บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การย่อยสลายตัวเองของปลากะตัก

3.1.1 วัสดุและสารเคมี

ตัวอย่างปลากะตัก (*Stolephorus* spp.) สด ซึ่งมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 2.60±0.45 กรัม และมีความยาวประมาณ 7.60±0.32 เซนติเมตร ขนส่งจากอ่าวไทยโดยเก็บปลาในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งภายใน 6 ชั่วโมงหลังการจับ จากนั้นเปลี่ยนถ่ายน้ำแข็งและขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมาทันที

สารเคมีจากบริษัท Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.) ได้แก่ 2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), bovine serum albumin (BSA), dimethyl sulfoxide (DMSO), Brij 35, leucine และ L-leucyl-4-nitroaniline (4-NA) สารเคมีจากบริษัท Bachem AG (Bubendorf,Switzerland) ได้แก่ Boc-Asp (oBzl)-Pro-Arg-AMC, succinyl (Suc)-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC, Z-Phe-Arg-AMC และสารเคมีอื่นๆ ที่ใช้ในการวิจัยเป็นคุณภาพที่ใช้ในงานวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการ (Analytical grade)

3.1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายตัวเองของปลากะตัก

ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์และอุณหภูมิต่อการย่อยสลายตัวเองของปลากะตัก (Autolysis) เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายตัวเองได้สูงสุดโดยไม่เกิดการเน่าเสีย นำปลากะตักสด 400 กรัม เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0, 5, 10 และ 15 % บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 35, 50 และ65 องศาเซลเซียส ติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณโอลิโกเพปไทด์ในรูปของปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α-Amino group) และกิจกรรมโปรติเนสจากปลา สุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ที่ 0, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96 และ120 ชั่วโมง

3.1.3 วิเคราะห์ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α-Amino group)

ผสมตัวอย่างกับสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acetic, TCA) เข้มข้น 5% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ในอัตราส่วน 1:9 (โดยน้ำหนัก) เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 8,000×g (Legend™ MACH 1.6/R, Thermo Electron LED GmbH, Lengensellbold, Germany) ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และกรองสารละลายส่วนใสด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (Whatman International Ltd., Oxfordshire, UK) นำสารละลายส่วนใส (Supernatant) ไปวิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเพปไทด์โดยทำปฏิกิริยากับ 2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic

acid (TNBS) ตามวิธีของ Adler-Nissen (1979) โดยใช้ลูซีน (Leucine) เป็นสารมาตรฐาน ดูดตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร เจือจางด้วยสารละลายโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (SDS) เข้มข้น 1% หรือน้ำปราศจากอิออน (Deionized water) เติมสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 0.2125 โมลาร์ ที่ pH 8.2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติม TNBS เข้มข้น 0.05% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทันที เพื่อหยุดปฏิกิริยา เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (SmartSpec™ Plus, Bio-Rad Laboratories, CA., U.S.A.) แสดงค่าการย่อยสลายของโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักในหน่วยมิลลิโมล/กรัมตัวอย่างของกลุ่มอะมิโนแอลฟาเทียบกับลูซีน

3.1.4 การวิเคราะห์กิจกรรมโปรติเนส

สกัดเอนไซม์จากตัวปลา (Crude proteinase) โดยนำตัวอย่างปลากะตักปั่นผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl (pH 7.0) ที่แช่เย็นเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1:9 ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000×g (Legend™ MACH 1.6/R, Thermo Electron LED GmbH, Lengensellbold, Germany) ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และกรองสารละลายส่วนใสด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บสารละลายส่วนใสสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมโปรติเนสโดยดัดแปลงตามวิธีของ Siringan et al. (2006a) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์คล้ายทริปซิน (Trypsine-like) โดยในสารผสม 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วยสารตั้งต้น Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl (pH 8.5) เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร และเอนไซม์สกัดที่เจือจางอย่างเหมาะสม ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารผสมบิวทานอล เมธานอล และน้ำกลั่นปราศจากอิออน ในสัดส่วน 30: 35: 35 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร วัดค่าความเข้มของการเรืองแสง (Fluorescence intensity) ด้วยเครื่อง Spectrofluorometer (RF-1501, Shimazu Co., Kyoto, Japan) ที่ค่าความยาวคลื่นกระตุ้น (Excitation wavelength) 380 นาโนเมตร และความยาวคลื่นของการคายพลังงาน (Emission wavelength) 460 นาโนเมตร กำหนดให้หน่วยกิจกรรม (Unit) คือ นาโนโมลของ AMC ต่อนาที แสดงค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) ในหน่วยกิจกรรม (Unit) ต่อกรัมตัวอย่าง

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์คล้ายไคโมทริปซิน (Chymotrypsine-like) ใช้สารตั้งต้น Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC เข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ (Tris-HCl (pH 9.0) เข้มข้น 0.2 โมลาร์ และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร

