ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
250333

(ฉบับสมบูรณ์) รหัสโครงการ SUT3-305-49-24-16

รายงานการวิจัย

การใช้เอนไซม์จากปลาและกล้าเชื้อแบคทีเรียในกระบวนการหมักน้ำปลา

(The use of endogenous proteinase and bacterial starter cultures for fish sauce fermentation)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

b00255259

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
250333

รหัสโครงการ SUT3-305-49-24-16

รายงานการวิจัย

การใช้เอนไซม์จากปลาและกล้าเชื้อแบคทีเรียในกระบวนการหมักน้ำปลา

(The use of endogenous proteinase and bacterial starter cultures for fish sauce fermentation)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุรีลักษณ์ รอดทอง

สาขาวิชาจุลชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549-2550

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กรกฎาคม 2555

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือและห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ 1 และ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ และบริษัทอุตสาหกรรมน้ำปลาระยองที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเกลือสมุทร และตัวอย่างปลา ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีความสำคัญที่สุดสำหรับงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณบริษัทอีสต์เอเชียติกที่ให้ความอนุเคราะห์เอนไซม์โปรติเนสที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณคณะผู้ช่วยวิจัยและนักศึกษาบัณฑิตในโครงการ ที่อุทิศตน และมุ่งมั่นในการทำวิจัยด้วยความอุตสาหะ

บทคัดย่อ

250333

วัตถุประสงค์โดยรวมของงานวิจัยนี้คือพัฒนากระบวนการผลิตที่สามารถลดระยะเวลาการหมักน้ำปลาโดยใช้เทคโนโลยีกล้าเชื้อร่วมกับเอนไซม์ทางการค้าและเอนไซม์ในตัวปลา กิจกรรมที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายตัวเองของปลากะตัก (*Stolephorus* spp.) เมื่อพิจารณาจากระดับการย่อยสลายโปรตีนและกิจกรรมโปรติเนสในปลา คือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โปรติเนสที่คล้ายทริปซิน (Trypsin-like proteinases) เป็นโปรติเนสกลุ่มหลักที่มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายตัวเองของปลากะตัก

แบคทีเรียกรดแล็กติก 2 ไอโซเลท คือ MS33 และ MCD10-5-10 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำปลาหมักเดือนที่ 1 และ 5 มีรูปร่างเซลล์กลม เรียงตัวเป็นคู่ (Pairs) และแบบสี่เซลล์ (Tetrads) สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0-25% และเจริญได้ดีที่เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5-10% มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene เหมือนกับ *Tetragenococus halophilus* ATCC 33315 99.0% จึงระบุได้ว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 2 ไอโซเลทนี้เป็นชนิด *T. halophilus* อย่างไรก็ตามทั้ง 2 สายพันธุ์มีความแตกต่างในการผลิตเอนไซม์ และแบบแผนการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ รวมถึงความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 2 สายพันธุ์ (*T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10) ในอาหาร Fish broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% และวิเคราะห์องค์ประกอบของสารระเหยด้วยวิธี Purge and trap ควบคู่กับการแยกสารและระบุชนิดของสารด้วยเทคนิค Gas chromato-graphy-Mass spectrometry (GC-MS) พบว่าสามารถสร้างสารประกอบแอลกอฮอล์ ได้แก่ Isopropyl alcohol, 1-Propanol, 1-Butanol, 1-Penten-3-ol, 3-Methyl-1-butanol, 1-Pentanol และ 1-Hexanol แบคทีเรียกรดแล็กติก *T. halophilus* MS33 สร้าง 2-Methylpropanal ในปริมาณที่มากกว่าตัวอย่างควบคุม ($p<0.05$) สายพันธุ์ MS33 นี้มีแนวโน้มสร้างสารระเหยที่ให้กลิ่นเนื้อกับผลิตภัณฑ์หมักที่ปริมาณเกลือสูง 25% และไม่สร้าง Dimethyl disulfide ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นอุจจาระ

