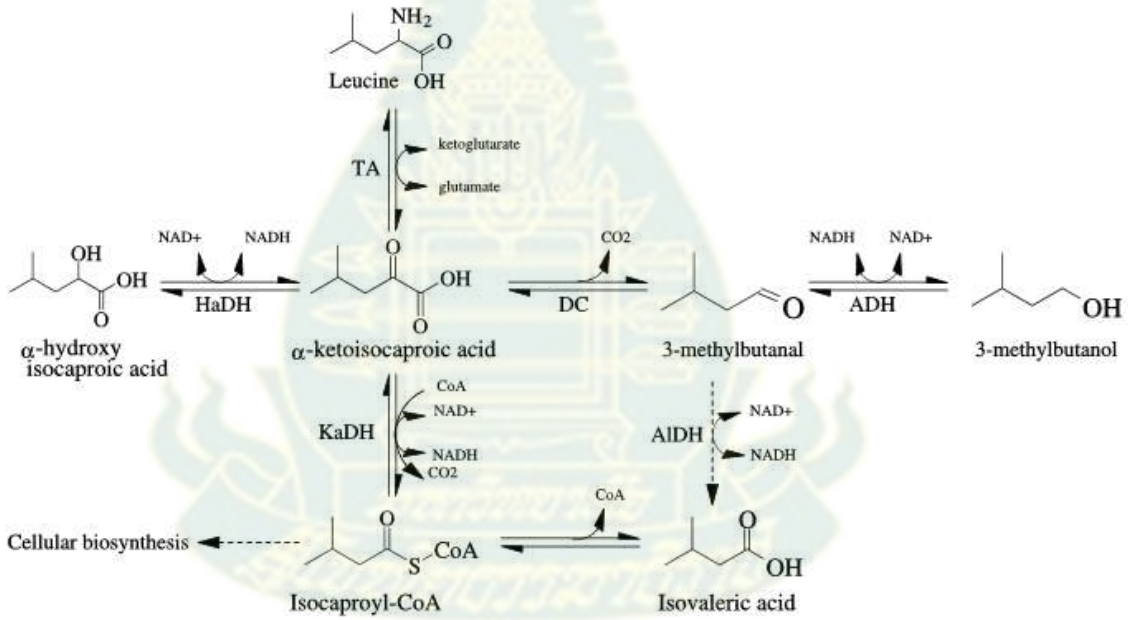
แคทาบอลิซึมของ tyrosine ทำให้ได้ tyramine และ *p*-hydroxy-phenylpyruvate โดย tyramine เกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (ภาพที่ 2.6c) นอกจากนี้ tyrosine ยังเป็นสารตั้งต้นสำหรับ *p*-cresol และ phenol จากปฏิกิริยาสเทรคเกอร์



ภาพที่ 2.6 วิถีเมทาบอลิซึมของ tryptophan (a), phenylalanine (b), tyrosine (c)
ที่มา: McSweeney & Sousa (2000)

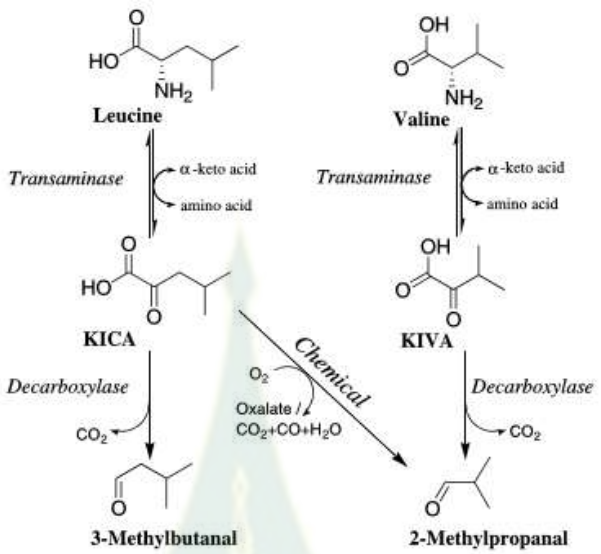
(3) แคทาบอลิซึมของกรดอะมิโนที่มีโครงร้างแบบกิ่ง (branched-chain amino acids) จะเริ่มต้นจากกิจกรรมของ aminotransferase ที่สามารถเปลี่ยนกรดอะมิโน ได้ผลิตภัณฑ์คือสารกลุ่มอัลฟา-กรดคีโตนในกระบวนการทรานอะมิเนชัน โดย leucine, isoleucine และ valine จะเปลี่ยนเป็น α-ketoisocaproate, α-keto-β-methyl-valerate และ α-ketoisovalerate ตามลำดับ และสารระเหยให้กลิ่นที่สำคัญแสดงดังตารางที่ 2.2 ตัวอย่างการสลาย leucine เพื่อสร้างสารระเหยให้กลิ่นแสดงดังภาพที่ 2.7 จะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันโดยเอนไซม์ α-keto acid decarboxylase ทำให้ได้สารกลุ่มอัลดีไฮด์ ในขณะที่ปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยเอนไซม์ aldehyde dehydrogenase ทำให้ได้กรดอินทรีย์ และปฏิกิริยารีดักชันโดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ทำให้ได้สารกลุ่มอัลกอฮอล์

(a)



ภาพที่ 2.7

(b)



ภาพที่ 2.7 ปฏิกิริยาการสลาย leucine (a) และปฏิกิริยา non-enzymatic reaction ที่เกี่ยวข้อง (b)
TA = transaminase, HaDH = hydroxyl acid dehydrogenase, DC = keto acid decarboxylase, ADH = alcohol dehydrogenase, AlDH = aldehyde dehydrogenase และ KaDH = keto acid dehydrogenase
ที่มา: Smit, Smit, & Engels (2005)

2.4 สารระเหยให้กลิ่นในน้ำปลา

สารระเหยให้กลิ่นในน้ำปลามีหลายชนิดทั้งอัลดีไฮด์ คีโตน กรดอินทรีย์ เอสเทอร์ ฟูราน สารประกอบที่มีธาตุไนโตรเจนและซัลเฟอร์ สารประกอบอัลดีไฮด์พบในน้ำปลาเช่น acetaldehyde, propanal, 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal และ benzaldehyde มีความสำคัญต่อกลิ่นรสของน้ำปลาเนื่องจากเป็นกลุ่มสารประกอบที่มีค่า odor threshold ต่ำ (Peralta, Shimoda, & Osajima, 1997) Fukami, Ishiyama, Yaguramaki, Masuzawa, Nabeta, Endo, et al. (2002) รายงานว่ากลิ่นที่สำคัญในน้ำปลาคือ fishy และ sweaty จากสาร 2-methylpropanal, 2-methylbutanal, 2-etylpyridine และ dimethyl trisulfide ขณะที่กรดไขมันที่ระเหยได้ที่สำคัญคือ 2-methylpropanoic acid ซึ่งให้กลิ่นรส cheesy และ stinky (Shimoda, Peralta, & Osajima, 1996; Jiang, Zeng, & Zhu, 2011) นอกจากนั้น Wichaphon, Thongthai, Assavanig, & Lertsiri (2011) พบว่าชนิดสารระเหยให้กลิ่นใช้จำแนกระดับคุณภาพน้ำปลาได้ โดยน้ำปลาเกรดสองจะพบสาร volatile organic acids (acetic acid, propanoic acid, 2-methylpropanoic acid, butanoic acid และ 3-

methylbutanoic acid) และ dimethyl trisulfide ปริมาณสูง ในขณะที่น้ำปลาเกรดพรีเมี่ยมจะพบสาร 2-ethyl furan, 3-hydroxy-2-butanone, 2-pentenol, 2,6-dimethyl pyrazine และ 6-methyl-5-hepten-2-one ดังนั้นชนิดและปริมาณสารระเหยให้กลิ่นที่พบในน้ำปลามีความสำคัญไม่เฉพาะเป็นคุณลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ของน้ำปลาแต่แสดงถึงระดับคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ด้วย การใช้จุลินทรีย์กล้าเชื้อในการหมักน้ำปลาจำเป็นต้องสร้างสารระเหยให้กลิ่นที่สำคัญเป็นไปตามคุณลักษณะเฉพาะของน้ำปลา สารระเหยให้กลิ่นที่ตรวจพบในน้ำปลาแสดงดังตารางที่ 2.3

2.5 แบคทีเรียในการหมักน้ำปลาและสภาวะแวดล้อมต่อการสร้างสารระเหยให้กลิ่น

ในระหว่างการหมักน้ำปลาพบแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ เช่น กลุ่มอาร์เคียชอบเค็ม (halophilc archaeon) ได้แก่ *Halobacterium salinarum*, *Halococcus saccharolyticus* (Tanasupawat, Namwong, Kudo, & Itoh, 2009), *Halobacterium* sp. (Akolkar, Durai, & Desai, 2010), *Natrinema gari* (Tapingkae et al., 2008) กลุ่มแบคทีเรียชอบเค็มจัด (extremely halophilic bacteria) ได้แก่ *Lentibacillus halophilus* (Tanasupawat, Pakdeeto, Namwong, Thawai, Kudo, & Itoh, 2006) กลุ่มแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง (moderately halophilic bacteria) ได้แก่ *Halobacillus thailandensis* (Chaiyanan, Chiyanan, Maugel, Huq, Robb, & Colwell, 1999), *Halobacillus* sp. (Namwong, Hiraga, Takada, Tsunemi, Tanasupawat, & Oda, 2006), *Filobacillus* sp. (Hiraga, Nishikata, Namwong, Tanasupawat, Takada, & Oda, 2005), *Virgibacillus* sp. (Chuon, Shiomoto, Koyanagi, Sasaki, Michihata, Chan, et al., 2013) กลุ่มแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกชอบเค็ม (halophilic lactic acid bacteria) ได้แก่ *Tetragenococcus halophilus* (Fukui, Yoshida, Shozen, Funatsu, Takano, Oikawa, et al., 2012) กลุ่มแบคทีเรียทั่วไปได้แก่ *Staphylococus* spp. (Fukami, Ishiyama, Yaguramaki, Masuzawa, Nabeta, Endo, et al., 2002), *Bacillus licheniformis* (Toyokawa, Takahara, Reungsang, Fukuta, Hachimine, Tachibana, et al., 2010), *B. subtilis* (Uchida, Kondo, Yamashita, Tanaka, Tran, Nagano, et al., 2004) ซึ่งแบคทีเรียแต่สายพันธุ์มีความสามารถที่แตกต่างกันทั้งการเจริญ ผลิตโปรติเนส ไลเปส และสร้างสารระเหยให้กลิ่นในสภาวะความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์สูง Uchida, OU, Chen, Yuan, Zhang, Chen, Funatsu, et al. (2005) พบว่ากล้าเชื้อโคจิ (Koji) ร่วมกับ *T. Halophilus* เพิ่มปริมาณกรดอินทรีย์และกรดอะมิโนที่ให้รสชาติ เช่น กรดแอสปาติค (aspartic acid) กรดกลูตามิค (glutamic acid) อะลานีน (alanine) และ วาลีน (valine) สารประกอบให้กลิ่นได้แก่ เอทานอล silanediol, pyrazine, phenol และ กรดฟอร์มิคพบปริมาณสูงในน้ำปลาที่หมักด้วยกล้าเชื้อ douchi ที่เตรียมจาก *Aspergillus*

oryzae (Kasankala, Xiong, & Chen, 2011) ขณะที่ 1-propanol, 2-methylpropanal และ benzaldehyde ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นรสในน้ำปลาทางการค้าพบปริมาณสูงขึ้นเมื่อใช้กล้าเชื้อสายพันธุ์ *T. Halophilus* (Udomsil, Rodtong, Tanasupawat, & Yongsawatdigul, 2010) นอกเหนือจากการผลิตสารระเหยให้กลิ่นที่ดีแล้วมีรายงานว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *S. xylosus* ที่เติมลงในน้ำปลาสามารถลดปริมาณสารที่ให้กลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์ เช่น 2-ethylpyrimidine, dimethyl trisulfide, dimethyl disulfide และ butanoic acid ได้ (Fukami, Funatsu, Kawasaki, & Watabe, 2004) แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์สามารถใช้ในการหมักน้ำปลาเพื่อผลิตสารระเหยให้กลิ่นหรือลดสารที่ให้กลิ่นไม่พึงประสงค์ในการหมักน้ำปลาได้

การปรับเปลี่ยนสภาวะแวดล้อมหรือสารอาหารมีผลต่อชนิดและปริมาณสารระเหยให้กลิ่นที่แบคทีเรียผลิตได้ Rijnen, Yvon, van Kranenburg, Courtin, Verheul, Chambellon, et al. (2003) พบว่าการเติมสาร α-ketoglutarate สามารถเพิ่มการสร้างสารระเหยประเภทซัลเฟอร์ (methanethiol, dimethylsuphide (DMS) และ dimethyldisulphide (DMDS)), aldehydes และ alcohols ในแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* TIL46 ประมาณ 4.6-35 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (ที่ไม่เติม) การเติมอาร์จีนีน (arginine) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแล็กโตส (lactose) ปริมาณจำกัดพบการสร้างสาร 3-methylbutanal และ 3-methalbutanol สูงขึ้นใน *L. lactis* ML3 (Brandsma, van de Kraats, Abee, Zwietering, & Meijer, 2012) การใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *L. lactis* subsp. *cremoris* SK110 และ *L. lactis* subsp. *lactis* B1155 ร่วมในการบ่มชีส (ripening) พบสาร hydrogen sulfide และ methannethiol เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ใช้ *L. lactis* subsp. *cremoris* SK110 เพียงสายพันธุ์เดียว (Ayad, Verheul, Wouters, & Smit, 2000) *Virgibacillus* sp. SK37 (GenBank/NCBI no. DQ910840) เป็นแบคทีเรียในกลุ่มทนเค็ม คัดแยกได้ในเดือนที่ 1 ของการหมักน้ำปลาและมีศักยภาพใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมักน้ำปลา โดย *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถผลิตโปรติเนสที่มีกิจกรรมสูงที่ความเข้มข้นเกลือสูงซึ่งเป็นคุณลักษณะที่สำคัญในการใช้หมักน้ำปลา (Sinsuwan, Rodtong, & Yongsawatdigul, 2007) และสร้างสารระเหยให้กลิ่นที่สำคัญในน้ำปลาได้เมื่อหมักน้ำปลาที่ความเข้มข้นเกลือร้อยละ 15-20 (Lopsongphon, Cadwallader, Rodtong, & Yongsawatdigul, 2013) ซึ่งการระบุชนิดและปริมาณสารระเหยให้กลิ่นที่แบคทีเรียผลิตได้สามารถเชื่อมโยงให้เข้าใจถึงวิถีการสร้างสารระเหยให้กลิ่นของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ได้อย่างถ่องแท้ อันจะนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจถึงบทบาทหน้าที่ของแบคทีเรียทนเค็มและพัฒนาการใช้แบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 2.3 สารระเหยให้กลิ่นในน้ำปลา