และเอนไซม์สกัดที่เจือจางอย่างเหมาะสม ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และวิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) ในหน่วยกิจกรรม (Unit) ต่อกรัมตัวอย่าง ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์คล้ายคาเธพซิน-แอล (Cathepsin L-like) โดยสารละลายผสมประกอบด้วย สารตั้งต้นสังเคราะห์ Z-Phe-Arg-AMC เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์ (0.2 M Tris-HCl (pH 9), 4 mM EDTA, 8 mM DTT, pH 5.5) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร และเอนไซม์สกัดที่เจือจางอย่างเหมาะสม ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร วิเคราะห์กิจกรรมที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที กำหนดให้หนึ่งหน่วยกิจกรรม (Unit) คือ นาโนโมลของ AMC ต่อนาที และแสดงค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) ในหน่วยกิจกรรม (Unit) ต่อกรัมตัวอย่าง ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ลูซีนอะมิโนเพปติเดส (Leucine aminopeptidase) โดยในสารผสม 1 มิลลิลิตร ใช้สารตั้งต้น L-Leucine-*p*-nitroaniline (pNA) เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl (pH 8.0) เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 0.85 มิลลิลิตร และเอนไซม์สกัด ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 80% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 402 นาโนเมตร กำหนดให้หน่วยกิจกรรม (Unit) คือ นาโนโมลของ pNA ต่อนาที แสดงค่ากิจกรรมจำเพาะในหน่วยกิจกรรม (Unit) ต่อกรัมตัวอย่าง

3.1.5 วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการทดลองสองซ้ำโดยทุกการทดลองวัดอย่างน้อย 2-3 replication วางแผนการทดลองแบบ Split-split plot design in Randomized Completely Block Design (RCBD) โดยกำหนดให้โซเดียมคลอไรด์เป็นพล็อตหลัก (Main plot) อุณหภูมิเป็นพล็อตย่อย (Sub plot) และเวลาเป็นพล็อตย่อยของพล็อตย่อย (Sub-sub plot) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS for Windows (Version 14.0; SPSS Inc., Chicago, IL., U.S.A.) ที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.05$

3.2 การระบุชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา และการใช้ประโยชน์กล้าเชื้อในการหมักน้ำปลา

3.2.1 การเตรียมไอโซเลทในอาหาร Fish broth

คัดแยกไอโซเลทของแบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria) จากกระบวนการหมักน้ำปลาในช่วง 1-12 เดือน โดยใช้ De Man, Rogosa, และ Sharpe (MRS) agar ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์

เข้มข้น 5 และ 15% และ MRS agar มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์ 5 หรือ 15% และแคลเซียม-คาร์บอเนตเข้มข้น 0.5% โดยใช้เทคนิค Spread plate บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน โดยใช้ Anaerobic chamber (SHEL LAB, Sheldon Manufacturing Inc., IA., U.S.A.) คัดแยก 2 ไอโซเลท ที่ทดสอบแล้วว่ามีศักยภาพในการสร้างโปรติเนส ได้แก่ ไอโซเลท MS33 และ MCD10-5-10

เลี้ยงไอโซเลทในอาหาร Fish broth ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% เตรียมอาหาร Fish broth ตามวิธีของ Yongsawatdigul et al. (2007) โดยใช้ปลากะตัก (*Stolephorus* spp.) 1 ส่วนผสมกับน้ำกลั่น 2 ส่วน ต้มให้เดือด เป็นเวลา 20 นาที กรองส่วนผสมด้วยผ้าขาวบาง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใส ที่ 8,000×g (Centrifuge 5415C, Eppendoft, Hamburg, Germany) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้กรองผ่านผ้าขาวบางอีกครั้ง และปรับระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็น 25% ปรับ pH เป็น 7.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบตามที่กำหนด นำ Fish broth ที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ถ่ายไอโซเลทบริสุทธิ์จำนวน 5 มิลลิลิตร จากอาหาร MRS broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^5-10^6 CFU/มิลลิลิตร ลงในอาหาร Fish broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในสัดส่วน 2% นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน วัดการเจริญของแบคทีเรียโดยใช้ MRS agar ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 และ15% และแคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5% โดยใช้เทคนิค Spread plate บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน

<u>3.2.2 การระบุชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติก</u>

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ สมบัติทางชีวเคมีและการสร้างแก๊สจากการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ตาม Holt et al. (1994)

ก. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของเซลล์

ศึกษาลักษณะ รูปร่าง การเรียงตัว และการติดสีย้อมแกรมของเซลล์แบคทีเรีย โดยเตรียม Smear ของแบคทีเรียที่มีอายุ 48 ชั่วโมง ที่เจริญบน MRS agar ตรึงเซลล์ให้ติดแผ่นแก้วสไลด์ด้วยความร้อน หยดสี Crystal violet (ภาคผนวก ก2) ให้ท่วมรอย Smear เป็นเวลา 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำเบาๆ หยด Gram's iodine (ภาคผนวก ก4) เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยแอลกอฮอล์ (95%) หรือ Acetone alcohol (ภาคผนวก ก1) จนไม่มีสีม่วงของ Crystal violet ออกมา แต่ไม่ควรเกิน 20 วินาที ล้างด้วยน้ำทันที ย้อมทับด้วยสี Safranin (ภาคผนวก ก5) เป็นเวลา 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ ทิ้งให้แห้ง ตรวจดูรูปร่าง โครงสร้างการเรียงตัวของเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope, Olympus, Olympus Optical Co., Ltd., Japan)