การเร่งกระบวนการหมักน้ำปลาด้วยเอนไซม์ทางการค้าร่วมกับการใช้แบคทีเรียกรดแล็กติกคือ *T. halophilus* MCD 10-5-10 และ *T. halophilus* MS33 โดยการย่อยปลากะตักด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase 2.4L) ในระดับ 0.25% และเอนไซม์เฟโวไซม์ (Flavouzyme 500L) ในระดับ 0.5% น้ำปลาที่ได้มีมาตรฐานเทียบเท่ากับน้ำปลาชั้นที่ 1 หลังจากการหมักเป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่าจำนวนแบคทีเรียลดลงจากวันเริ่มต้น 3-4 Log CFU/ มิลลิลิตร ในเดือนที่ 2 และไม่สามารถตรวจนับแบคทีเรียได้ในเดือนที่ 3 แต่อย่างไรก็ตามปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* มีค่าสูงกว่าตัวอย่างควบคุม

250333

โดยอยู่ในช่วง 704-727 มิลลิโมลาร์ ($p<0.05$) ตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 และ *T. halophilus* MCD10-5-10 มีปริมาณฮีสตามีนต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม ($p<0.05$) ตรวจไม่พบ Dimethyl disulfide ในตัวอย่างการเติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD10-5-10 ในน้ำปลา จากผลการทดสอบความชอบ กลิ่น และการยอมรับรวมของน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกไม่ต่างจากตัวอย่างทางการค้าที่หมักเป็นเวลา 12 เดือน ($p>0.05$)

ทดสอบการหมักน้ำปลาด้วยการเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองของปลากะตักร่วมกับการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรีย *T. halophilus* MCD10-5-10 และ *T. halophilus* MS33 โดยบ่มปลากะตักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนกระบวนการหมักน้ำปลา พบว่าการเติมกล้าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทในตัวอย่างที่ผ่านการบ่มสามารถเร่งการย่อยสลายในช่วง 3 เดือนแรกของการหมัก และเมื่อหมักเป็นเวลา 7 เดือน ตัวอย่างที่ผ่านการบ่มก่อนการเติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 และตัวอย่างควบคุมที่ไม่ผ่านการเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองมีปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนสูงสุด ($p<0.05$) ตัวอย่างที่ไม่ผ่านการเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองและเติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD10-5-10 มีปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนน้อยกว่าตัวอย่างควบคุม ($p<0.05$) หากไม่มีการใช้กล้าเชื้อการบ่มปลาก่อนการหมักไม่ได้ช่วยเร่งกระบวนการหมัก ปริมาณฮีสตามีนในทุกตัวอย่างอยู่ในช่วง 12.91-16.22 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าที่ไม่เกินค่ามาตรฐาน 20 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร ดังนั้นการหมักน้ำปลาด้วยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกและเหนี่ยวนำการย่อยสลายตัวเองของปลากะตักก่อนการหมักเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถเร่งกระบวนการหมักน้ำปลาได้

Abstract

250333

Overall objective of this research was to develop a process that can reduce fermentation time using starter culture in conjunction with commercial enzyme or fish endogenous proteinases. Optimum autolytic activity of Indian anchovy based on the extent of proteolysis and endogenous proteolytic activity was at 50°C, 10%NaCl for 4 h. Trypsin-like proteases were mainly expressible for autolytic activity.

Two isolate, MS33 and MCD10-5-10, of lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermented for 1 and 5 months were cocci with pairs/tetrads. They grew at 0-25% NaCl with optimum NaCl concentration of 5-10 %. The result of 16S rRNA gene sequences showed homology to *T. halophilus* ATCC 33315 at 99.0%. Thus, these isolates were identified as *T. halophilus*. However, both strains showed variation in enzyme production and sugar fermentation pattern as well as growth at 45°C.