Compounds	Odor	References
Acid		
acetic acid	sour, cheesy	Lapsongphon et al. (2015), Wichaphon et al. (2011), Giri et al. (2010), Shimoda et al. (1996)
propanoic acid	cheesy, fecal	Lapsongphon et al. (2015), Wichaphon et al. (2011), Shimoda et al. (1996)
2-methylpropanoic acid	cheesy, Swiss cheese	Lapsongphon et al. (2015), Wichaphon et al. (2011), Shimoda et al. (1996)
butanoic acid	cheesy	Lapsongphon et al. (2015), Wichaphon et al. (2011), Giri et al. (2010), Fukami et al. (2002), Peralta et al. (1996), Shimoda et al. (1996), Pham et al. (2008)
3-methylbutanoic acid	cheesy, sweaty	Lapsongphon et al. (2015), Wichaphon et al. (2011), Giri et al. (2010), Fukami et al. (2002), Peralta et al. (1996), Shimoda et al. (1996), Pham et al. (2008)
2-methyl butanoic acid	cheesy	Giri et al. (2010)
2-phenylacetic acid	rosy, plastic	Lapsongphon et al. (2015)
3-phenylpropionic acid	rosy	Lapsongphon et al. (2015)
4-methylpentanoic acid	cheesy	Wichaphon et al. (2011), Peralta et al. (1996)
pentanoic acid	cheesy, sweaty	Peralta et al. (1996), Pham et al. (2008)
heptanoic acid	cheesy, sweaty, dirty socks	Pham et al. (2008)
capronic acid	rancid	Fukami et al. (2002)
Aldehyde		
2-methylpropanal	malty, dark chocolate, nutty, meaty, sweaty	Lapsongphon et al. (2015), Giri et al. (2010), Fukami et al. (2002), Shimoda et al. (1996)

ตารางที่ 2.3 สารระเหยให้กลิ่นในน้ำปลา (ต่อ)

Compounds	Odor	References
2-methylbutanal	malty, dark chocolate, nutty, meaty, sweaty, boiled rice-like ordour	Lapsongphon et al. (2015), Wichaphon et al. (2011), Giri et al. (2010), Fukami et al. (2002), Shimoda et al. (1996)
3-methylbutanal	malty, dark chocolate, nutty, meaty, sweaty	Lapsongphon et al. (2015), Giri et al. (2010), Shimoda et al. (1996)
phenylacetaldehyde	rosy, plastic	Lapsongphon et al. (2015)
(*Z*)-4-heptenal	crabby, stale, fishy	Lapsongphon et al. (2015)
(*E*)-2-nonenal	stale, hay	Lapsongphon et al. (2015)
acetaldehyde	pungent, sweet	Lapsongphon et al. (2015)
2,4-Nonadienal(EZ)	rancid	Giri et al. (2010)
benzaldehyde	almond, burnt sugar, sweet	Pham et al. (2008)
Ketones		
1-octen-3-one	mushroom	Lapsongphon et al. (2015)
(*Z*)-1,5-octadien-3-one	metallic	Lapsongphon et al. (2015)
(*E*)-β-damascenone	floral, apple sauce	Lapsongphon et al. (2015)
2-pentanone	fruity	Fukami et al. (2002)
2-propanone	sweet o	Wichaphon et al. (2011)
3-hydroxy-2-butanone	fatty	Wichaphon et al. (2011)
6-methyl-5-hepten-2-one	boiledrice	Wichaphon et al. (2011)
2-butanone		Wichaphon et al. (2011)
2,3-butanedione	caramel	Giri et al. (2010)
4-ethyl-6-hepten-3-one	fishy	Fukami et al. (2002)
acetophenone	cheesy	Fukami et al. (2002)
Alcohol		
2-phenylethanol	wine-like, rosy	Lapsongphon et al. (2015)
1-butanol	cheesy	Fukami et al. (2002)
2-butanol	flowery	Wichaphon et al. (2011)
2-propanol		Wichaphon et al. (2011)

ตารางที่ 2.3 สารระเหยให้กลิ่นในน้ำปลา (ต่อ)

Compounds	Odor	References
2-pentenol	rusty	Wichaphon et al. (2011)
3-pentanol		Wichaphon et al. (2011)
n-propanol	flowery	Wichaphon et al. (2011)
n-butanol		Wichaphon et al. (2011)
n-pentanol		Wichaphon et al. (2011)
2-methyl-1-propanol	flowery	Wichaphon et al. (2011)
2-methyl-1-butanol		Wichaphon et al. (2011)
3-methyl-1-butanol	rancid, burnt	Giri et al. (2010), Fukami et al. (2002)
1-octen-3-ol	earthy odour	Wichaphon et al. (2011)
ethanol		Wichaphon et al. (2011)
1-penten-3-ol		Wichaphon et al. (2011)
4-methyl-1-hexanol	sweaty	Fukami et al. (2002)
cyclopentanol	sweaty	Fukami et al. (2002)
2-ethyl-1-hexanol	floral, perfume	Pham et al. (2008)
benzeneethanol	floral, perfume	Pham et al. (2008)
Ester		
Ethyl acetate	fruity	Wichaphon et al. (2011), Giri et al. (2010)
Ethyl-2-methyl butanoate	caramel	Giri et al. (2010)
Ethyl isobutyrate	fruity	Giri et al. (2010)
Ethyl-3-methyl butanoate	fruity	Giri et al. (2010)
Aromatic compound		
Phenol	sweet, cotton candy	Wichaphon et al. (2011), Pham et al. (2008)
Furans		
4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	burnt sugar	Lapsongphon et al. (2015)
4-hydroxy-2-ethyl-5-methyl-3(2H)-furanone	burnt sugar	Lapsongphon et al. (2015)
4-hydroxy-5-ethyl-2-methyl-3(2H)-furanone	burnt sugar	Lapsongphon et al. (2015)
3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone	curry, spicy	Lapsongphon et al. (2015)

ตารางที่ 2.3 สารระเหยให้กลิ่นในน้ำปลา (ต่อ)

Compounds	Odor	References
2-ethyl furan	coffee-likeodour	Wichaphon et al. (2011)
2-methyl furan	ethereal	Wichaphon et al. (2011)
5-ethyldihydro-2-(3H)-furanone	herb, green, incense	Pham et al. (2008)
Nitrogen-containingcompounds		
trimethylamine	roten fish, ammoniacal	Wichaphon et al. (2011), Giri et al. (2010), Fukami et al. (2002), Shimoda et al. (1996), Pham et al. (2008)
3,6-dimethyl-2-ethylpyrazine	roasted potato	Lapsongphon et al. (2015)
2-acetyl-1-pyrroline	popcorn	Lapsongphon et al. (2015)
2-acetyl-2-thiazoline	popcorn	Lapsongphon et al. (2015)
o-aminoacetophenone	musky, grape, stale	Lapsongphon et al. (2015)
indole	fecal	Lapsongphon et al. (2015)
skatole	fecal	Lapsongphon et al. (2015)
2-ethylpyridine	Fishy	Fukami et al. (2002).
2,3-butanedione	buttery	Lapsongphon et al. (2015)
pyridine	rancid	Fukami et al. (2002)
ethylpyrazine	sweaty	Fukami et al. (2002)
2,6-dimethyl pyrazine	Boiled rice odour, sweet	Wichaphon et al. (2011), Fukami et al. (2002), Pham et al. (2008)
2-methylpyridine	sweaty	Fukami et al. (2002)
2-ethyl-6(or 5)-methyl-pyrazine	rancid	Fukami et al. (2002)
2-methyl-5-(1-methylethyl)pyrazine	sweaty	Fukami et al. (2002)
benzonitrile	rancid	Fukami et al. (2002)
Sulfur-containingcompounds		
2-methyl-(3-methyldithio)furan	thiamin, meaty	Lapsongphon et al. (2015), Giri et al. (2010)
dimethyl sulfide	corn	Lapsongphon et al. (2015), Peralta et al. (1996), Peralta et al. (1996), Shimoda et al. (1996)

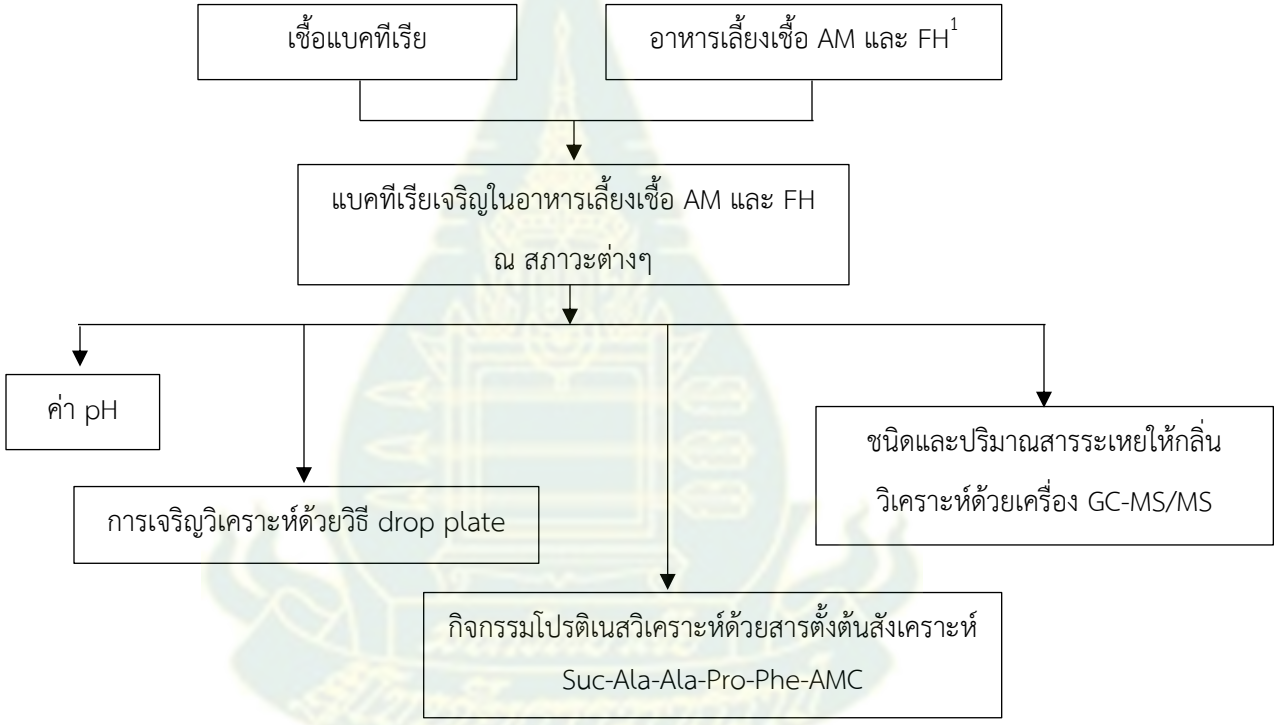
ตารางที่ 2.3 สารระเหยให้กลิ่นในน้ำปลา (ต่อ)

Compounds	Odor	References
dimethyl disulfide		Wichaphon et al. (2011), Peralta et al. (1996), Shimoda et al. (1996)
dimethyl trisulfide	rotten, sulfurous, cabbage, sweaty, fishy	Lapsongphon et al. (2015), Wichaphon et al. (2011), Giri et al. (2010),Fukami et al. (2002), Peralta et al. (1996), Peralta et al. (1996), Shimoda et al. (1996), Pham et al. (2008)
3-(methylthio) propanal	cooked potato, meaty	Lapsongphon et al. (2015), Wichaphon et al. (2011), Giri et al. (2010), Fukami et al. (2002), Peralta et al. (1996)
3-(methylthio) propanol	cooked potato	Lapsongphon et al. (2015)
methanethiol	rotten, sulfurous, cabbage	Lapsongphon et al. (2015)
thiobismethane	pungent	Pham et al. (2008)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยแสดงดังภาพที่ 3.1 โดยเตรียมเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และเตรียมต้นเชื้อเพื่องถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ anchovy medium (AM) และ fish acid hydrolysate medium (FM) ที่เตรียมไว้ และบ่มภายใต้สภาวะต่างๆ

เมื่อเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 เจริญตามระยะเวลาที่กำหนดแล้ว จึงตรวจวัด pH การเจริญของเชื้อ กิจกรรมของโปรติเนส และสารระเหยให้กลิ่นที่เชื้อสร้างขึ้น



ภาพที่ 3.1 การดำเนินการวิจัย

[1] AM คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ anchovy medium และ FM คือ fish acid hydrolysate medium

3.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรีย แบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 คัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา และได้ทดสอบศักยภาพในการเจริญ การสร้างกลิ่นและโปรติเนสที่สภาวะโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นสูงแล้ว (Sinsuwan, Rodtong, & Yongsawatdigul, 2007; Lopsongphon, Cadwallader, Rodtong, & Yongsawatdigul, 2013) จึงนำมาเก็บรักษาที่แหล่งเก็บเชื้อจุลินทรีย์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุร-

นารี นำเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Y medium (1% yeast extract, 0.3% trisodium citrate, 0.2% potassium chloride, 2.5% magnesium sulfate) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm เป็นเวลา 1 วัน ทำให้เชื้อบริสุทธ์ด้วยเทคนิค cross streak บนอาหารแข็ง trypticase soy agar (TSA) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