ข. การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี

ทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดเลือก โดยเตรียมแบคทีเรียบริสุทธิ์อายุ 48 ชั่วโมง ที่เจริญบน MRS agar และทดสอบสมบัติทางชีวเคมีดังนี้

(1) การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase)

วางแผ่นกระดาษกรอง Whatman No. 4 ลงในจานเลี้ยงเชื้อเปล่าที่สะอาด หยดสารละลาย Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (1%) (ภาคผนวก ก6) ลงบนกระดาษกรอง ใช้ลูป (Loop) เขี่ยแบคทีเรียบริสุทธิ์ป้ายลงบนกระดาษกรองที่เปียกสารละลายสำหรับทดสอบ ตรวจดูการเปลี่ยนสีของเชื้อที่ป้ายบนกระดาษกรอง ซึ่งถ้าเป็นผลบวกของการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส เชื้อที่ป้ายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มภายใน 1 นาที

(2) การสร้างเอนไซม์คะตาเลส (Catalase) .

ใช้ลูปเขี่ยแบคทีเรียบริสุทธิ์ป้ายบนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลาย Hydrogen peroxide (3%) (ภาคผนวก ก3) ลงบนเชื้อที่ป้ายไว้ ตรวจดูการเกิดฟองแก๊ส ซึ่งเป็นผลบวกของการสร้างเอนไซม์คะตาเลส

(3) การทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเนส (Proteinase) อะไมเลส (Amylase) และไลเปส (Lipase)

ทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเนส อะไมเลส และไลเปส โดยใช้อาหาร MRS agar ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 หรือ 10 % ที่เติม Skim milk, Soluble starch และ Tween 80 ตามลำดับ ในระดับความเข้มข้น 1% โดย Point inoculation เชื้อลงบนผิวหน้าอาหารที่บรรจุในจานเลี้ยงเชื้อ ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้เชื้อเจริญในสภาพที่ไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจผลการสร้างโปรติเนสโดยตรวจดูบริเวณใสรอบโคโลนี (Clear zone) ตรวจผลการสร้างอะไมเลสโดยหยดสารละลายไอโอดีนบนโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร ตรวจดูบริเวณใสรอบโคโลนี (ควรอ่านผลภายใน 2 นาที) และตรวจผลการสร้างไลเปสจากการเกิดตะกอนขุ่นขาวของเกลือแคลเซียมของกรดไขมันรอบโคโลนี

ค. การทดสอบการสร้างแก๊สจากการหมักน้ำตาล

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์อายุ 48 ชั่วโมง ที่เจริญบน MRS agar ลงในอาหาร MRS broth (ภาคผนวก ข7) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 10% และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5% ที่บรรจุหลอดดักแก๊ส บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน ตรวจสอบการสร้างแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดดักแก๊ส

ง. การทดสอบปัจจัยทางเคมีและกายภาพที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย

ปัจจัยทางเคมีและกายภาพที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทดสอบเพื่อช่วยจัดจำแนกและระบุชนิดของแบคทีเรีย มีดังนี้

(1) ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์

ศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญ โดยเตรียมแบคทีเรีย อายุ 3 วัน ที่เจริญใน MRS broth (ภาคผนวก ข7) ถ่ายเชื้อลงใน MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 3, 6.5, 10, 15, 18, 20 และ 25% ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2% ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 1-7 วัน ตรวจดูการเจริญของแบคทีเรียโดยตรวจนับเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมเกลือโซเดียม-คลอไรด์เข้มข้น 5 และ 10% และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5% บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน

(2) อุณหภูมิ

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ โดยใช้อาหาร MRS broth (ภาคผนวก ข7) ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 10% ตามที่แต่ละไอโซเลทที่คัดเลือกเจริญได้ดี ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการศึกษาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 10, 15, 25, 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน ตรวจดูการเจริญของแบคทีเรีย

(3) ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ศึกษาผลของ pH ต่อการเจริญ โดยใช้อาหาร MRS broth (ภาคผนวก ข7) ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 10% ตามที่แต่ละไอโซเลทที่คัดเลือกเจริญได้ดี ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 และ 9.0 ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการศึกษาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน ตรวจดูการเจริญของแบคทีเรีย

จ. *การวิเคราะห์ Stereoisomer กรดแล็กติก*

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกในอาหาร MRS broth ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000×g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สารละลายส่วนใสที่ได้นำไปกรองผ่านเยื่อกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร และเจือจางเป็น 100 เท่า ด้วยน้ำปราศจากอิออน (Deionized water) แยกกรดแล็กติกในรูปดีและรูปแอลโดยใช้เครื่อง HPLC (Water2487, Waters Inc., Midford, MA., U.S.A.) ที่ต่อกับคอลัมน์ Chiral Astec CLC-L column (5 ไมโครเมตร, 4.6 มิลลิเมตร × 15

เซนติเมตร, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., U.S.A.) ชะด้วยสารละลาย Mobile phase ($CuSO_4$ เข้มข้น 0.005 โมลาร์) ด้วย Isocratic ที่อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดแบคทีเรียแล็กติก ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (Manome et al., 1998)