Two strains of lactic acid bacteria (*T. halophilus* MS33 and *T. halophilus* MCD10-5-10) were cultured in fish broth containing 25%NaCl and volatile compounds were analyzed by purge and trap equipped with Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) for identification. These isolates produced alcohols including isopropyl alcohol, 1-propanol, 1-butanol, 1-penten-3-ol, 3-methyl-1-butanol, 1-pentanol, and 1-hexanol. Isolate MS33 produced 2-methylpropanal more than the control ($p<0.05$). This isolate produced volatile compounds providing "meaty" note at high salt content of 25%. Dimethyl disulfide, a compound attributing to fecal note, was not detected in the sample added *T. halophilus* MS33.

Acceleration of fish sauce fermentation using 0.25%Alcalase 2.4L and 0.5%Flavozyme 500L in combination with a starter culture of *T. halophilus* MCD10-5-10 and *T. halophilus* MS33 was investigated. The first grade fish sauce was obtained after 6 months of fermentation. Lactic acid bacterial counts of inoculated samples decreased 3-4 Log CFU/ml at 2 months of fermentation and were not detected after 3 months. α-Amino contents of 6-mo-old fish sauce samples were 704-727 mM and higher than the control ($p<0.05$). Addition of *T. halophilus* MS33 and *T. halophilus* MCD10-5-10 resulted in lower histamine content than the control ($p<0.05$). Dimethyl disulfide was not detected in the fish sauce sample added *T. halophilus* MCD10-5-10. Based on the liking test, odor and overall

250333

acceptance of fish sauce fermented using lactic acid bacteria cultures were not different from those of the traditionally-fermented fish sauce ($p>0.05$).

Fish sauce fermentation using pre-autolysis in combination with a starter culture of *T. halophilus* MCD10-5-10 and *T. halophilus* MS33 was investigated. Autolysis was induced at 40°C, 10%NaCl for 4 h before fermentation. Pretreatment of autolysis and addition both of starter cultures induced degree of hydrolysis within the first 3 months of fermentation. After 7 months, the sample pretreated with autolysis and adding *T. halophilus* MS33 and the control sample without pre-autolysis (no starter culture added) exhibited higher α-Amino content ($p<0.05$). The sample without pre-autolysis in combination with *T. halophilus* MCD10-5-10 showed lower α-Amino content than the control ($p<0.05$). Pre-autolysis without starter culture did not accelerate fermentation. Histamine content of all samples ranged 12.91-16.22 mg/100 ml, which did not exceed an allowable limit of 20 mg/100 mL. Therefore, the use of lactic acid bacterial starter culture in conjunction with pre-autolysis could be an alternative means to accelerate fish sauce fermentation.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อไทย	ข
บทคัดย่ออังกฤษ	ง
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญรูป	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
ขอบเขตงานวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	4
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	
2.1 น้ำปลา	5
2.2 เอนไซม์จากตัวปลา	5
2.3 จุลินทรีย์ในกระบวนการหมักน้ำปลา	11
2.4 แบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria)	12
2.5 องค์ประกอบของสารระเหยในน้ำปลา	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 การย่อยสลายตัวเองของปลากะตัก	19
3.2 การระบุชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา และการใช้ประโยชน์กล้าเชื้อในการหมักน้ำปลา	21
3.3 การใช้กล้าเชื้อจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำปลา และการย่อยสลายตัวเองในกระบวนการหมักน้ำปลา	33
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
4.1 ผลการศึกษาการย่อยสลายตัวเองของปลากะตัก	35