เตรียมต้นเชื้อ (inoculum) นำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารแข็ง TSA ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Y medium บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm เป็นเวลา 1 วัน แล้วถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิมในปริมาตรร้อยละ 2 บ่มที่สภาวะเดียวกันเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเจือจางเชื้อแบคทีเรียด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ให้ได้ค่าดูดกลืนคลื่นแสง 0.25 Absorbance unit (A.U.) ได้ต้นเชื้อสำหรับการศึกษาต่อไป (ภาพที่ 3.1)

3.2 เตรียมตัวอย่าง เตรียมปลากะตักบดแห้งโดยนำปลากะตักสด (*Stolephorus* spp.) ทำแห้งด้วยวิธีการระเหิดแห้ง (freeze dry) บดขนาดอนุภาคและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 140 mesh เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ anchovy medium (AM) ที่เตรียมจากปลากะตักบดแห้ง และอาหารเลี้ยงเชื้อ fish acid hydrolysate (FH) ที่เตรียมจากปลากะตักย่อยด้วยกรด พร้อมปรับค่า pH ตามที่กำหนดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 9.8 มิลลิลิตรลงในภาชนะขวดแก้วทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.6 เซนติเมตร ความสูง 3.5 เซนติเมตร ทำให้ปลอดเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ภาพที่ 3.1)

จากนั้นถ่ายต้นเชื้อปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรลงใน AM หรือ FH โดยมีสภาวะการเจริญดังนี้ (1) ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10 15 20 25 และ 27 ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 0.1, pH 7, และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วันสำหรับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10-20 และเป็นเวลา 15 วันสำหรับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 25-27 ในสภาวะที่มี (aerobic condition) และไม่มีออกซิเจน (anaerobic condition) และ (2) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 0.1 1 และ 2 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10 หรือ 25, pH 7 และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วันสำหรับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10 และเป็นเวลา 15 วันสำหรับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 25 ในสภาวะที่มีออกซิเจน

เมื่อครบระยะเวลาการเจริญ กำจัดเซลล์แบคทีเรียและตะกอนจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเก็บสารละลายส่วนใสเพื่อวิเคราะห์ค่าทางเคมีและกิจกรรมโปรติเนสต่อไป ตัวอย่างควบคุมเตรียมเช่นเดียวกับตัวอย่างทดลองยกเว้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 แทนต้นเชื้อแบคทีเรีย (ภาพที่ 3.1)

ทั้งนี้การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีออกซิเจนทำตั้งไว้ในตู้เพาะเชื้อ ขณะที่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนใช้ภาชนะเลี้ยงเชื้อในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic jar) ที่มี AnaeroGen การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ FH โดยทำการย่อยปลากะตักบดแห้งในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) เข้มข้น 6 นอร์-มอล ผสมในอัตราส่วน 1 : 9 ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และปรับค่า pH ให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรกไซด์ ทำแห้งด้วยวิธีการระเหิดแห้ง และวิเคราะปริมาณคลอไรด์ด้วยวิธี Volhard's method

3.3 ตรวจวัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย แบคทีเรียที่มีชีวิตตรวจนับด้วยเทคนิค drop plate (Hoben & Somasegaran, 1982) โดยหยดตัวอย่างปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร ที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสมลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TSA ที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 10 และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

3.4 ตรวจวัดค่าพีเอช ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ AM และ FH ก่อนและหลังการเจริญของแบคทีเรียตรวจวัดด้วยเครื่อง pH meter (Mettler-Toledo MP220, Schwerzenbach, Switzerland)

3.5 ตรวจวัดกิจกรรมโปรติเนส ด้วยวิธีการของ Sinsuwan, Rodtong, & Yongsawatdigul (2007) โดยใช้สารตั้งต้นสังเคราะห์ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC นำสารละลายส่วนใสทำปฏิริยาการตรวจวัดกิจกรรมของโปรติเนส (ปริมาตรปฏิกิริยารวม 1 มิลลิลิตร) ที่ประกอบด้วย 1 ไมโครโมล่าร์ของสารตั้งต้นสังเคราะห์, 200 มิลลิโมล่าร์ของ Tris–HCl (pH 8), และ 30 มิลลิโมล่าร์ของแคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย 30% butanol, 35% methanol และ 35% น้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร วัดค่าฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence) ที่ความยาวคลื่นการกระตุ้น 380 นาโนเมตรและความยาวคลื่นคายพลังงาน 460 นาโนเมตร หน่วยกิจกรรม (unit activity) คือ ปริมาณ AMC ที่ถูกปล่อยปล่อยเป็นอิสระเข้มข้น 1 ไมโครโมล่าร์ต่อนาที

3.6 วิเคราะห์รูปแบบกรดอะมิโน (amino acid profile) ในปลากะตักบดแห้ง ด้วยวิธีการ AOAC official method 994.12, 988.15 (2000) วิเคราะห์ด้วยวิธี gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS)

3.7 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen content) ด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC Official Method 955.04)

3.8 วิเคราะห์สารระเหยให้กลิ่นด้วยวิธี headspace solid-phase microextraction (SPME) ร่วมกับ gas chromatography-tandem mass spectrophotometer (GC-MS/MS) นำตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติม cyclohexanol ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 ppm ซึ่งเป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) และโซเดียมคลอไรด์ความสุดท้ายเข้มข้นร้อยละ 27 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณสาร

ระเหยให้กลิ่นเครื่อง GC-MS/MS โดยทำการสกัดสารระเหยให้กลิ่นด้วยวิธี headspace solid-phase microextraction (SPME) นำตัวอย่างให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และดูดซับสารระเหยให้กลิ่นด้วยไฟเบอร์ชนิด Divinylbenzene/Carboxen/ Polydimethylsiloxane stable flex (Supelco, Bellefonate, PA) ที่มีความหนา 50/30 ไมโครเมตร เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแยกสารระเหยให้กลิ่นและวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS ที่มี capillary column ชนิด DB-Wax polyethylene glycol (60m × 0.25mm × 0.25μm, Agilent Technologies, Redwood, CA) และเครื่องตรวจวัด quadrupole mass detector อุณหภูมิการแยกสารเพิ่มขึ้นจาก 28 ถึง 200 องศา-เซลเซียส ที่อัตราการเพิ่มขึ้นของอุณภูมิ 10 °C/min สเปกตรัมของมวลสารระเหยให้กลิ่นได้จากพลังงานการกระตุ้นอิเล็กตรอน (electron ionization, EI) ที่ 70 eV การระบุชนิดสารระเหยให้กลิ่นโดยเปรียบเทียบข้อมูล retention time และ mass spectral data ที่ได้กับฐานข้อมูล National Institute of Standards (NIST data) และรายงานค่าดัชนี Kovats index ของสารแต่ละชนิด ปริมาณสัมพัทธ์ (peak area relative) ของสารระเหยให้กลิ่นคำนวณเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคของสารชนิดนั้นๆกับสารมาตรฐานภายใน (cyclohexanol) รายงานค่าปริมาณสัมพัทธ์โดยนำค่าเฉลี่ยของปริมาณสัมพัทธ์ของตัวอย่างวิเคราะห์ (ที่เติมเชื้อแบคทีเรีย) หักลบจากค่าเฉลี่ยของปริมาณสัมพัทธ์ตัวอย่างควบคุม

3.9 วิเคราะห์ผลทางสถิติ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมีสมมุติฐานว่าข้อมูลกระจายแบบปกติ (normal distribution) จึงวางแผนการวิจัยแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design: CRD) นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test (DMRT)

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์ (extracellular proteinase) ของ *Virgibacillus* sp. SK37

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในปลากะตักแห้ง (ก่อนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ) พบกรดอะมิโน lysine ปริมาณมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 26.12 ของปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด ในขณะที่ leucine, phenylalanine, histidine, glutamic acid และ tyrosine พบในปริมาณคิดเป็นร้อยละ 10.39, 9.55, 9.20, 8.60 และ 7.32 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) จากนั้นจึงได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 พบว่า

ตารางที่ 4.1 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในปลากะตักแห้ง

Amino acids	mg/100g	%
Alanine	1,455	3.0
Arginine	<5.00	0.01
Aspartic acid	1,884	3.8
Cystine	<5.00	0.01
Glutamic acid	4,216	8.6
Glycine	1,332	2.7
Histidine	4,512	9.2
Hydroxylysine	<5.00	0.01
Hydroxyproline	59.43	0.1
Isoleucine	2,953	6.0
Leucine	5,093	10.4
Lysine	12,808	26.1
Methionine	1,146	2.3
Phenylalanine	4,684	9.6
Proline	1,269	2.6

ตารางที่ 4.1 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในปลากะตักแห้ง (ต่อ)

Amino acids	mg/100g	%
Serine	416.60	0.9
Threonine	597.05	1.2
Tryptophan	809.12	1.7
Tyrosine	3,588	7.3
Valine	2,201	4.5
Total amino acids	**49,038**	**100**

4.1 ผลต่อการเจริญ

ปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตเริ่มต้นในทุกตัวอย่างของการศึกษานี้ประมาณ 6 logCFU/ml จากผลการศึกษาพบว่า ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์มีผลทำให้การเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ลดลง ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4.2) โดยในสภาวะที่มีออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตลดลงจาก 7.76 logCFU/ml ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 10% เหลือ 3.37 logCFu/ml ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลดไรด์ 27% เช่นเดียวกับในอาหารเลี้ยงเชื้อ FH ที่จำนวนแบคทีเรียลดลงจาก 7.35 logCFU/ml เหลือ 3.63 logCFu/ml นอกจากนี้จากผลการทดลองสังเกตได้ว่าค่า pH ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับการเจริญของแบคทีเรีย

ผลการศึกษาพบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนดีกว่าสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (ตารางที่ 4.2) โดยหากพิจารณาจากการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM ณ ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 10% จะพบว่าจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตในสภาวะที่มีออกซิเจนสูงกว่าสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนประมาณ 2 logCFU/ml ในขณะที่พบความแตกต่างอย่างมากในอาหารเลี้ยงเชื้อ FH ที่พบความแตกต่างของจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตประมาณ 5 logCFU/ml

นอกจากนี้ ผลการศึกษาพบว่าในสภาวะที่มีออกซิเจน อาหารเลี้ยงเชื้อ AM ที่มีโปรตีนเป็นแหล่งไนโตรเจนหลักส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ได้ดีใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อ FH ที่มีกรดอะมิโนอิสระเป็นแหล่งไนโตรเจนหลัก (ตารางที่ 4.2) แต่หากพิจารณาในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งเป็นสภาวะที่การเจริญของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ไม่ดีนัก จะเห็นได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ AM สามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ FH

ผลการวิจัยพบว่า ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 25% การเพิ่มขึ้นของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM ไม่มีผลส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 (ตารางที่ 4.3) โดยการเจริญของแบคทีเรียที่ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ 0.1, 1 และ 2% มีค่าไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) แต่ในสภาวะที่ความเข้มข้นของโซเดียมใคลอไรด์ 10% พบว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ($P < 0.05$) นอกจากนั้นจากผลการทดลองเบื้องต้น พบว่าช่วงอุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียสมีผลต่อการเจริญของ *Virgibacillus* sp. SK37 เพียงเล็กน้อย การวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

4.2 ผลต่อการสร้างโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์

การสร้างโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 มีความสัมพันธ์กับการเจริญ โดยสังเกตได้ว่าที่จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต >7 logCFU/ml จะสามารถตรวจวัดกิจกรรมของ โปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์ได้ (ตารางที่ 4.2 และ 4.3) ซึ่งสภาวะที่ตรวจพบกิจกรรมของโปรติเนส-หลั่งออกภายนอกเซลล์คือ สภาวะที่มีออกซิเจน และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่ำ (10-15%) แบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ไม่พบการสร้างโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์ได้ที่สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูง ($\geq$20%)

นอกจากนี้ผลการศึกษายังพบว่า ปริมาณไนโตรเจนมีผลลดการการสร้างโปรติเนสที่หลั่งออกภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 ($P < 0.05$) ทั้งที่การเจริญของแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้น ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4.3)

4.2 การศึกษาชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของสารระเหยให้กลิ่นที่ผลิตจาก *Virgibacillus* sp. SK37

ผลการศึกษาชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของสารระเหยให้กลิ่นที่ผลิตจากแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM และ FH พบว่าสารระเหยให้กลิ่นที่ตรวจพบจำแนกได้เป็น 5 กลุ่มสำคัญ ได้แก่ alcohols, aldehyde, acids, sulfur-containing compounds และ nitrogen-containing compounds ขณะที่สารระเหยให้กลิ่นกลุ่ม ketone พบได้ในปริมาณเล็กน้อย ส่วนสาร phenol มีค่า ordor threshold สูงมาก (Giri, Osako, Okamoto, & Ohshima, 2010) จึงอาจไม่มีบทบาทสำคัญต่อกลิ่นรสในน้ำปลา (ตารางที่ 4.4, 4.5, 4.6)

ผลการวิเคราะห์สารระเหยให้กลิ่นที่ผลิตจากแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM ณ สภาวะที่มีออกซิเจน ที่พบในปริมาณสูง (พื้นที่ใต้กราฟสัมพัทธ์ >10) คือ 2,5-dimethyl-pyrazine, benzaldehyde และ phenylethyl alcohol โดยสารเหล่านี้มีแนวโน้มลด

ปริมาณลงเมื่อความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้น (ตารางที่ 4.4) ในขณะที่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนพบสารระเหยให้กลิ่นในปริมาณต่ำและมีเพียง 4 ชนิดเท่านั้น คือ 2-methyl-pyrazine, cyclohexanone, 1-cyclohexyl-1-butanone และ phenol ซึ่งพบเฉพาะ ณ ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 10% เท่านั้น (ตารางที่ 4.4)

ผลการวิเคราะห์สารระเหยให้กลิ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ FH ในสภาวะที่มีออกซิเจน พบสารระเหยให้กลิ่นที่สำคัญคือ 3-methyl-1-butanol, 2,5-dimethyl-pyrazine, benzaldehyde, 2-methlbutanoic acid, 3-(methylthio)-1-propanol และ phenylethyl alcohol (ตารางที่ 4.5) เช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ AM คือ ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนพบสารระเหยให้กลิ่นในปริมาณต่ำและมีเพียง 2 ชนิดเท่านั้น คือ benzaldehyde และ phenol (ตารางที่ 4.5)