ฉ. การวิเคราะห์สารพันธุกรรมของแบคทีเรีย

วิเคราะห์สารพันธุกรรมในส่วนของ 16S rRNA gene ตามขั้นตอนดังนี้

(1) การสกัด Genomic DNA จากเซลล์แบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร MRS broth ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน เก็บเกี่ยวเซลล์ในช่วงปลายของระยะ Log phase นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000×g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (Multispeed refrigerated centrifuge PK121R, ALC, Princeton, NJ., U.S.A.) และล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-ethylene-diamine เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 8.0) และล้างเซลล์อีกครั้งด้วยสารละลายไลซิสบัฟเฟอร์ (Lysis buffer, pH 8.0) ซึ่งประกอบด้วยซูโครสเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ EDTA เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 480 ไมโครลิตร จากนั้นเติมไลโซไซม์ (Lysozyme) เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 60 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (SDS) เข้มข้น 20% ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ บ่มที่ 65 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเติมสารละลาย RNase เข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 4 ไมโคร-ลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำสารผสมไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,500×g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (Multispeed refrigerated centrifuge PK121R, ALC, Princeton, NJ., U.S.A.) เก็บส่วนใส จากนั้นเติมสารละลายไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ลงในสารละลายส่วนใส ตกตะกอน DNA ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,500×g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (Multispeed refrigerated centrifuge PK121R, ALC, Princeton, NJ., U.S.A.) แล้วเติมเอทานอลเข้มข้น 70% ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,500×g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทเอทานอลทิ้ง จากนั้นทำแห้ง DNA ที่อุณหภูมิ 37 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-ethylenediamine เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 8.0) และบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Vassu et al., 2002) ตรวจหา Genomic DNA ที่สกัดได้ด้วย Agarose gel electrophoresis โดยใช้อะกาโรสเข้มข้น 0.9% (Low EEO Agarose, BIO 101, Inc., La Jolla, CA., U.S.A.) ในสารละลาย Tris-Borate buffer (TBE) (ภาคผนวก ก7) และใช้ 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ life technologies, Rockville, MD., U.S.A.) เป็นสารมาตรฐาน (DNA Molecular

weight markers) แยกชิ้นของ DNA ตามขนาดด้วยค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลท์ ตรวจหาตำแหน่งของแถบ DNA โดยย้อม Agarose gel ด้วย Ethidium bromide (1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 15 นาที และตรวจดูการเรืองแสงของแถบ DNA ด้วย UV Transilluminator และเก็บ DNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

(2) การเพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene

เพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ด้วย Primers fD1 และ rP2 (ตารางที่ 3.1) เพื่อเพิ่มจำนวนของ DNA fragment ขนาดประมาณ 1,500 bp ของ 16S rRNA gene (Weisburg et al., 1991) โดยเตรียมส่วนผสม (PCR reaction mixture) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM KCl; Invitrogen™ Life Technologies, Foster, CA., U.S.A.) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แม็กนีเซี่ยมคลอไรด์เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร Nucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Promega) ความเข้มข้นชนิดละ 2 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร Primer (fD1 และ rP2; Sigma Proligo, Helios, Singapore) ความเข้มข้น 10 พิโคโมล ปริมาตร 2 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™ life technologies, Foster, CA., U.S.A.) เข้มข้น 5 หน่วย ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ Genomic DNA เข้มข้น 10-150 นาโนกรัม ปริมาตร 4 ไมโครลิตร และใช้กระบวนการเพิ่มปริมาณ DNA ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Thermal Cycler (Thermo electron corporation Px2 Thermal Cycler, U.S.A.) จำนวน 35 รอบ โดยตั้งค่าอุณหภูมิและเวลาตามลำดับดังนี้ (1) Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที (2) รอบที่ 1-35 โดยแต่ละรอบประกอบด้วย Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และ (3) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจหาผลผลิต PCR ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วย Agarose gel electrophoresis โดยใช้ Agarose (BIO 101, Inc., La Jolla, CA., U.S.A.) เข้มข้น 1 % ในสารละลาย TBE ใช้ 1 Kb Plus DNA Ladder (Fermentas life sciences, EU) เป็น DNA Molecular weight markers แยกชิ้นของ DNA และตรวจหาตำแหน่งของ DNA ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการตรวจหา Genomic DNA ดังรายละเอียดข้างต้น

(3) การต่อชิ้นของ DNA เข้ากับ Plasmid vector และการเพิ่มจำนวน (Clone) Vectorใน *E. coli* DH5α

ทำบริสุทธิ์ DNA โดยแยกชิ้น DNA ด้วย Agarose gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้นของอะกาโรส 1% ตัดชิ้นส่วนของ Agarose gel ที่มี DNA ภายใต้แสง UV โดยใช้ Wizard Gel/ PCR Product Purified kit (Promega, Promega corporation, Madison, WI., U.S.A) จากนั้นทำการ