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณโอลิโกเพปไทด์	35
4.1.2 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของโปรติเนส	36
4.2 ผลการศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติก	45
4.2.1 การระบุชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือก	45
4.2.2 ความสามารถสร้างสารระเหยในอาหาร Fish broth	50
4.2.3 การใช้แบคทีเรียกรดแล็กติกในการหมักน้ำปลา	51
4.3 ผลการศึกษาการหมักน้ำปลาโดยใช้กล้าเชื้อจากแบคทีเรียกรดแล็กติกร่วมกับการใช้โปรติเนสจากปลากะตัก	63
บทที่ 5 บทสรุป	
5.1 สรุปผลการวิจัย	72
5.2 ข้อเสนอแนะ	73
บรรณานุกรม	74
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	88
ภาคผนวก ข	94
ภาคผนวก ค	96
ประวัตินักวิจัย	106

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	เอนไซม์โปรติเนสในกล้ามเนื้อปลาชนิดต่างๆ	8
2.2	ความแตกต่างทางสรีรวิทยาระหว่างสกุล *Tetragenococcus* และ *Pediococcus*	14
2.3	สมบัติทางสรีรวิทยาและการใช้น้ำตาลของแบคทีเรียกรดแล็กติกในสกุล *Tetragenococcus* 4 ชนิด	16
3.1	Universal primers สำหรับเพิ่มจำนวน 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction	27
4.1	ลักษณะทางสัณฐานและผลทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติก 2 ไอโซเลท และ *T. halophilus* ATCC 33315	47
4.2	ปริมาณสารระเหยสัมพัทธ์ในตัวอย่าง Fish broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% และเติมแบคทีเรียกรดแล็กติก บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน	52
4.3	ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโนของตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน	53
4.4	ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนในน้ำปลาที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 6 เดือน	56
4.5	คุณสมบัติทางเคมีของน้ำปลาที่หมักโดยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 6 เดือน	57
4.6	ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (Free amino acid, มก./100 มล.) ในตัวอย่างน้ำปลาที่หมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 6 เดือน และหมักทางการค้าเป็นเวลา 12 เดือน	58
4.7	ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด (Total amino acid, มก./100 มล.) ในตัวอย่างน้ำปลาที่หมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 6 เดือน และหมักทางการค้าเป็นเวลา 12 เดือน	59
4.8	ปริมาณสารระเหยสัมพัทธ์กับสารมาตรฐานภายในของน้ำปลาหมักด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นเวลา 6 เดือน เทียบกับตัวอย่างทางการค้าที่หมักเป็นเวลา 12 เดือน	61
4.9	คะแนนความชอบต่อตัวอย่างน้ำปลาเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่หมักเป็น	63

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
	เวลา 6 เดือน เทียบกับตัวอย่างทางการค้าที่หมักเป็นเวลา 12 เดือน	
4.10	ระดับการย่อยสลายตัวเองของปลากะตักเมื่อบ่มที่ 40 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง	64
4.11	การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในช่วง 3 เดือนแรกของการหมัก ในตัวอย่างน้ำปลาบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และไม่บ่ม โดยหมักด้วยกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD 10-5-10 และ *T. halophilus* MS33	65
4.12	คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD 10-5-10 และ *T. halophilus* MS33 ของปลาผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และปลาที่ไม่ได้บ่มก่อนการหมัก	70
4.13	ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนของตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD 10-5-10 และ *T. halophilus* MS33 ของปลาผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และปลาที่ไม่ได้บ่มก่อนการหมัก	71
ค1	ปริมาณโอลิโกเพปไทด์ในรูปปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α-Amino group content) ในตัวอย่างปลากะตักที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35, 50 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆ	96
ค2	กิจกรรมโปรติเนสกลุ่ม Trypsin-like ในตัวอย่างปลากะตักที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35, 50 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆ	98
ค3	กิจกรรมโปรติเนสกลุ่ม Chymotrypsin-like ในตัวอย่างปลากะตักที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35, 50 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆ	100
ค4	กิจกรรมโปรติเนสกลุ่ม Cathepsin L-like ในตัวอย่างปลากะตักที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35, 50 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆ	102

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ค5	กิจกรรมโปรติเนสกลุ่ม L-luecine aminopeptidase ในตัวอย่างปลากะตักที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35, 50 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆ	104