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM ในสภาวะที่มีออกซิเจนมีผลต่อชนิดและปริมาณของสารระเหยให้กลิ่นที่ผลิตโดยแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 พบว่าสารระเหยให้กลิ่นสำคัญที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ dimethyl disulfide, 3-methyl-1-butanol, pyrazines, 3-methylbutanoic acid, 3-(methylthio)-1-propanol และ phenylethyl alcohol (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.2 ผลของความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่สภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่า pH และการสร้างโปรติเนสของแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ anchovy medium (AM) และ fish acid hydrolysate medium (FH) ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเข้มข้นร้อยละ 0.1 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

Condition	NaCl (%)	Anchovy medium (AM)			Fish acid hydrolysate medium (FH)		
		pH	logCFU/ml	Proteinase production (mU/ml)	pH	logCFU/ml	Proteinase production (mU/ml)
Aerobic	10	8.24 ± 0.09^{a}	7.76 ± 0.01^{a}	0.35 ± 0.07^{a}	8.01 ± 0.01^{a}	7.35 ± 0.09^{a}	0.14 ± 0.02
	15	8.27 ± 0.18^{a}	7.70 ± 0.02^{a}	0.16 ± 0.02^{b}	7.99 ± 0.07^{a}	6.30 ± 0.13^{b}	nd
	20	7.03 ± 0.38^{b}	6.04 ± 0.88^{b}	nd	7.58 ± 0.28^{b}	6.47 ± 0.49^{b}	nd
	25	6.70 ± 0.06^{b}	3.43 ± 0.02^{c}	nd	7.14 ± 0.06^{c}	3.36 ± 0.09^{c}	nd
	27	6.74 ± 0.01^{b}	3.37 ± 0.23^{c}	nd	7.16 ± 0.09^{c}	3.63 ± 0.09^{c}	nd
Anaerobic	10	6.86 ± 0.03	5.62 ± 0.35^{A}	nd	7.16 ± 0.01^{B}	2.42 ± 0.17	nd
	15	6.76 ± 0.13	4.56 ± 0.08^{B}	nd	7.08 ± 0.01^{C}	2.44 ± 0.10	nd
	20	6.86 ± 0.01	$3.76 \pm 0.75^{B, C}$	nd	6.82 ± 0.01^{D}	2.89 ± 0.98	nd
	25	6.89 ± 0.15	3.30 ± 0.06^{C}	nd	6.80 ± 0.05^{D}	3.30 ± 0.06	nd
	27	6.77 ± 0.18	3.54 ± 0.02^{C}	nd	7.24 ± 0.01^{A}	3.39 ± 0.07	nd

Average of initial pH of AM and FH media was 6.78 ± 0.13 and 7.05 ± 0.20, respectively.
Average of initial bacterial count was 5.73 ± 0.41 logCFU/ml.
Incubation time of sample containing 10-20 and 25-27% NaCl was 10 and 15 days, respectively.
Means ± standard deviation
Different superscript letters in a column indicate significant differences ($P < 0.05$).
nd means not detected.

ตารางที่ 4.3 ผลของปริมาณไนโตเจนทั้งหมดต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่า pH และการสร้างโปรติเนสของแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ anchovy medium (AM) ที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 10 และ 25 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

Total nitrogen (%)	10% NaCl			25% NaCl		
	pH	logCFU/ml	Proteinase production (mU/ml)	pH	logCFU/ml	Proteinase production (mU/ml)
0.1	8.22 ± 0.10	7.29 ± 0.12^{b}	0.25 ± 0.01^{a}	6.71 ± 0.01^{a}	3.62 ± 0.06	nd
1	8.19 ± 0.04	7.66 ± 0.22^{a,b}	0.08 ± 0.01^{b}	6.45 ± 0.01^{c}	3.78 ± 0.07	nd
2	8.05 ± 0.04	8.03 ± 0.13^{a}	0.05 ± 0.03^{b}	6.56 ± 0.01^{b}	3.63 ± 0.22	nd

Average of initial pH was 6.60 ± 0.12.
Average of initial bacterial count was 5.20 ± 0.72 logCFU/ml.
Incubation time of sample containing 10 and 25% NaCl was 10 and 15 days, respectively.
Means ± standard deviation
Different superscript letters in a column indicate significant differences ($P < 0.05$).
nd means not detected.

ตารางที่ 4.4 ชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของสารระเหยให้กลิ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ anchovy medium (AM) ที่มีแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 เจริญที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (10-27%) ที่สภาวะมีและไม่มีออกซิเจน ณ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเข้มข้นร้อยละ 0.1 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส, pH 7

RI[a]	RI[b]	Compound	Relative peak area[c]					
			Aerobic condition					Anaerobic condition
			10%	15%	20%	25%	27%	10%
Alcohols								
1153	1149	1-Butanol	nd	nd	nd	0.118	0.055	nd
1215	1206	3-Methyl-1-butanol	1.718	nd	19.996	0.263	0.194	nd
1350	1353	1-Hexanol	0.178	nd	1.025	nd	nd	nd
1484	1484	2-Ethyl-1-hexanol (1-Hexanol)	0.531	nd	nd	nd	nd	nd
1555	1565	1-Octanol	0.949	nd	nd	nd	nd	nd
1877	1872	Benzyl alcohol	nd	0.851	nd	nd	0.300	nd
1910	1903	Phenylethyl alcohol	10.812	9.710	3.824	0.052	0.220	nd
Aldehydes								
1382	1388	Nonanal	9.970	0.405	nd	nd	nd	nd
1514	1515	Benzaldehyde	90.388	163.131	1.986	0.175	0.843	nd
Acids								
1540	1531	Propanoic acid	1.608	nd	nd	nd	nd	nd
1570	1581	2-Methyl-propanoic acid	4.432	nd	nd	nd	nd	nd
1676	1680	3-Methyl-butanoic acid	nd	nd	1.078	nd	nd	nd
1859	1849	Hexanoic acid	nd	nd	nd	nd	0.124	nd
Sulpur-containing compound								
1593	1593	1-(Methylthio)-3-pentanone	0.437	nd	nd	nd	nd	nd
Nitrogen-containing compounds								
1265	1263	2-Methyl-pyrazine	7.345	3.856	nd	nd	nd	0.227
1321	1323	2,5-Dimethyl-pyrazine	84.977	57.484	1.895	nd	0.720	nd
1385	1388	2-Ethyl-5-methyl-pyrazine	8.382	3.374	nd	nd	nd	nd
1458	1455	2-Ethyl-3,5-dimethyl-pyrazine	nd	0.381	nd	nd	nd	nd

ตารางที่ 4.4 ชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของสารระเหยให้กลิ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ anchovy medium (AM) ที่มีแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 เจริญที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (10-27%) ที่สภาวะมีและไม่มีออกซิเจน ณ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเข้มข้นร้อยละ 0.1 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส, pH 7 (ต่อ)

RI[a]	RI[b]	Compound	Relative peak area[c]					
			Aerobic condition					Anaerobic condition
			10%	15%	20%	25%	10%	10%
1473	1464	2-Methyl-5-propylpyrazine	0.863	0.525	nd	nd	nd	nd
Ester								
1702	1695	Cyclohexyl hexanoate	nd	nd	nd	nd	0.487	nd
Ketones								
1283	1282	Cyclohexanone	nd	nd	nd	1.045	0.077	0.040
1982	1984	1-Cyclohexyl-1-butanone	0.377	nd	0.421	nd	0.456	0.221
Furans								
1453	1447	2-Furancarboxaldehyde (Furfural)	nd	nd	nd	0.327	0.499	nd
1656	1659	2-Furanmethanol	nd	nd	0.048	nd	1.383	nd
Other								
1997	1996	Phenol	0.743	nd	0.502	nd	1.420	0.442

[a]Retention indicates calculated for DB-Wax column using *n*-alkanes as standards.
[b]Retention indicates for DB-Wax column were reported on web databases http://www.odour.org.uk/lriindex.html or http://webbook.nist.gov/
[c]Values represent the relative area under peak area of any compounds against that of internal standard (cyclohexanol)
nd, not detected or the difference in relative peak area between sample and blank was zero.

44

ตารางที่ 4.5 ชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของสารระเหยให้กลิ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ fish acid hydrolysate medium (FH) มีแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 เจริญที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (10-27%) ที่สภาวะมีและไม่มีออกซิเจน ณ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเข้มข้นร้อยละ 0.1 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส, pH 7

RI[a]	RI[b]	Compound	Relative peak area[c]				
			Aerobic condition			Anaerobic condition	
			10%	15%	20%	10%	15%
Alcohols							
1160	1149	1-Butanol	nd	nd	0.576	nd	nd
1214	1206	3-Methyl-1-butanol	56.018	211.628	128.371	nd	nd
1350	1353	1-Hexanol	nd	nd	3.097	nd	nd
1554	1565	1-Octanol	0.652	nd	nd	nd	nd
1877	1872	Benzyl alcohol	nd	4.339	2.433	1.584	nd
1911	1903	Phenylethyl alcohol	92.938	106.947	nd	nd	nd
Aldehydes							
1381	1388	Nonanal	nd	0.565	nd	nd	nd
1514	1515	Benzaldehyde	14.071	190.958	nd	0.689	0.298
Acids							
1570	1581	2-Methyl-propanoic acid	0.827	nd	nd	nd	nd
1671	1666	2-Methyl-butanoic acid	5.829	2.691	0.690	nd	nd
Sulpur-containing compound							
1716	1715	3-(Methylthio)-1-propanol	2.438	4.108	2.305	nd	nd
Nitrogen-containing compounds							
1265	1263	2-Methyl-pyrazine	4.265	6.360	0.906	nd	nd
1320	1323	2,5-Dimethyl-pyrazine	64.773	88.708	17.661	nd	nd
1343	1335	2,3-Dimethyl-pyrazine	0.757	nd	nd	nd	nd
Ketone							
1284	1282	Cyclohexanone	nd	nd	0.409	nd	nd

ตารางที่ 4.5 ชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของสารระเหยให้กลิ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ fish acid hydrolysate medium (FH) มีแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 เจริญที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (10-27%) ที่สภาวะมีและไม่มีออกซิเจน ณ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเข้มข้นร้อยละ 0.1 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส, pH 7 (ต่อ)

RI[a]	RI[b]	Compound	Relative peak area[c]				
			Aerobic condition			Anaerobic condition	
			10%	15%	20%	10%	15%
Others							
1961	1961	Benzothiazole	0.671	0.690	7.610	nd	nd
1997	1996	Phenol	nd	1.222	0.371	0.320	0.140

[a]Retention indicates calculated for DB-Wax column using *n*-alkanes as standards.
[b]Retention indicates for DB-Wax column were reported on web databases http://www.odour.org.uk/lriindex.html or http://webbook.nist.gov/
[c]Values represent the relative area under peak area of any compounds against that of internal standard (cyclohexanol)
nd, not detected or the difference in relative peak area between sample and blank was zero

ตารางที่ 4.6 ชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของสารระเหยให้กลิ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ anchovy medium (AM) ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเข้มข้นร้อยละ 1 และ 2 และมีแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 เจริญที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (10 และ 25%) ที่สภาวะที่มีออกซิเจน บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส, pH 7

RI[a]	RI[b]	Compounds	Relative peak area[c]			
			10% NaCl		25% NaCl	
			1% TN	2% TN	1% TN	2% TN
Alcohols						
1213	1206	3-Methyl-1-butanol	37.466	112.299	nd	nd
1349	1353	1-Hexanol	nd	1.213	nd	nd
1553	1565	1-Octanol	nd	8.987	nd	nd
1910	1903	Phenylethyl alcohol	117.857	122.607	nd	0.587
Aldehydes						
1282	1287	Octanal	nd	1.368	nd	nd
1379	1388	Nonanal	nd	1.856	nd	nd
1514	1515	Benzaldehyde	2.784	nd	nd	nd
Acids						
1569	1581	2-Methyl-propanoic acid	18.003	16.323	nd	nd
1666	1680	3-Methyl-butanoic acid	90.005	94.407	0.540	0.409
1859	1849	Hexanoic acid	nd	nd	0.730	nd
Sulpur-containing compounds						
1067	1065	Dimethyl disulfide	nd	3.179	nd	nd
1593	1593	1-(Methylthio)-3-pentanone	nd	nd	0.040	nd
1716	1715	3-(Methylthio)-1-propanol	nd	5.156	nd	nd
Nitrogen-containing compounds						
1264	1263	2-Methyl-pyrazine	nd	0.750	nd	nd
1319	1323	2,5-Dimethyl-pyrazine	42.202	29.769	0.068	nd
1325	1319	2,6-Dimethyl-pyrazine	nd	2.127	nd	nd
1384	1388	2-Ethyl-5-methyl-pyrazine	7.833	7.847	0.062	nd
1439	1455	3-Ethyl-2,5-dimethyl-pyrazine	17.294	72.660	nd	nd
1457	1455	2-Ethyl-3,5-dimethyl-pyrazine	7.781	17.228	nd	nd

ตารางที่ 4.6 ชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของสารระเหยให้กลิ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ anchovy medium (AM) ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเข้มข้นร้อยละ 1 และ 2 และมีแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 เจริญที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (10 และ 25%) ที่สภาวะที่มีออกซิเจน บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส, pH 7 (ต่อ)

RI[a]	RI[b]	Compounds	Relative peak area[c]			
			10% NaCl		25% NaCl	
			1% TN	2% TN	1% TN	2% TN
1472	1464	2-Methyl-5-propylpyrazine	3.800	7.326	nd	nd
1510	1497	3,5-Diethyl-2-methyl-pyrazine	nd	4.571	nd	nd
Ketones						
1149	1153	2,3-Heptanedione	nd	7.262	nd	nd
1283	1282	Cyclohexanone	nd	nd	nd	0.392
1593	1599	2-Undecanone	nd	2.204	nd	nd
Furans						
1453	1447	2-Furancarboxaldehyde	3.252	nd	nd	0.550
1656	1659	2-Furanmethanol	nd	nd	1.182	0.322
Other						
1997	1996	Phenol	nd	nd	0.404	0.404

[a]Retention indicates calculated for DB-Wax column using *n*-alkanes as standards.
[b]Retention indicates for DB-Wax column were reported on web databases http://www.odour.org.uk/lriindex.html or http://webbook.nist.gov/
[c]Values represent the relative area under peak area of any compounds against that of internal standard (cyclohexanol)
nd, not detected or the result of subtraction was negative.