เชื่อมต่อ (ligation) ชิ้นส่วนของ DNA เข้ากับ pGEM-T Easy Vector (Promega, Promega corporation, **Madison**, WI., U.S.A) ด้วยสารละลายผสมที่ประกอบด้วย 2X Rapid ligation buffer (Promega) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร pGEM-T Easy Vector (50 นาโนกรัม) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผลผลิต PCR 3 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase (3 Units) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำสารละลายผสมบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน และเก็บสารละลายผสม ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำเข้า *E. coli* DH5α

ตารางที่ 3.1 Universal primers สำหรับเพิ่มจำนวน 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction

Primer	Primer sequence (5′ to 3′)	Target region	Reference
16S rRNA gene Amplification			
fD1	5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′	8-27	Weisburg et al. (1991)
rP2	5′-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3′	1490-1511	Weisburg et al. (1991)
Nucleotide sequencing			
T7	5′-TAATACGACTCACTATAG GG -3′	53-72	Hans et al. (2002)
SP6	5′-TAATACGAC TCACTATAG GG -3′	2896-2916	Hans et al. (2002)
Forward	5′-TAACTACGTGCCAGCAGCC-3′	515-533	Design from nucleotide sequencing results of this research project
Reverse	5′-CGACAACCATGCACCACCTG-3′	1008-1027	Design from nucleotide sequencing results of this research project

(3.1) การเตรียม Competent cell

โดยดัดแปลงวิธีจาก Sambrook and Russell (2001) ซึ่งมีวิธีการเตรียมดังนี้ เลี้ยง *E. coli* DH5α ใน Luria-Bertani broth (LB borth) (ภาคผนวก ข2) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200×g เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 100 ไมโครลิตร ลงใน LB

broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 3 ชม. (ให้ได้ค่า $O.D._{600}$ = 0.4) ถ่ายเชื้อลงในหลอด Polypropylene tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่แช่เย็น ปั่นเหวี่ยงที่ 4,000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (RC 28S; Sorvall Co., Newtown, Conn., U.S.A.) เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์สองครั้งด้วยน้ำปราศจากอิออน (Deionized water) ที่แช่เย็น 30 มิลลิลิตร จากนั้นล้างเซลล์สองครั้งด้วยสารละลายกลีเซอรอลเข้มข้น 10% ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 4,000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (RC 28S; Sorvall Co., Newtown, Conn., U.S.A.) เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ GYT (ภาคผนวก ข1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดขึ้น-ลง แบ่ง Competent cell 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด Centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แช่แข็งในไนโตรเจนเหลวทันทีแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

(3.2) การนำ Vector เข้าใน *E. coli* DH5α (Transformation)

นำ Competent cell มาละลายในน้ำแข็งโดยใช้เวลาประมาณ 3-5 นาที เติม Vector ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร บ่มในน้ำแข็งประมาณ 15 นาที จากนั้นถ่าย Competent cell ลงใน Cuvett ขนาด 100 ไมโครลิตร จ่ายกระแสไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง Electroporator (Electroporator 2510, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) ที่ตั้งค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,800 โวลท์ ถ่าย Competent cell ลงใน LB broth ปริมาตร 450 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 45 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (RC 28S; Sorvall Co., Newtown, Conn., U.S.A.) เทส่วนใสทิ้งบางส่วนเพื่อให้เหลือส่วนใสในหลอด Centrifuge ประมาณ 100 ไมโครลิตร จากนั้น Spread เชื้อลงบน LB agar ที่เติม Ampicillin เข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal) เข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเลือกเก็บโคโลนีที่มีสีขาวโดย Streak บน LB agar (ภาคผนวก ข3) ที่เติม Ampicillin ความเข้มข้น 100 มิลิกรัม/มิลลิลิตร ทำบริสุทธิ์ Plasmid เพื่อตรวจสอบผลการเชื่อมต่อ (Ligation) โดยใช้ Wizard DNA Purified kit (Promega) จากนั้นตัด DNA fragment ออกจาก Plasmid vector ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ตรวจสอบ DNA fragment และ plasmid โดยใช้ Agarose gel electro-phoresis เข้มข้น 2% โดยใช้ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas life sciences, EU) เป็น DNA Molecular weight markers

(4) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S RNA gene

หาลำดับนิวคลิโอไทด์ของ 16S rRNA gene ที่เชื่อมอยู่กับ pGEM-T Easy Vector โดยใช้ Primer T7/SP6 (ตารางที่ 3.1), Terminator Ready Reaction kit version 2.0 (Perkin

Elmer, Applied Biosystems, Inc., Torrance, CA., U.S.A.) และ ABI3730xl DNA analyzer (Model 373, Foster, CA., U.S.A.) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรีย ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล Nueleotide sequence database ของ GenBank หรือ National Center for Biotechnological Information (NCBI) ประเทศสหรัฐอเมริกา (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast /Blast.cgi) โดยใช้ Blast version 2.2.9 program และตรวจสอบเพื่อให้ได้ Alignment ของ DNA sequence ที่เหมาะสมด้วย BioEdit Program (North Carolina State University, U.S.A.) และสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum Parsimony โดยใช้ MEGA version 4.0 (Kumar et al., 2004)