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ขั้นตอนการผลิตน้ำปลา	6
4.1	ปริมาณโอลิโกเพปไทด์ในรูปของปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α-Amino group) ในตัวอย่างปลากะตักที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 (a), 50 (b) และ 65 องศาเซลเซียส (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ	37
4.2	กิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่ม Trypsin-like ในตัวอย่างปลากะตักที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 (a), 50 (b) และ 65 องศาเซลเซียส (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ	39
4.3	กิจกรรมของเอนไซม์ Chymotrypsin-like ในตัวอย่างปลากะตักที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 (a), 50 (b) และ 65 องศาเซลเซียส (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ	41
4.4	กิจกรรมของเอนไซม์ Cathepsin L-like ในตัวอย่างปลากะตักที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 (a), 50 (b) และ 65 องศาเซลเซียส (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ	42
4.5	กิจกรรมของเอนไซม์ Luecine aminopeptidase ในตัวอย่างปลากะตักที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10 และ 15% เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 (a), 50 (b) และ 65 องศาเซลเซียส (c) เป็นระยะเวลาต่างๆ	44
4.6	สัณฐานวิทยาของเซลล์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกจำนวน 2 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างจากบ่อหมักน้ำปลาเดือนที่ 1 (a) และ 5 (b) และ *T. halophilus* ATCC 33315 (c) ย้อมสีเซลล์ (ลูกศร) แบบแกรม ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ (Bar = 1 μm)	46
4.7	ผลผลิต PCR ของ 16S rRNA gene ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วย Primers fD1/rP2; Lane M คือ 1 kb DNA Ladder (Fermentas life sciences) เป็น Molecular weight markers; 2 คือ MS33; 5 คือ MCD10-5-10; 8 คือตัวอย่างควบคุมเชิงลบ	49
4.8	Phylogenetic tree ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เป็นสายพันธุ์คัดเลือก 2 สายพันธุ์ และสายพันธุ์จาก NCBI nucleotide sequence database (U.S.A.) ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene (Partial sequence) โดยใช้วิธี Maximum Parsimony ตัวเลขที่ Branch เป็นค่า Bootstrap จาก 1,000 replications	49
4.9	การเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียตรวจนับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (a) และ JCM 168 (b) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 18% ระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลา	54

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.10	แบคทีเรียที่ตรวจนับได้จากระบบการหมักปลาในห้องปฏิบัติการ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ JCM 168 (a) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 18% และนำมาทดสอบการเจริญบนอาหาร MRS agar ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 18% (b)	55
4.11	ปริมาณโอลิโกเพปไทด์ในรูป (a)ไทโรซีน และ (b)กลุ่มแอลฟาอะมิโน (α-Amino group content) ในตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MCD10-5-10 โดยปลาผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และปลาที่ไม่ผ่านการบ่ม ก่อนการหมักน้ำปลา ที่ระยะเวลาต่างๆ	68
4.12	ปริมาณโอลิโกเพปไทด์ในรูป (a)ไทโรซีน และ (b)กลุ่มแอลฟาอะมิโน (α-Amino group content) ในตัวอย่างน้ำปลาที่เติมกล้าเชื้อ *T. halophilus* MS33 โดยปลาผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และปลาที่ไม่ผ่านการบ่ม ก่อนการหมักน้ำปลา ที่ระยะเวลาต่างๆ	69

คำอธิบายสัญลักษณ์

ANOVA	Analysis of varience
α	Alfa
bp	Base pair
CFU	Colony forming unit
cm	Centrimeter
°C	Degree Celsius
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	Deoxycytidine triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
dTTP	Deoxythymidine triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
et al.	et alia (and others)
mg	Milligram
h	Hour
ml	Milliliter
µl	Microliter
mM	Millimolar
mmol	Millimole
µmol	Micromole
%	Percentage
PCR	Polymerase chain reaction
rpm	Revolution per minute
s	Second
sp.	Species