.

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างโปรติเนสที่หลั่งออกภายนอกเซลล์ (extracellular proteinase) ของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37

จากวัตถุประสงค์ของการวิจัยมุ่งเน้นศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อสร้างสารระเหยให้กลิ่นในแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ซึ่งความสามารถในการสร้างสารระเหยให้กลิ่นอาจมีความสัมพันธ์กับการเจริญและความสามารถในการผลิตโปรติเนสที่หลั่งออกภายนอกเซลล์ เนื่องด้วยในงานวิจัยก่อนหน้า Lapsongphon, Cadwallader, Rodtong, & Yongsawatdigul (2013) ได้ศึกษาความสามารถในการสร้างสารระเหยให้กลิ่นของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ในระบบการหมักน้ำปลาระดับ laboratory scale ในสภาวะการหมักไม่ปลอดเชื้อ ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 15 และ 20% ระยะเวลาการหมัก 90 วัน บทสรุปที่ได้จึงสะท้อนความสามารถในการสร้างสารระเหยให้กลิ่นในสภาวะการหมักตามธรรมชาติ ณ สภาวะลดปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (reduced salt) ที่มีการแข่งขันหรือส่งเสริมการเจริญระหว่างกันของแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ในระบบการหมัก จึงยังคงมีข้อจำกัดในการอธิบายถึงความสามารถในการสร้างสารระเหยให้กลิ่นเฉพาะตัวของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ประกอบกับในการศึกษาระบบการหมักตามธรรมชาติมีข้อจำกัดเรื่องการควบคุมปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในส่วนของเหลว (drained liquid) ภายในระบบหมัก เนื่องจากปริมาณน้ำที่ใช้ในการละลายโซเดียมคลอไรด์อยู่ภายในตัวปลา ทำให้แม้ว่าเติมโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณไม่เท่ากัน ค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในของเหลวในระบบหมักจะมีค่าใกล้เคียงกัน

ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาการเจริญ การสร้างโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์ และความสามารถในการสร้างสารระเหยให้กลิ่นของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ในระบบอาหารเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อ โดยเลือกใช้ปลากะตักซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตน้ำปลาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้มีสภาวะการเจริญใกล้เคียงกับสภาวะการหมักตามธรรมชาติ ทำการเตรียมปลากะตักแห้ง นำมาผสมกับน้ำ และโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณที่กำหนด (10-27%) เรียกอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ว่า anchovy medium (AM) โดยกำหนดความเข้มข้นไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen content, TN) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 0.1, 1 และ 2% ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากผลการวิจัยเบื้องต้น (preliminary results) พบว่า ความเข้มข้นไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 0.1% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM เป็นค่าเหมาะสมต่อการเจริญ

และการสร้างโปรติเนสภายนอกเซลล์ของ *Virgibacillus* sp. SK37 และค่าที่ 2% TN เป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกับการหมักน้ำปลาในระยะเริ่มต้น

นอกจากนี้จากผลการวิจัยเบื้องต้น พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในรูปโปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denatured proteins) และโปรตีนที่ถูกย่อยสลาย (hydrolyzed proteins) มีผลต่อการเจริญและการสร้างโปรติเนสภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ซึ่งอาจมีผลต่อความสามารถในการสร้างสารระเหยให้กลิ่น งานวิจัยนี้จึงเตรียมปลากะตักแห้งย่อยด้วยกรดไฮดรอคลอริก (hydrochloric acid) เพื่อย่อยสลายให้โปรตีนในปลากะตักแห้งเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนอิสระ (free amino acids) นำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการเช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ AM เรียกอาหารชนิดนี้ว่า fish acid hydrolysate medium (FH) ดังนั้นแหล่งไนโตรเจนที่ศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้จึงมี 2 รูปแบบที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากันคือ รูปแบบโปรตีน (protein form) และรูปแบบกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid form)

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในปลากะตักแห้ง (ตารางที่ 4.1) แสดงให้เห็นว่าปลากระตักแห้งมีปริมาณ lysine, leucine, phenylalanine, histidine, glutamic acid, tyrosine, และ isoleucine สูง คิดเป็นร้อยละ 26.1, 10.4, 9.6, 9.2, 8.6, 7.3 และ 6.0 ตามลำดับ หากเปรียบเทียบกับชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในน้ำปลาหมักทางการค้า (commercial fish sauce) ที่ใช้ปลากะตักเป็นวัตถุดิบ พบว่าชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่พบในปริมาณสูงจะต่างชนิดจากปลากะตัก ตามรายงานของ Yongsawatdigul, Rodtong, & Raksakulthai (2007) พบว่า glutamic acid, lysine, aspartic acid, glycine และ threonine ในน้ำปลาหมักทางการค้ามีค่าร้อยละ 20.5, 10.3, 11.0, 6.2 และ 5.1 ตามลำดับ โดยกรดอะมิโนชนิด glutamic acid, aspartic acid และ threonine จัดเป็นสารประกอบที่ให้รสชาติ (taste-active components) ในน้ำปลา (Park, Watanabe, Endoh, Watanabe, & Abe, 2002) ซึ่งกรดอะมิโนทั้งสามชนิดนี้พบได้ในปริมาณสูงในน้ำปลาที่เติมแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 และหมักน้ำปลาเป็นระยะเวลา 4 เดือนเช่นเดียวกัน (Yongsawatdigul, Rodtong, & Raksakulthai, 2007) ทั้งนี้สาเหตุที่ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในปลากะตักและน้ำปลาหมักทางการค้ามีความแตกต่างกัน เนื่องจากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในน้ำปลาเป็นการวิเคราะห์สารในรูปของเหลวจากการหมัก (drained liquid) จึงเป็นผลรวมของกรดอะมิโนอิสระ/เปปไทด์ที่ละลายอยู่ในตัวปลากะตัก และกรดอะมิโนอิสระ/เปปไทด์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากโครงสร้างโปรตีนของปลากะตักจากกิจกรรมโปรติเนสภายในตัวปลาเอง (endogenous proteinase) และ/หรือโปรติเนสจากแบคทีเรียในระบบการหมัก ในขณะที่การรายงานค่าวิเคราะห์ในปลากะตักแห้งจะแสดงถึงแหล่งไนโตนเจนทั้งหมดในรูปละลายและไม่ละลายน้ำ (soluble and insoluble nitrogen) ดังนั้น จึงแสดงให้

เห็นว่าชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM (ตารางที่ 4.1) จึงไม่ใช่สารในรูปแบบ (form) ที่แบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถนำไปใช้ในการเจริญหรือสร้างสารระเหยให้กลิ่นได้ทันที

ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในปลากะตักแห้งดังกล่าว (ตารางที่ 4.1) จะสะท้อนชนิดและสัดส่วนกรดอะมิโนที่แบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถนำไปใช้ในการเจริญหรือสร้างสารระเหยให้กลิ่นได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ FH ซึ่งสามารถใช้ได้ทันที เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อ FH เตรียมจากปลากะตักแห้งที่ผ่านการย่อยสลายเป็นกรดอะมิโนอิสระแล้ว อย่างไรก็ตามสัดส่วนกรดอะมิโนแต่ละชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ FH อาจมีความคลาดเคลื่อนจากผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 4.1 ได้ เนื่องด้วยในระหว่างการย่อยปลากะตักแห้งด้วยกรดไฮดรอคลอริก glutamine และ asparagine อาจเกิดปฏิกิริยา deamination ได้เป็น glutamic acid และ aspartic acid ตามลำดับโครงสร้างของ threonine และ serine ไม่เสถียรภายใต้สภาวะการย่อยด้วยกรด (สูญเสียประมาณ 5-10%) และการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ methionine (Pickering & Newton, 1990)

5.1.1 ผลต่อการเจริญ

การศึกษาผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ สภาวะที่มีและไม่มีอากาศ และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 (ตารางที่ 4.2) ในงานวิจัยส่วนนี้ได้เลือกใช้ขวดแก้วปากขวดกว้าง (diameter 3.6 cm, height 3.5 cm) เพื่อความเพิ่มพื้นผิวสัมผัสกับออกซิเจนของอาหารเลี้ยงเชื้อและกำหนดให้สภาวะที่มีอากาศคือ สภาวะที่คลายเกลียวและตั้งขวดแก้วเลี้ยงเชื้อในตู้เพาะเชื้อ ในขณะที่สภาวะที่ไม่มีอากาศคือ สภาวะที่เลี้ยงเชื้อใน anaerobic jar ในตู้เพาะเชื้อ ทั้งนี้เพื่อควบคุมการสัมผัสกันระหว่างเซลล์แบคทีเรียและสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั้งสภาวะที่และไม่มีออกซิเจนในระดับที่เท่ากัน จึงหลีกเลี่ยงการเขย่าขณะเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีออกซิเจน

ผลจากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์มีผลทำให้การเจริญของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ลดลง ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4.2) โดยแบคทีเรียเจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 10% และการเจริญจะลดลงตามการเพิ่มขึ้นของโซเดียมคลอไรด์ อย่างไรก็ตามยังคงพบแบคทีเรียที่มีชีวิตที่ระดับโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นสูง (25-27%) ประมาณ ~3 logCFU/ml ผลดังกล่าวแสดงถึงคุณสมบัติของแบคทีเรียทนเค็ม (halotolerant bacteria) ซึ่งปกติแบคทีเรียทนเค็มจะเจริญได้ในช่วงความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่กว้าง (1-33%) หรืออาจเจริญได้สภาวะที่ไม่มีโซเดียม-คลอไรด์ก็ได้ (Siddikee, Chauhan, Anandham, Han, & Sa, 2010) Sinsuwan, Rodtong, & Yongsawatdigul (2008b) รายงานว่าแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK33 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับ *Virgibacillus* sp. SK37 พบการเพิ่มขึ้นของเซลล์ที่มีชีวิตจากจำนวนโคโลนีเริ่มต้น

(~4.8 logCFU/ml) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีออกซิเจนและโซเดียมคลอไรด์ 0-15% ในขณะที่ความเข้มข้นโซเดียม (20-25%) คงพบเซลล์ที่มีชีวิตแต่จำนวนโคโลนีต่ำกว่าจำนวนโคโลนีเริ่มต้น ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลที่พบในงานวิจัยนี้ Yongsawatdigul, Rodtong, & Raksakulthai (2007) พบว่าการเจริญของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ในการหมักน้ำปลาจะลดลงจากจำนวนโคโลนีเริ่มต้น (~5 logCFU/ml) เหลือประมาณ ~3 logCFU/ml เมื่อผ่านระยะเวลาการหมักไป 4 เดือน

ผลการศึกษาพบว่า แบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีกว่าสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4.2) เนื่องจากแบคทีเรียสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน จึงจัดอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobes จึงสันนิษฐานได้ว่าการเจริญของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ในการหมักน้ำปลาจะพบได้มากบริเวณผิวหน้าของการหมัก ซึ่งสังเกตได้จากการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ FH ณ สภาวะที่มีออกซิเจน จะพบความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณผิวหน้ามากกกว่าบริเวณด้านล่างของขวดแก้วเพาะเชื้อ

นอกจากนี้ผลการศึกษาพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ AM ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ได้มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ FH (ตารางที่ 4.2) แหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM ส่วนใหญ่อยู่ในรูปโปรตีนของปลากะตัก จึงเป็นสภาวะเทียบเคียงกับสภาวะเริ่มต้นการหมักน้ำปลา ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อ FH แหล่งไนโตรเจนคือกรดอะมิโนอิสระที่ย่อยสลายจากปลากะตัก ซึ่งมีสภาวะคล้ายกับช่วงท้ายของการหมักน้ำปลา แสดงให้เห็นว่าแนวทางการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ในการหมักน้ำปลา อาจพิจารณาใช้ในช่วงเริ่มต้นของการหมักเนื่องจากเป็นสภาวะที่แบคทีเรียเจริญและอาจมีบทบาทในการหมักได้มากกว่า ทั้งนี้สาเหตุแบคทีเรียเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโปรตีนเป็นแหล่งไนโตรเจน อาจเนื่องจาก *Virgibacillus* sp. SK37 เป็นแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการผลิตโปรติเนสทั้งโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์ (Sinsuwan, Rodtong, & Yongsawatdigul, 2007) และโปรติเนสที่จับบริเวณผิวของเซลล์ (cell-bound proteinase) (Sinsuwan, Rodtong, & Yongsawatdigul, 2012) ตามผลการวิจัยของ Lapsongphon, Cadwallader, Rodtong, & Yongsawatdigul (2013) พบว่า *Virgibacillus* sp. SK37 มีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนในระหว่างการหมักน้ำปลา ณ ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 15% ได้ดีในช่วง 30 วันแรกของการหมัก แต่ภายหลังจากนั้นการย่อยสลายโปรตีนจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ

จากผลการเจริญของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 (ตารางที่ 4.2) เป็นที่น่าสังเกตว่าการเจริญของแบคทีเรียมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของค่า pH โดยเมื่อตรวจพบจำนวน

แบคทีเรียเพิ่มขึ้น จะพบค่า pH เพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่หากไม่พบการเพิ่มขึ้นของจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต ค่า pH ภายหลังการบ่มจะใกล้เคียงกับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 จะผลิตสารประเภทด่างในระหว่างการเจริญ อาจเพราะแหล่งอาหารส่วนใหญ่ในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ โปรตีนหรือกรดอะมิโนอิสระ เมื่อแบคทีเรียย่อยสลายโปรตีนจะผลิตสารเมทา-บอไลท์ (metabolite) พวก ammonia ทำให้ค่า pH เพิ่มขึ้นตามการเจริญที่สูงขึ้น