3.2.3 การวิเคราะห์สารระเหยในอาหาร Fish broth ด้วยวิธี Purge and trap

ถ่ายไอโซเลทที่แยกได้บนอาหาร MRS broth agar ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% และแคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5% บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาพไร้ออกซิเจน จำนวน 1 ลูป ลงในอาหาร Fish broth ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000×g (Legend™ MACH 1.6/R, Thermo Electron LED GmbH, Lengensellbold, Germany) ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สารละลายส่วนใสที่แยกได้นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของสารระเหยด้วยวิธี Purge and trap (Texmar velocity XPT™, Teledyne Tekmar, Mason, OH., U.S.A.) ควบคู่กับการแยกสารและระบุชนิดของสารด้วยเทคนิค Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) ใช้ตัวอย่างในอาหาร Fish broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม Cyclohexanol ซึ่งเป็นสารมาตรฐานภายใน (Internal standard) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ Purge ตัวอย่าง คือ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ภายใต้ก๊าซฮีเลียมเป็นเวลา 20 นาที ในอัตราการไหลของตัวอย่าง 40 มิลลิลิตร/นาที สารระเหยจะถูกดักจับด้วยใช้คอลัมน์ Tenax TA และทำให้ระเหยออก (Desorbed) ที่ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที แยกสารระเหยโดยใช้ Gas chromatography-mass spectrometry (Varian Inc., Walnut Creek, CA., U.S.A.) ต่อกับ Capillary column (DB-WAX, 60 เมตร×0.25 มิลลิเมตร×0.25 ไมโครเมตร Agilent Technologies, Redwood, CA., U.S.A.) ตั้งค่าการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ (Oven temperature) จาก 25 จนถึง 250 องศาเซลเซียส ในอัตราการไหล 15 องศาเซลเซียส/นาที ระบุสารระเหยโดยใช้ Quadrupole mass detector (Mass spectrometer 1200L quadrupole, Varian Inc., Walnut Creek, CA., U.S.A.) วิเคราะห์มวลสารด้วย Ionization energy ที่ 70 eV คำนวณปริมาณสารระเหยเชิงสัมพัทธ์จากพื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่างต่อพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานภายใน (Cyclohexanol) คำนวณค่า Kovats Index และเปรียบเทียบ Mass spectra กับฐานข้อมูลของ National Institute of Standards:NIST data (Shimoda et al., 1996)

3.2.4 การใช้แบคทีเรียกรดแล็กติกในการหมักน้ำปลา

ก. การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมเชื้อแบคทีเรียสำหรับหมักน้ำปลาโดยถ่ายไอโซเลท MS33 และ MCD10-5-10 ประมาณ 1 ลูป ลงในอาหาร Fish broth (pH 7.0) ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 25% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 7 วัน จำนวนแบคทีเรียก่อนนำไปใช้มีค่าเท่ากับ 10^5 - 10^6 CFU/มิลลิลิตร

ข.การเตรียมวัตถุดิบและการหมักน้ำปลาด้วยเอนไซม์ทางการค้าร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก

ชั่งตัวอย่างปลากะตักสด 1 กิโลกรัม ใส่โหลแก้วที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.7 เซนติเมตร และสูง 17 เซนติเมตร ให้ความร้อนตัวอย่างจนอุณหภูมิจุดศูนย์กลางของขวดแก้วอยู่ที่ 65 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase 2.4L) ในระดับ 0.25% บ่มต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นลดอุณหภูมิของตัวอย่างลงที่ 50 องศาเซลเซียส แล้วเติมเอนไซม์เฟโวไซม์ (Flavouzyme 500L) ในระดับ 0.5% บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมเกลือสมุทร 25% ปล่อยให้อุณหภูมิของตัวอย่างลดลงจนถึง 35 องศาเซลเซียส เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก (ที่เตรียมตามวิธีข้างต้น) ในปริมาณ 10% ของตัวอย่าง เตรียมตัวอย่างควบคุมเหมือนข้างต้น ยกเว้นเติม Fish broth ในระดับ 10% แทนการเติมกล้าเชื้อเริ่มต้น เตรียมตัวอย่าง 2 ซ้ำ บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่าง 10 กรัมต่อครั้ง ในวันที่ 0, 14, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 เพื่อนับจำนวนจุลินทรีย์ ตรวจวิเคราะห์ค่า pH โดยใช้เครื่อง pH meter (Mettler-Toledo MP220, Schwerzenbach, Switzerland) ตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มแอลฟากรดอะมิโน (α-Amino group) ตามวิธีของ Adler-Nissen (1979) ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 18% คือ Plate count agar (PCA) JCM 168 และ MRS agar ที่เติมแคลเซียม-คาร์บอเนตเข้มข้น 0.5% อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ JCM 168 บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส ในสภาวะมีออกซิเจน เป็นเวลา 7-10 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 7-10 วันหลังบ่มตัวอย่างจนครบ 6 เดือน กรองตัวอย่างน้ำปลาเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มแอลฟา-อะมิโนตามวิธีของ Adler-Nissen (1979) โดยใช้ลูซีนเป็นสารมาตรฐาน ดังระบุในหัวข้อ 3.1.3 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และปริมาณแอมโมนิคอลไนโตรเจนตามวิธี AOAC (2000) วิเคราะห์ปริมาณเกลือด้วยหลักการ Volhard ตามวิธี AOAC (2000) วิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนโดยเครื่อง HPLC (Eerola et al., 1993) วัดสีโดยเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3 แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (GBC UV/VIS 916; GBC Scientific Equipment PTY, Ltd., Australia) และวิเคราะห์สารให้กลิ่นรสในเดือนที่ 6 ตามวิธีในข้อ 3.2.3