5.1.2 ผลต่อการสร้างโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์

การศึกษาผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ สภาวะที่มีและไม่มีอากาศ และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 (ตารางที่ 4.2) ได้เลือกใช้สารตั้งต้นสังเคราะห์คือ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC เนื่องจากรายงานวิจัยของ Sinsuwan, Rodtong, & Yongsawatdigul (2007) พบว่าโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์ *Virgibacillus* sp. SK37 มีความจำเพาะเจาะจงกับสารตั้งต้นสังเคราะห์ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC จัดเป็นโปรติ- เนสที่มีความคล้ายคลึงกับ subtilisin (subtilisin-like) และสารตั้งต้นชนิดนี้มีความไวต่อกิจกรรมของโปรติเนสมากกว่าสารตั้งต้นประเภทโปรตีนถึงประมาณ 100 เท่า (Sinsuwan, Rodtong, & Yongsawatdigul, 2008a) จึงเหมาะสมต่อการตรวจวัดกิจกรรมโปรติเนสในงานวิจัยนี้

ผลจากการศึกษาพบว่า การเพิ่มขึ้นของโซเดียมคลอไรด์มีผลลดการสร้างโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 (ตารางที่ 4.2) เป็นที่น่าสังเกตว่าความสามารถในการผลิตโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียมีความสัมพันธ์กับการเจริญ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน โดยในสภาวะที่มีออกซิเจนหากปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่ำจะพบการเจริญและกิจกรรมโปรติเนสสูง สอดคล้องกับรายงานของ Sinsuwan, Rodtong, & Yongsawatdigul (2008b) พบว่าแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK33 เจริญและสร้างโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 5% และทั้งเจริญและสร้างโปรติ-เนสจะลดลงตามการเพิ่มขึ้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะที่ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ แม้ปริมาณโซเดียมคลอไรด์จะต่ำ (10%) ก็จะไม่พบกิจกรรมของโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์ อาจเป็นเพราะการเจริญของแบคทีเรียลดลง ณ สภาวะที่ไม่มีอากาศ

ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าสภาวะที่มีและไม่มีอากาศมีผลต่อสร้างโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 โดยสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญและสร้างโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย จากผลการวิจัยดังกล่าวจึงอาจอธิบายถึงสาเหตุว่า เหตุใดการหมักน้ำปลาจึงมีระยะเวลาการหมักที่นานกว่าผลิตภัณฑ์อาหารหมักชนิดอื่นๆ เพราะ

ปริมาณโซเดียมคลอไรด์สูงและสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน/หรือออกซิเจนปริมาณน้อยในถังหมักน้ำปลามีผลชะลอการเจริญและลดการสร้างโปรติเนสของแบคทีเรียในระหว่างการหมัก

จากผลการวิจัยพบว่า แบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 สร้างโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ FH (ตารางที่ 4.2) สังเกตได้จากในอาหารเลี้ยงเชื้อ FH ที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% พบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อ AM แต่กลับพบว่าค่ากิจกรรมโปรติเนสต่ำกว่าเท่าตัว (ตารางที่ 4.2) แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนอิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลในการลดความสามารถในการสร้างโปรติเนสของแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 ลง Kumar & Takagi (1999) กล่าวว่าการสังเคราะห์เอนไซม์ในจุลินทรีย์อาจลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนที่เมทาบอไซส์ง่าย เช่น กรดอะมิโน ทั้งนี้อาจเนื่องจาก global transcriptional regulator CodY ซึ่งพบในจีโนมของ *Virgibacillus* sp. SK37 โดยมีรายงานว่า CodY จะถูกกระตุ้นโดยกรดอะมิโนที่โครงสร้างมีกิ่ง (branced-chain amino acid) ได้แก่ isoleucine, leucine, และ valine ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้อยู่ในรูปแบบ active CodY มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ permease ที่ทำหน้าที่นำกรดอะมิโนบางชนิดเข้าสู่เซลล์ และยับยั้งการสังเคราะห์โปรติเนสที่หลั่งออกภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย (Belitsky, 2015; Barbieri, Voigt, Albrecht, Hecker, Albertini, Soeneshein, et al., 2015; Barbieri, Albertini, Ferrari, Sonenshein, & Belitsky, 2016) ดังนั้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อ FH ที่มีปริมาณ isoleucine, leucine, และ valine จึงอาจมีผลกระตุ้นการทำงานของ CodY ของแบคทีเรียทนเค็มสาย-พันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 และยับยั้งการผลิตโปรติเนสได้

5.1.3 ผลของปริมาณไนโตรเจน

จากผลการทดลองข้างต้น (ตารางที่ 4.2) สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและอาหารเลี้ยงเชื้อ FH จึงไม่ถูกเลือกศึกษาต่อในการศึกษาผลของปริมาณไนโตรเจนต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH การเจริญ และการสร้างโปรติเนสที่หลั่งออกภายนอกเซลล์ เนื่องจากเป็นสภาวะที่ไม่ส่งเสริมการเจริญและการสร้างโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37

ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณไนโตรเจนมีผลส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4.3) สอดคล้องรายงานของ Sinsuwan, Jangchud, Rodtong, Roytrakul, & Yongsawatdigul (2015) พบว่าการใช้ปลากะตักแห้งเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 ได้ดีขึ้น ($P < 0.05$) แต่เมื่อตรวจวัดกิจกรรมของโปรติเนสที่หลั่งออกภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 กลับว่ามีค่าลดลง เมื่อปริมาณไนโตรเจนของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4.3) สอดคล้องกับผลวิจัยของ Lapsongphon, Rodtong, & Yongsawatdigul (2013) พบว่าการเพิ่ม

ปริมาณกากยีสต์ (yeast sludge) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (0.5-5%) มีผลในการเพิ่มระยะเวลา lag phase ของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ขึ้น ดังนั้น จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญและการสร้างโปรติเนสหลั่งออกภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37

5.2 การศึกษาชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของสารระเหยให้กลิ่นที่ผลิตจากแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37

5.2.1 การผลิตสารระเหยให้กลิ่นในกลุ่มอัลกอฮอล์

การศึกษาชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของสารระเหยให้กลิ่นที่ผลิตจากแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM และ FH ที่ปริมาณไนโตรเจนเข้มข้น 0.1% ณ ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (10-27%) พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ AM ในสภาวะที่มีออกซิเจนพบสารระเหยให้กลิ่นในกลุ่ม alcohols ปริมาณมากที่สุดคือ phenylethyl alcohol โดยปริมาณลดลงตามการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (ตารางที่ 4.4) แสดงให้เห็นว่าการสร้าง phenylethyl alcohol มีความสัมพันธ์กับการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 นอกจากนี้ยังพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ FH ที่มีออกซิเจนพบปริมาณการสร้าง phenylethyl alcohol สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ AM ประมาณ 9 เท่า (ตารางที่ 4.5) อาจเกี่ยวข้องกับกรดอะมิโนอิสระ L-phenylalanine ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (Etschmann, Bluemke, Sell, & Schrader, 2002) ที่พบปริมาณสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อ FH มีรายงานว่า phenylethyl alcohol เป็นสารประกอบให้กลิ่น (aroma compounds) ที่สำคัญในถั่วเหลือง (Lee & Shibamoto, 2000) ให้กลิ่น rose-like odor ซึ่งเป็นกลิ่นที่สำคัญใน Korean soy sauce (Steinhaus, & Schieberle, 2007) Giri, Osako, Okamoto, & Ohshima (2010) รายงานว่าพบ phenylethyl alcohol ในน้ำปลาโดยให้ลักษณะกลิ่น honey, rose, lilac, spicy และมีค่า threshold คือ 564.2 μg/l

1-butanol พบในปริมาณน้อยที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์สูง (ตารางที่ 4.4) 1-butanol เป็นสารให้กลิ่นฉุน (fragrant, solvent, pungent odor) ซึ่งตรวจพบใน fish miso, น้ำปลา และ soy sauce (Giri, Osako, Okamoto, & Ohshima, 2010) และพบในน้ำปลาที่เติมแบคทีเรียสายพันธุ์ *Staphylococcus* sp. (Udomsil, Rodtong, Tanasupawat, & Yongsawatdigul, 2015) นอกจากนี้ยังตรวจพบในน้ำปลาที่หมักด้วยปลากะตักที่เติมแบคทีเรียสายพันธุ์ *Tetragenococcus halophilus* เป็นระยะเวลา 6 เดือน พื้นที่ใต้กราฟสัมพันธ์ (กับ cyclohexanol) ที่พบ อยู่ในช่วง 0.027-0.029 (Udomsil, Rodtong, Choi, Hua, & Yongsawatdigul, 2011) ซึ่งต่ำกว่าปริมาณที่ตรวจพบในการศึกษานี้ กลไกการสร้าง 1-butanol ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์สูง อาจเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของ

เอนไซม์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ที่ทำงานได้ดีที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์สูง แต่อย่างไรก็ตามบทบาทของ 1-butanol ต่อกลิ่นรสของน้ำปลาอาจมีไม่มากนัก เนื่องจากค่า odor threshold ที่ค่อนข้างสูง (Michihata, Yano, & Enomoto, 2002) Giri, Osako, Okamoto, & Ohshima (2010) รายงานค่า odor threshold ของ 1-butanol คือ 459.2 μg/l

1-octanol และ 1-hexanol พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM และ FH ในปริมาณน้อย (ตารางที่ 4.4) ซึ่งรายงานว่า 1-octanol และ 1-hexanol พบในน้ำปลาทางการค้าแต่ในปริมาณต่ำ ซึ่งสารทั้งสองให้กลิ่น herbaceous, fatty, green และ geen, grassy, fatty, leafy ตามลำดับ (Giri, Osako, Okamoto, & Ohshima, 2010) แม้ว่าแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 มีศักยภาพผลิตสารระเหยให้กลิ่นในกลุ่ม alcohols ได้ แต่บทบาทของสารระเหยให้กลิ่นในกลุ่ม alcohols ต่อการยอมรับโดยรวม (overall acceptance) ในผลิตภัณฑ์น้ำปลายังไม่มีรายงานที่แน่ชัดหรืออาจไม่มีผลต่อกลิ่นน้ำปลาอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องชัดจากการศึกษาพบว่าค่า odor threshold ของสารระเหยให้กลิ่นกลุ่มนี้มีค่าค่อนข้างสูง (Michihata, Yano, & Enomoto, 2002)

นอกจากนี้ผลการวิจัยพบว่าปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (อาหารเลี้ยงเชื้อ FH) (ตารางที่ 4.5) และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 4.6) มีผลต่อการสร้าง 3-methyl butanol โดยมีรายงานว่า 3-methyl butanol เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน leucine ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (precursor) โดยกระบวนการ transamination pathway ได้ผลิตภัณฑ์คือ α-keto isocaproic acid จากนั้นจึงเปลี่ยนแปลงต่อได้เป็น 3-methyl butanal และ 3-methyl-butanol โดยปฏิกิริยา decarboxytion และ reduction ตามลำดับ โดยกิจกรรมของแบคทีเรีย (Smit, Engels, & Smit, 2009) อย่างไรก็ตามกลไกการสร้าง 3-methyl butanol ในแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ยังไม่มีการศึกษามาก่อน แต่สันนิษฐานได้ว่าแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 มีเอนไซม์ในกลุ่ม intracellular exoproteinase ที่สามารถปลดปล่อยกรดอะมิโน leucine ให้เป็นอิสระจากโครงสร้างเปปไทด์ (peptide) ได้ และมีระบบทรานสปอร์ตเตอร์หรือระบบขนส่งกรดอะมิโน leucine ที่เป็นอิสระภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อเกิดการสร้างสารระเหยให้กลิ่นดังกล่าวได้ Giri, Osako, Okamoto, & Ohshima (2010) รายงานว่า 3-methyl butanol จัดเป็นสารประกอบให้กลิ่นที่สำคัญ (primary oder-active compounds) ในน้ำปลา โดยให้ลักษณะกลิ่น racid, pungent, balsamic และเป็นสารที่มีค่า odor threshold ต่ำ (4.0 μg/l)

5.2.2 การผลิตสารระเหยให้กลิ่นในกลุ่มอัลดีไฮด์

สารระเหยให้กลิ่นในกลุ่มอัลดีไฮด์จัดเป็นสารที่มีความสำคัญในผลิตภัณฑ์อาหารเนื่องจากค่า odor threshold มีค่าต่ำ (Giri, Osako, Okamoto, & Ohshima, 2010) แบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์

Virgibacillus sp. SK37 ผลิตสาร benzaldehyde ได้ในปริมาณสูงโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 10 และ 15% (ตารางที่ 4.4 และ 4.5) benzaldehyde เป็นสารประกอบ aromatic มีรายงานว่าพบในน้ำปลาที่เติมแบคทีเรียสายพันธุ์ *Tetragenococcus halophilus* ในปริมาณสูง มีรายงานว่าสาร benzaldehyde เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาสเทรคเกอร์ (strecker degradation) ของกรดอะมิโน phenylalanine (Udomsil, Rodtong, Tanasupawat, & Yongsawatdigul, 2010) สาร benzaldehyde มีค่า threshold คือ 750.9 μg/l ให้กลิ่น bitter almond, woody, burnt (Giri, Osako, Okamoto, & Ohshima, 2010) Giri, Osako, Okamoto, & Ohshima (2010) รายงานว่าน้ำปลาเกรดพรีเมียมจะพบ benzaldehyde ในปริมาณที่สูงกว่าน้ำปลาทั่วไป Groot & de Bont (1998) ระบุว่าแบคทีเรียสามารถผลิต benzaldehyde จากกรดอะมิโน phenylalanine ได้หลากหลายวิถีเมทา-บอลิก โดย *Lactobacillus plantarum* สามารถเปลี่ยน phenylalanine เป็น phyenylpyruvic acid โดยกิจกรรมของ aminotransferase หลังจากนั้นจึงเปลี่ยนต่อเป็น benzaldehyde ได้โดยลำดับ MØller, Hinrichsen, & Andersen (1998) พบว่าในเนื้อหมักเกลือ (cured meat) พบสารระเหยให้กลิ่น benzaldehyde ได้จากกิจกรรมของจุลินทรีย์โดยใช้ phenylalanine เป็นสารตั้งต้น (precursor) Andersen & Hinrichsen (1995) ระบุว่า benzaldehyde ให้กลิ่น almond like odor ในเบคอน แม้ว่าบทบาทของสาร benzaldehyde ในกลิ่นรสของน้ำปลายังไม่มีการระบุอย่างชัดเจน ผลจากการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถสร้างสาร benzaldehyde ได้ ซึ่งจัดผลิตสารระเหยให้กลิ่นที่ดี (desirable flavor) ในอาหาร ทั้งแหล่งไนโตรเจนที่เป็นโปรตีนและกรดอะมิโนอิสระ

นอกจากนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถผลิต nonanal ได้ที่ความเข้มเข้นโซเดียมคลอไรด์ต่ำ (10-15%) (ตารางที่ 4.4, 4.5) Giri, Osako, Okamoto, & Ohshima (2010) รายงานว่าพบ nonanal ในน้ำปลา โดย nonanal ให้กลิ่นลักษณะ green, tallow, fatty, lavender และมีค่า threshold ต่ำคือ 1.1 μg/l

5.2.3 การผลิตสารระเหยให้กลิ่นในกลุ่มกรด

แบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถผลิตสารระเหยให้กลิ่นในกลุ่ม acids คือ 2-methyl-propanoic acid, 3-methy-butanoic acid, และ 2-methyl-butanoic acid โดยการสร้างสารระเหยให้กลิ่นดังกล่าวจะพบปริมาณสูงขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ FH (เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ AM) (ตารางที่ 4.5) และมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูงขึ้น (ตารางที่ 4.6) แสดงให้เห็นว่าปริมาณกรดอะมิโนอิสระหรือความเข้มข้นของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิตสารระเหยให้กลิ่นในกลุ่ม acids ดังกล่าว โดยมีรายงานว่า 2-methyl-propanoic acid, 3-methy-butanoic acid และ 2-

methyl-butanoic acid เกิดจากสารตั้งต้นคือ valine, leucine และ isoleucine ตามลำดับ โดยมีสารเมทาบอไลต์ตัวกลาง (transient metabolite) คือ 2-methylpropanal, 3-methylbutanal/2-methylpropanal และ 2-methylbutanal ตามลำดับ ที่เกิดปฏิกิริยา oxidation ทำการเปลี่ยน aldehyde เป็น acids (Smit, Smit, & Engels, 2005; Smit, Engels, & Smit, 2009) เนื่องจากสารระเหยให้กลิ่นกลุ่ม aldehyde ถูกเปลี่ยนเป็นกลุ่มอัลกอฮอล์หรือกรดได้ง่าย (McSweeney & Sousa, 2000) จึงอาจเป็นเหตุผลว่าเหตุใดจึงไม่พบสารระเหยให้กลิ่นในกลุ่ม aldehyde ดังกล่าว Lapsongphon, Cadwallader, Rodtong, & Yongsawatdigul (2013) รายงานว่าการหมักน้ำปลาที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 15-20% ด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 เป็นเวลา 3 เดือน พบสาร 2-methylpropanal, 3-methylbutanal และ 2-methylbutanal ปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม มีรายงานว่า 2-methylpropanal, 3-methylbutanal และ 2-methylbutanal เป็นสารที่ให้กลิ่น meaty, malty, dark chocolate ในน้ำปลาและที่มีความสำคัญต่อคุณลักษณะด้านกลิ่นในน้ำปลา (Peralta, Shimoda, & Osajima, 1996; Fukami, Ishiyama, Yaguramaki, Masuzawa, Nabeta, Endo, et al., 2002; Lapsongphon, Cadwallader, Rodtong, & Yongsawatdigul, 2013) เนื่องจากมีค่า odor threshold ต่ำ (ประมาณ 0.15-1.5 μg/l) (Giri, Osako, Okamoto, & Ohshima, 2010) Lapsongphon, Cadwallader, Rodtong, & Yongsawatdigul (2013) และ Lapsongphon, Yongsawatdigul, & Cadwallader (2015) ระบุว่า 2-methyl-propanoic acid และ 3-methy-butanoic acid ให้กลิ่น chessy/Swiss cheese และ chessy/sweaty ตามลำดับ จัดเป็นสารประกอบที่ให้กลิ่น (odor-active compounds) ในน้ำปลาโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค aroma extract dilution analysis (AEDA) Shimoda, Peralta, & Osajima, (1996) พบว่า 2-methyl-propanoic acid เป็นสารสำคัญที่ให้กลิ่น cheesy และ stinging odor ในน้ำปลา โดยพิจารณาจากปริมาณและค่า odor threshold ในขณะที่ Giri, Osako, Okamoto, & Ohshima (2010) รายงานว่า 2-methyl-butanoic acid จัดเป็นสารประกอบที่ให้กลิ่น (odor-active compounds) ในน้ำปลาเช่นกัน โดยให้กลิ่น cheesy แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 มีศักยภาพผลิตสารระเหยให้กลิ่นที่เป็นสารประกอบที่ให้กลิ่น (odor-active compounds) ในน้ำปลาได้โดยเฉพาะสภาวะที่มีออกซิเจนและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูง

นอกจากนี้ยังพบสาร propanoic acid ในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 10% (ตารางที่ 4.4) สอดคล้องกับรายงานของ Lapsongphon, Cadwallader, Rodtong, & Yongsawatdigul (2013) พบว่าแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถผลิต propanoic acid ได้ ซึ่งสาร propanoic acid จัดเป็นสารประกอบที่ให้กลิ่น (odor-active

compounds) ในน้ำปลาโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค aroma extract dilution analysis (AEDA) โดย propanoic acid ให้กลิ่น chessy/sweaty Lapsongphon, Yongsawatdigul, & Cadwallader (2015) ระบุว่าสาร propanoic acid เป็นสารให้กลิ่น cheesy/fecal จัดเป็นสารหลัก (predominant odorants) ในน้ำปลาทางการค้า Wichaphon, Thongthai, Assavanig, & Lertsiri (2011) รายงานว่า propanoic acid ให้คุณลักษณะกลิ่นของน้ำปลา เป็นที่น่าสังเกตว่า propanoic acid ไม่พบในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน อาจเนื่องจากแบคทีเรียเจริญได้ไม่ดีที่สภาวะดังกล่าว สอดคล้องกับรายงานของ Sanceda, Suzuki, & Kurata, (2001) พบว่าปริมาณกรดในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนลดลงตามระยะเวลาการหมักน้ำปลา แต่ปริมาณกรดเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาการหมักน้ำปลาในสภาวะที่มีออกซิเจน

5.2.4 การผลิตสารระเหยให้กลิ่นในกลุ่มสารประกอบที่มีซัลเฟอร์

ผลการศึกษาพบว่า ประกอบในกลุ่ม sulfur-containing compounds พบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณไนโตรเจนเข้มข้น 2% และโซเดียมคลอไรด์ 10% คือ dimethyl disulfide (ตารางที่ 4.6) สาร dimethyl disulfide อาจเกิดจากกระบวนการสลาย (catabolism) ของกรดอะมิโนชนิด methionine โดยกระบวนการ transamination ซึ่งกระบวนการ demethiolation ของ methionine ทำให้ได้ methanethiol จากนั้นจะเกิดการออกซิเดชันกลายเป็น dimethyl sulfide, dimethyl disulfide และ dimethyl trisulfide (Bonnarme, Psoni, & Spinnler, 2000) สารประกอบซัลเฟอร์เหล่านี้จัดเป็นสารที่มีศักยภาพให้กลิ่น (potent odorants) เนื่องจากมีค่า odor threshold ต่ำ (Devos, Patte, Roualt, Laffort, & Gemert, 1995) Giri, Osako, Okamoto, & Ohshima (2010) รายงานค่า odor threshold ของ dimethyl disulfide คือ 1.1 μg/l โดยมีรายงานว่าเป็นสารประกอบให้กลิ่น fecal note ซึ่งเป็นกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์ในน้ำปลา (Fukami, Funatsu, Kawasaki, & Watabe, 2004) Giri, Osako, Okamoto, & Ohshima (2010) รายงานว่า dimethyl disulfide ลักษณะกลิ่น cooked cabbage, onion จากผลการศึกษาเป็นที่น่าสังเกตว่าแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ณ ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่ำ (10%) สามารถผลิต dimethyl disulfide ได้เฉพาะสภาวะที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูง (2%) เท่านั้น เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM ที่ปริมาณไนโตรเจนเข้มข้น 0.1% (ตารางที่ 4.4) และ 1% (ตารางที่ 4.6) ไม่พบ dimethyl disulfide แสดงให้เห็นว่าการเจริญที่ดีและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลส่งเสริมการสร้างประกอบ dimethyl disulfide ของแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 อย่างไรก็ตามไม่พบการสร้าง dimethyl disulfide ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์สูง (25%)

3-(methylthio)-1-propanol พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ FH (ตารางที่ 4.5) และอาหารเลี้ยงเชื้อ AM ที่ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเข้มข้น 2% (ตารางที่ 4.6) Song, Jeong, & Baik (2015) รายงานว่า 3-

(methylthiol)-1-propanol พบใน Korean soy sauce โดยให้กลิ่น potato, grassy ขณะที่ Giri, Osako, Okamoto, & Ohshima (2010) รายงานว่า 3-(methylthio)-1-propanol ให้กลิ่น raw potato, garlic, vegetable มีค่า odor threshold ค่อนข้างสูง (856.1 μg/l) Lapsongphon, Cadwallader, Rodtong, & Yongsawatdigul (2013) พบว่าแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถผลิต 3-(methylthiol)-1-propanol ณ ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 15% ได้ ในขณะที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 20% ไม่พบสารดังกล่าว โดยมีค่า odor threshold คือ 250 μg/kg

5.2.5 การผลิตสารระเหยให้กลิ่นในกลุ่มสารประกอบที่มีไนโตรเจน

2,5-dimethyl-pyrazine เป็นสารที่พบในปริมาณมากที่สุดในกลุ่ม nitrogen-containing compounds โดยพบมากในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM และ FH ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 10-15% (ตารางที่ 4.4, 4.5) และปริมาณสารลดลงเมื่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.6) สารระเหยให้กลิ่นกลุ่ม nitrogen-containing compounds ที่สร้างโดยแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ได้แก่ 2-methyl-pyrazine, 2-ethyl-5-methyl-pyrazine, 2-ethyl-3,5-dimethyl-pyrazine, 2-methyl-5-propylpyrazine, 2,3-dimethyl-pyrazine, 2,6-dimethyl-pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl-pyrazine และ 3,5-diethyl-2-methyl-pyrazine Giri, Osako, Okamoto, & Ohshima (2010) รายงานว่าสาร 2,3-dimethyl-pyrazine ให้กลิ่น green nutty, coffee, caramel odors ในขณะที่ 2,6-dimethyl-pyrazine ให้กลิ่น roasted nuts, fried potato ในน้ำปลา ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถสร้างสารระเหยให้กลิ่นที่มี pyrazine ได้ในปริมาณมาก อย่างไรก็ตาม Giri, Osako, Okamoto, & Ohshima (2010) พบว่าสาร 2,3-dimethyl-pyrazine เป็นสารที่มีค่า odor threshold สูง (2225.3 μg/l) จึงอาจไม่มีบทบาทสำคัญต่อคุณลักษณะกลิ่นในน้ำปลาโดยรวม เช่นเดียวการศึกษาโดย omission study พบว่าสารกลุ่ม pyrazine คือ 3,6-dimethyl-2-ethyl-pyrazine มีผลต่อการยอมรับโดยรวมน้อย เนื่องจากค่า odor-activity value (OVA) ของสาร 3,6-dimethyl-2-ethyl-pyrazine มีค่าต่ำ (Lapsongphon, Yongsawatdigul, & Cadwallader, 2015)

สรุปผลการวิจัย

อาหารเลี้ยงเชื้อ anchovy medium (AM) และ fish acid hydrolysate medium (FH) ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์สูงและไม่มีออกซิเจนมีผลต่อการลดการเจริญ การผลิตโปรติเนสหลั่งออกนอกเซลล์ และการสร้างสารระเหยให้กลิ่นของแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ในขณะที่ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ AM มีผลส่งเสริมการเจริญ แต่ยับยั้งการผลิตโปรติเนสหลั่งออกนอกเซลล์

ผลของความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์และสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนต่อการสร้างสารระเหยให้กลิ่น พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตชนิดและปริมาณของสารระเหยให้กลิ่นได้สูงที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่ำ ณ สภาวะที่มีอากาศ โดยสารระเหยให้กลิ่นที่พบปริมาณสูงได้แก่ 2,5-dimethyl-pyrazine, benzaldehyde, phenylethyl alcohol, 3-methyl-1-butanol, 2-methlbutanoic acid, และ 3-(methylthio)-1-propanol ในขณะที่ภายใต้สภาวะความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์สูงและไม่มีอากาศ ไม่พบสารระเหยให้กลิ่นที่แบคทีเรียสามารถสร้างได้ โดยพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ AM พบชนิดและปริมาณสร้างสารระเหยให้กลิ่นสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ FH ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อชนิดและปริมาณของสารระเหยให้กลิ่นที่ผลิตได้โดยพบว่า dimethyl disulfide, 3-methyl-1-butanol, pyrazines, 3-methylbutanoic acid, 3-(methylthio)-1-propanol และ phenylethyl alcohol มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น

ดังนั้นผลจากการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า สภาวะแวดล้อม (ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ สภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ชนิดของแหล่งไนโตรเจน และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด) มีผลต่อการเจริญ การผลิตโปรติเนสหลั่งออกนอกเซลล์ และการสร้างสารระเหยให้กลิ่นของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 มีศักยภาพในการผลิตสารระเหยให้กลิ่นที่สำคัญในน้ำปลาได้

ข้อเสนอแนะ

แบคทีเรียทนเค็มสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 มีศักยภาพในการผลิตชนิดสารระเหยให้กลิ่นสำคัญที่ตรวจพบในน้ำปลาทางการค้าได้ โดยการเจริญ การผลิตโปรติเนสหลั่งออกนอกเซลล์ และการสร้างสารระเหยให้กลิ่นของแบคทีเรียพบได้สูงในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ต่ำ (10-15%) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งโปรตีนสูง ดังนั้นจึงอาจเป็นแนวทางการประยุกต์ใช้แบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 ในการหมักน้ำปลา ณ สภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ต่ำ เพื่อลดระยะเวลาการหมักน้ำปลาให้สั้นลงและได้ผลิตภัณฑ์น้ำปลาที่ปริมาณโซเดียมลดต่ำลง

บรรณานุกรม

ไทยรัฐออนไลน์ (2556) “น้ำปลาไทยขวัญใจชาวมะกัน”(ออนไลน์) ค้นคืนวันที่ 4 พฤศจิกายน 2557 จาก http://www.thairath.co.th/content/383495

นิทยา บุญทิม (2003) “น้ำปลา (fish sauce)” (ออนไลน์) ค้นคืนวันที่ 4 พฤศจิกายน 2557 จาก http://www.ist.cmu.ac.th/riseat/nl/2003/06/04.php

บังอร บุญชู, และ ยุทธภูมิ สัมพันธารักษ์ (2555) วศ. ร่วมผลักดันวิธีทดสอบน้ำปลาไทยสู่มาตรฐานโคเด็กซ์. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ, *60*, 6-8.