ค.การวิเคราะห์ Amino acid profile

เตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนทั้งหมด (Total amino acids) ตามวิธีของ Tungkawachara et al. (2003) โดยย่อยตัวอย่างน้ำปลาที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากอิออน (Deionized distilled water) ในอัตราส่วน 1:10 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 12 นอร์มอล ที่ประกอบด้วยสารละลายฟีนอลเข้มข้น 1% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหม้อนึ่ง (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เข้มข้นด้วย Vacuum rotary evaporator ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้จากการระเหยแห้งมาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากอิออน ปริมาตร 20 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านด้วยแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร โดยคำนวณปริมาณของกรดอะมิโนด้วยเครื่อง Amino acid analyzer (Biochrom 30, Pharmacia-Biotech, Buckinghamshire, UK) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรท (Sodium citrate) ที่ pH 3.2-4.9 เป็น Mobile phase

เตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนอิสระ (Free amino acid) ตามวิธีของ Tungkawachara et al. (2003) โดยตกตะกอนโปรตีนของตัวอย่างน้ำปลาปริมาตร 2 มิลลิลิตร ด้วย 5'-sulfosalicylic acid (SSA) จำนวน 100 มิลลิกรัม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuged ที่ 1,500×g เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระ แสดงปริมาณกรดอะมิโนในหน่วยของมิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร

ง. การวิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีน

เตรียมอนุพันธ์ของตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน โดยนำตัวอย่างน้ำปลาหรือสารละลายมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของสารมาตรฐานภายใน (Internal standard) ไดอะมิโนเฮปเทน (Diaminoheptane) เข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร สารละลายอิ่มตัวโซเดียมไบคาร์บอเนตปริมาตร 300 ไมโครลิตร และแดนซิลคลอไรด์ (Dansyl chloride) เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มสารผสมที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา Dansylation อย่างสมบูรณ์ จากนั้นเติมแอมโมเนียเข้มข้น 30% ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เพื่อการกำจัดแดนซิลคลอไรด์ที่คงเหลือจากปฏิกิริยา ปรับปริมาตรสารละลายผสมให้ครบ 5 มิลลิลิตร ด้วยอะซิโตไนไตรล์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2500×g เป็นเวลา 5 นาที (Legend™ MACH 1.6/R, Thermo Electron LED GmbH, Lengensellbold, Germany) กรองสารละลายส่วนใสด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ 10 ไมโครลิตร

วิเคราะห์ปริมาณไบโอเจนิกเอมีนด้วยเครื่อง HPLC (HP 1100, Agilent Technologies, CA., USA) โดยใช้คอลัมน์ Hypersil BDS C18 (3 ไมโครเมตร, 100×4 มิลลิเมตร, Agilent Technologies, CA., USA) ตรวจวัดอนุพันธ์โดย Diode array detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เป็นความยาวคลื่นอ้างอิง สารชะประกอบด้วยส่วนผสมของ Mobile phase A และ B โดย Mobile phase A ประกอบด้วย อะซิโตไนไตรล์ และกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:9 ส่วน Mobile phase B ประกอบด้วย กรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์:อะซิโตไนไตรล์:เมทานอล ในอัตราส่วน 1:4.5:4.5 ใช้การชะแบบ Gradient ด้วยอัตราส่วนของ Mobile phase A และ B ดังรายละเอียดข้างล่างนี้ ด้วยอัตราการไหลที่ 1 มิลลิลิตร/นาที โดยควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 28 องศาเซลเซียส

เวลา (นาที)	Mobile phase A	:	Mobile phase B
0	50%	:	50%
5	50%	:	50%
10	40%	:	60%
15	30%	:	70%
20	20%	:	80%
25	10%	:	90%

จ.การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ผู้ทดสอบทำการประเมินความชอบ (Hedonic test) ของคุณลักษณะทางด้านสี (Color) กลิ่น (Odor) กลิ่นรส (Flavor) และความชอบโดยรวม (Overall acceptance) ของตัวอย่างน้ำปลาที่หมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรีย เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างน้ำปลาทางการค้า (หมัก 12 เดือน) รวมจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 4 ตัวอย่าง โดยใช้ผู้ทดสอบจากสถานประกอบการจำนวน 10 คน เสิร์ฟตัวอย่างแบบสุ่มให้กับผู้ทดสอบ เพื่อประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยให้เป็นช่วงคะแนน 1-7 คะแนน

3.2.5 วิเคราะห์ผลทางสถิติ

-ทำการทดลองสองซ้ำโดยทุกการทดลองวัดอย่างน้อย 2-3 replication ผลของการใช้กล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD 10-5-10 และ *T. halophilus* MS33 ร่วมกับเอนไซม์ต่อปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน และลักษณะทางเคมีของตัวอย่างน้ำปลาใช้การทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม

วิเคราะห์ทางสถิติ SPSS for Windows (Version 14.0; SPSS Inc., Chicago, IL., U.S.A.) ที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.05$

3.3 การใช้กล้าเชื้อจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำปลา และการย่อยสลายตัวเองในกระบวนการหมักน้ำปลา

จากการทดลองเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายตัวเองของปลากะตัก พบว่าสภาวะที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 15 % บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ผลงานวิจัยหัวข้อ 3.1) เป็นสภาวะที่เหมาะสม เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสามารถประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม จึงศึกษาผลของการลดอุณหภูมิการบ่ม ดังนี้

นำปลากะตักสด 600 กรัม เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10 และ 15 % บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ติดตามปริมาณโอลิโกเพปไทด์ในรูปกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α-Amino group) ตามวิธีของ Adler-Nissen (1979) โดยใช้ลูซีนเป็นสารมาตรฐาน ดังระบุในหัวข้อ 3.1.3 และวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายตัวเองของปลากะตัก โดยนำตัวอย่าง 3 กรัม ปั่นผสมกับ Trichloro-acetic acid (TCA) ที่แช่เย็นเข้มข้น 5% (w/v) ปริมาตร 27 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000×g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Universal 16R, Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, Germany) นำสารละลายส่วนใส (Supernatant) ไปวิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเพปไทด์ที่เกิดจากการย่อยสลายตัวเองด้วยวิธี Lowry (Lowy et al., 1951) โดยใช้ไทโรซีนเป็นสารละลายมาตรฐาน แสดงค่าการย่อยสลายตัวเองในหน่วยนาโนโมลของไทโรซีนต่อกรัมตัวอย่าง

3.3.1 ผลการเติมกล้าเชื้อในกระบวนการหมักน้ำปลา

กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ใช้ในการทดสอบคือ *T. halophilus* MCD 10-5-10 และ *T. halophilus* MS33 วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมักคือ ปลากะตักสด และปลากะตักที่ผ่านการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง การทดลองนี้เตรียมตัวอย่างโดยใช้สภาวะการเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองแทนการใช้เอนไซม์ทางการค้า

กระตุ้นการเจริญของกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD 10-5-10 และ *T. halophilus* MS33 ในอาหาร MRS ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% เตรียมอาหารน้ำคาวปลา โดยเจือจางน้ำคาวปลาด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาณเกลือ 15% ปรับ pH ให้ได้ 7 จำนวนแบคทีเรียก่อนนำไปใช้มีค่าเท่ากับ 10^5-10^6 CFU/มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อในระดับ 1% บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อ (10%) ลงในปลากะตักสด และปลากะตักที่ผ่านการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ปริมาณ 1 กิโลกรัม คลุกเคล้าด้วยเกลือสมุทร 250 กรัม เตรียมชุดควบคุมคือปลากะตักสดหมัก

ด้วยเกลือ 25% โดยไม่เติมกล้าเชื้อ ติดตามการเจริญของ *T. halophilus* MCD 10-5-10 และ *T. halophilus* MS33 ทุก 1 เดือน โดยเทคนิค Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15% คือ Plate count agar (PCA) และ MRS agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5% อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส ในสภาวะมีออกซิเจน เป็นเวลา 7-10 วัน และอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 7-10 วัน วิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเพปไทด์ในรูปของไทโรซีน (Tyrosine) ตามวิธี Lowry (Lowy et al., 1951) และปริมาณแอลฟาอะมิโน (α-Amino group) ตามวิธีของ Adler-Nissen (1979) ดังระบุในหัวข้อ 3.1.3 ทุกเดือน เมื่อหมักเป็นเวลา 7 เดือน นำตัวอย่างน้ำปลาที่กรองแล้วมาทำวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมด (TN) ด้วยวิธี AOAC (2000) ปริมาณเกลือด้วยหลักการ Volhard ตามวิธี AOAC (2000) วัดค่าสีโดยตัวอย่างน้ำปลาเจือจางด้วยน้ำปราศจากอิออนในอัตราส่วน 1:3 (w/w) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (GBC UV/VIS 916; GBC Scientific Equipment PTY, Ltd., Australia) ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร วัดค่า pH โดยใช้เครื่อง pH meter (Mettler-Toledo MP220, Schwerzenbach, Switzerland) และวิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนโดยเครื่อง HPLC (Eerola et al., 1993) ดังระบุในหัวข้อ 3.2.4 (ค)

3.3.2 วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการทดลองสองซ้ำโดยทุกการทดลองวัดอย่างน้อย 2-3 replication ศึกษาผลของกล้าเชื้อ (*T. halophilus* MCD 10-5-10 และ *T. halophilus* MS33) และสภาวะเหนี่ยวนำการย่อยสลาย (บ่มและไม่บ่ม) ต่อปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน และลักษณะทางเคมีของตัวอย่างน้ำปลา โดยใช้การทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS for Windows (Version 14.0; SPSS Inc., Chicago, IL., U.S.A.) ที่ระดับนัยสำคัญ $p<0.05$