ผู้จัดการออนไลน์ (2554) “ได้ฤกษ์ขึ้นทะเบียนน้ำปลา “มรดกทางปัญญา” เครื่องปรุงคลาสสิกคู่ครัวไทย” (ออนไลน์) ค้นคืนวันที่ 4 พฤศจิกายน 2557 จาก http://www.manager.co.th/Daily/ViewNews.aspx?NewsID=9540000063910

Akolkar, A.V., Durai, D., & Desai, A.J. (2009). *Halobacterium* sp. SP1(1) as a starter culture for accelerating fish sauce fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, *109*, 44-53.

Andersen, H.J., & Hinrichsen, L.L. (1995). Changes in curing agents, microbial counts and volatile compounds during processing of green bacon using two different production technologies. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 68,* 477–487.

Ayad, E.H.E., Verheul, A., Wouters, J.T.M., & Smit, G. (2000). Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making. *International Dairy Journal, 10,* 169-179.

Barbieri, G., Albertini, A.M., Ferrari, E., Sonenshein, A.L., & Belitsky, B.R. (2016). Interplay of CodY and ScoC in the regulation of major extracellular protease genes of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology, 198,* 907-920.

Barbieri, G., Voigt, B., Albrecht, D., Hecker, M., Albertini, A.M., Soeneshein, A., Ferari, E., & Belitsky, B.R., (2015). CodY regulates expression of the *Bacillus subtilis* extracellular proteases Vpr and Mpr, *Journal of Bacteriology, 197,* 1423-1432.

Belitsky, B.R., (2015). Role of branched-chain amino acid transport in *Bacillus subtilis* CodY activity. *Journal of Bacteriology, 197,* 1330-1338.

Brandsma, J.B., van de Kraats, I., Abee, T., Zwietering, M.H., & Meijer, W.C. (2012). Arginine metabolism in sugar deprived *Lactococcus lactis* enhances survival and cellular activity, while supporting flavour production. *Food Microbiology, 29,* 27-32.

Chaiyanan, S., Chiyanan, S., Maugel, T., Huq, A., Robb, F.T., & 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.

Chuon, M.R., Shiomoto, M., Koyanagi, T., Sasaki, T., Michihata, T., Chan, S., Mao, S., & Enomoto, T. (2013). Microbial and chemical properties of Cambodian tranditional fermented fish products. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 94,* 1124–1131.

Bonnarme, P., Psoni, L., & Spinnler, .HE. (2000). Diversity of L-methionine catabolism pathways in cheese-ripening bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *66,* 5514–5517.

Devos, M., Patte, F., Roualt, J., Laffort, P., & Gemert, L.J. (1995). Standardized human olfactory thresholds. *J. Odor Res. Eng., 26,* 27– 47.

Etschmann, M., Bluemke, W., Sell, D., & Schrader, J. (2002). Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology, 59,* 1-8.

Fukami, K., Ishiyama, S., Yaguramaki, H., Masuzawa, T., Nabeta, Y., Endo, K., & Shimoda, M. (2002). Identification of distinctive volatile compounds in fish sauce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*, 5412–5416.

Fukami, K., Funatsu, Y., Kawasaki, K., & 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,* FMS45-FMS49.

Fukui, Y., Yoshida, M., Shozen, K.-I., Funatsu, Y., Takano, T., Oikawa, H., Yano, Y., & Satomi, M. (2012). Bacterial communities in fish sauce mash using culture-dependent and –independent methods. *Journal of General and Applied Microbiology, 58,* 273-281.

Giri, A., Osako, K., Okamoto, A., & Ohshima, T. (2010). Olfactometric characterization of aroma active compounds in fermented fish paste in comparison with fish sauce,

fermented soy paste and sauce product. *Food Research International, 43*, 1027-1040.

Groot, M.N.N., & de Bont, J.A.M. (1998). Conversion of phenylalanine to benzaldehyde initiated by an aminotransferase in *Lactobacillus plantarum, Applied and Environmental Microbiology, 64,* 3009-3013.

Hiraga, K., Nishikata, Y., Namwong, S., Tanasupawat, S., Takada, K., & Oda, K. (2005). Purification and characterization of serine proteinase from a halophilic bacterium, *Filobacillus* sp. RF2-5. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 69,* 38-44.

Hoben, H. J. & Somasegaran, P. (1982). Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of rhizobium spp. in inoculants made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology, 44,* 1246-1247.

Kasankal, L., Xiong, Y.L., & Chen, J. (2012). Enzymatic activity and flavor compound production in fermented silver carp fish paste inoculated with douche starter culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60*, 226-233.

Kumar, C.G., & Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances, 17,* 561-594.

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. . *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61,* 6604-6613.

Lapsongphon, N., Rodtong, S., & Yongsawatdigul, J. (2013). Spent brewery yeast sludge as a single nitrogen sources for fibrinolytic enzyme production of *Virgibacillus* sp. SK37. *Food Science and Biotechnology, 22,* 71-78.

Lapsongphon, N., Yongsawatdigul, J., & Cadwallader, K. R. (2015). Identification and characterization of the aroma-impact components of Thai fish sauce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63,* 2628-2638.

Lee, K.G., & Shibamoto, T. (2000). Antioxidant properties of aroma compounds isolated from soybeans and mung beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48,* 4290-4293

Lopetcharat, K., Choi, Y.J, Park, J.W., & Daeschel, M.A. (2001). Fish sauce products and manufacturing: A review. *Food Reviews International, 17,* 65-88.

McSweeney, P.L.H. & Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheese during ripening: A review. *Lait*, *80*, 293-324.

Michihata, T., Yano, T., & Enomoto, T. (2002). Volatile compounds of headspace gas in the Japanese fish sauce *ishiru. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 66,* 2251-2255.

MØller, J.K.S., Hinrichsen, L.L., & Andersen, H.J. (1998). Formation of amino acid (L-leucine and L-phenylalanine) derived volatile flavour compounds by *Moraxella phenylpyruvica* and *Staphylococcus xylosus* in cured meat model systems. *International Journal of Food Microbiology,* 42, 101–117.

Montaya, D., Boylston, T.D., & Mendonca, A. (2009). Preliminary screening of *Bifidobacteria* spp. and *Pediococcus acidilactici* in a Swiss cheese curd slurry model system: Impact on micriobial viability and flavor characteristics. *International Dairy Journal, 19,* 605-611.

Namwong, S., Hiraga, K., Takada, K., Tsunemi, M., Tanasupawat, S., & Oda, K. (2006). A halophilic serine proteinase from *Halobacillus* sp. SR5-3 isolated from fish sauce: purification and characterization. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 70*, 1395-1401.

Park, J.N, Watanabe, T., Endoh, K.I., Watanabe, K., & Abe, H. (2002). Taste active components in a Vietnamese fish sauce. *Fisheries Science*

Peralta, RR, Shimoda, M., & Osajima, Y. (1996). Further identification of volatile compounds in fish sauce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44*, 3606-3610.

Peralta,R.R., Shimoda, M., & Osajima, Y. (1997). Comparison of headspace volatiles of Philippine fish sauce. *Food Science and Technology International, 3,* 49-52.

Pham et al. (2008). Characterization of Fish Sauce Aroma-Impact Compounds Using GC-MS, SPME-Osme-GCO, and Stevens' Power Law Exponents. J. Food Sci. 73, 268-274.

Pickering, M.V., & Newton, P. (1990). Amino acid hydrolysis: old problems, new solutions. *LC-GC*, *8,* 778-780.

Rijnen, L., Yvon, M., van Kranenburg, R., Courtin, P., Verheul, A., Chambellon, E., & Smit, G. (2003). Lactococcal aminotransferases AraT and BcaT are key enzymes for the formation of aroma compounds from amino acids in cheese. *International Dairy Journal, 13,* 805-812.

Sanceda, N.G., Suzuki, E., & Kurata, T. (2001). Development of normal and branched chain volatile fatty acids during the fermentation process in the manufacture of fish sauce. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 81,* 1013–1018.

Shimoda, M., Peralta, R., & Osajima, Y. (1996). Headspace gas analysis of fish sauce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44,* 3601-3605.

Siddikee, M.A., Chauhan, P.S., Anandham, R., Han, G.-H., & Sa, T. (2010). Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coastal soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology, 20*, 1577-1584.

Sinsuwan, S., Rodtong, S., & Yongsawatdigul, J. (2007). NaCl-activated extracellular proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 isolated from fish sauce fermentation. *Journal of Food Science, 72,* C264-C269.

Sinsuwan, S., Rodtong, S., & Yongsawatdigul, J. (2008a). Characterization of Ca^{2+}-activated cell-bound proteinase from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. *LWT-Food Science and Technology, 41,* 2166-2174.

Sinsuwan, S., Rodtong, S., & Yongsawatdigul, J. (2008b). 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., & 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.

Siringan, P., Raksakulthai, N., & Yongsawatdigul, J. (2006). Autolytic activity and biochemical characteristics of endogeneous proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *Food Chemistry, 98,* 678-684.

Sinsuwan, S., Jangchud, A., Rodtong, S., Roytrakul, S., Yongsawatdigul, J. (2015). Statistical optimization of the production of NaCl-tolerant proteases by a moderate halophile, *Virgibacillus* sp. SK37. *Food Technology and Biotechnology*, *53*, 136–145.

Smit, B.A., Engels, W.J.M., & Smit, G. (2009). Branched chain aldehydes: production and breakdown pathways and relevance for flavour in foods. *Applied microbiology and biotechnology, 81,* 987–999.

Smit, G., Smit, B.A., & Engels, W.J.M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews, 29,* 591-610.

Smit, G., Verheul, A., van Kranenburg, R., Ayad, E., Siezen, R., & Engels, W. (2000). Cheese flavour development by enzymatic conversions of peptides and amino acids. *Food Research International, 33,* 153-160.

Song, Y.-R., Jeong, D.-Y., & Baik, S.-H. (2015). Monitoring of yeast communities and volatile flavor changes during traditional Korean soy sauce fermentation. *Journal of Food Science, 80*, M2005–M2014.

Steinhaus, P. & Schieberle, P. (2007). Characterization of the key aromacompounds in soy sauce using approaches of molecular sensory science. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*, 6262–6269

Tanasupawat, S., Namwong, S., Kudo, T., & Itoh, T. (2009). Identification of halophilic bacteria from fish sauce (nam-pla) in Thailand. *Journal of Culture Collections, 6,* 69-75.

Tanasupawat, S., Pakdeeto, A., Namwong, S., Thawai, C., Kudo, T., and Itoh, T. (2006). *Lantibacillus halophilus* sp. nov., from fish sauce in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56,* 1859-1863.

Tapingkae, W., Tanasupawat, S., Itoh, T., Parkin, K.L., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Valyasevi, R. (2008). *Natrinema gari* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from fish sauce in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58*, 2378-2383.

Toyokawa, Y., Takahara, H., Reungsang, A., Fukuta, M., Hachimine, Y., Tachibana, S., & Yasuda, M. (2010). Purification and characterization of a halotolerant serine proteinase from thermotolerant *Bacillus licheniformis* RKK-04 isolated from Thai fish sauce. *Applied Microbiology and Biotechnology, 86,* 1867-1875.

Uchida, H., Kondo, D., Yamashita, S., Tanaka, T., Tran, L.H., Nagano, H., & Uwajima, T. (2004). Purification and properties of a protease produced by *Bacillus subtilis* CN2 isolated from a Vietnamese fish sauce. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 20,* 579-582.

Uchida, M., OU, J., Chen, B.-I., Yuan, C.-H., Zhang, X.-H., Chen, S.-S., Funatsu, Y., Kawasaki, K.-I., Satomi, M., & Fukuda, Y. (2005). Effect of soy sauce koji and lactic acid bacteria on fermentation of fish sauce from freshwater silver carp *Hypophthalmichtyls molitrix*. *Fisheries Science, 71,* 422-430.

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.

Udomsil, N., Rodtong, S., Tanasupawat, S., & Yongsawatdigul, J. (2015). Improvement of fish sauce quality by strain CMC5-3-1: A novel species of *Staphylococcus* sp. *Journal of Food Science, 80,* M2015-M2022.

Udomsil, N., Rodtong, S., Choi, Y.J., Hua, Y., & Yongsawatdigul, J. (2011). Use of *Tetragenococcus halophilus* as a starter culture for flavor improvement in fish sauce fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59,* 8401-8408.

Urbach, G. (1995). Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *International Dairy Journal, 5,* 877-903.

Wichaphon, J., Thongthai, C., Assavanig, A., & Lertsiri, S. (2011). Volatile aroma components of Thai fish sauce in relation to product categorization. *Flavour and Fragrance Journal. 27,* 149-156.

Yongsawatdigul, J., Rodtong, S., & Raksakulthai, N. (2007). Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter culture. *Journal of Food Science, 72,* M382-M390.

Yvon, M., & Rijnen, L. (2001). Cheese flavor formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal, 11,* 185-201.