การเปลี่ยนแปลงของประชากรแบคทีเรียและชีวเคมีในการหมักน้ำปลา

นางสาวสาโรจน์ ประเสริฐศิริวัฒน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2530

ISBN 974-569-476-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

014409

i17484208

Bacterial Population and Biochemical Changes in Fish Sauce Fermentation

Miss. Saroch Prasertsirivatna

Thesis Submitted in Partial Fulfillments of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1987

ISBN 974-569-476-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปลี่ยนแปลงของประชากรแบคทีเรียและชีวเคมีในการหมักน้ำปลา
โดย	นางสาวสาโรจน์ ประเสริฐศิริวัฒน์
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน
	ดร.อุดม จันทรารักษ์ศรี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ วีระวุฒิ มหามนตรี)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

.....กรรมการ
(ดร. อุดม จันทรารักษ์ศรี)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ กาญจนา จันทองจีน)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ภาโรจน์ ประเสริฐศิริวัฒน์ : การเปลี่ยนแปลงของประชากรแบคทีเรีย และชีวเคมี ในการหมักน้ำปลา(BACTERIAL POPULATION AND BIOCHEMICAL CHANGES IN FISH SAUCE FERMENTATION) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ประกิตติ์สิน ลิหนนท์น, 113 หน้า.

การศึกษาเพื่อคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม สำหรับใช้แยกเชื้อจากน้ำปลา พบว่า Tryptone yeast extract agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดเนื่องจากมีแบคทีเรียเจริญได้มากทั้งชนิดและจำนวน ระยะเวลาในการบ่มเชื้อที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียพวกที่ทนเค็มได้ต่ำ คือ 8 วัน และ 14 วันในกรณีแบคทีเรียชอบเค็มสูง การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียที่พบในกระบวนการหมัก พบว่าปริมาณของแบคทีเรียสูงสุดในวันแรกของการหมัก ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียรูปกลมแกรมบวกที่ทนเค็มได้ต่ำนอกนั้นเป็นพวกรูปแท่งแกรมบวกและแกรมลบ และจะลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วในช่วง 2 สัปดาห์แรก จากนั้นจะมีแบคทีเรียชอบเค็มสูงโคโลนีสีแดงรูปร่างกลมแกรมบวกเริ่มเจริญเพิ่มจำนวนจนมีจำนวนสูงสุดในวันที่ 62 และหายไปหลังจาก 124 วันของการหมัก เชื้อกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์กับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน แอมโมเนียคัลไนโตรเจน และกรดอะมิโนอิสระทั้งหมด การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารประกอบไนโตรเจนเหล่านี้จะมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่เริ่มหมัก หลังจาก 4 เดือนอัตราการเพิ่มขึ้นจะค่อนข้างคงที่ ค่าความเป็นกรดด่าง(pH)มีการเปลี่ยนแปลงในช่วง 5.22 - 5.96 หลังจาก 86 วันไปแล้วมีแนวโน้มลดลงตลอด การคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มที่สร้างโปรติเอสได้พบว่าเชื้อ Isolate 1 เป็นแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่สร้างโปรติเอสและเจลลาติเนสได้ดีที่สุด มีคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล Halococcus เมื่อทดลองนำเชื้อ Isolate 1 ไปทดลองเพิ่มลงในการหมักเปรียบเทียบกับการหมักตามธรรมชาติในช่วงระยะเวลา 73 วัน สามารถทำให้ได้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และไนโตรเจนในรูปกรดอมิโนสูงกว่าการหมักตามธรรมชาติ แต่พบว่าปริมาณแอมโมเนียคัลไนโตรเจนน้อยกว่าที่ได้จากการหมักตามธรรมชาติ

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2531 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

Saroch Prasertsirivatna : Bacterial Population and Biochemical Changes in Fish Sauce Fermentation. Thesis Adviser : Associate Professor Prakitsin Sihanonth, Ph.D. 113 pp.

Study for the selection of appropriate media suitable for the isolation of bacteria from fish sauce indicated that tryptone yeast extract agar is the most suitable medium by which the medium gave the highest number of bacteria as well as type of bacteria. The optimum incubation time for low salt tolerance bacteria and halophilic bacteria were 8 days and 14 days respectively. Results of the study for the change of bacterial population during the course of fermentation indicated that the maximum number of bacteria was found in the first day of fermentation in which most of the bacteria found were gram positive cocci with low salt tolerance nature, with the rest of gram positive and gram negative rod. The number of such bacteria was reduced rapidly during the first two weeks of fermentation. Afterward, a predominate halophilic bacteria with red color colony appearance took place then peaked at 62 days and disappeared after 124 days. The presence of this group bacteria were found correlated with amount of total nitrogen, amino acid nitrogen and ammoniacal nitrogen, total free amino acid as well as their change which were found constant after 4 months of fermentation, pH of the culture was found in the range between 5.22 - 5.96 and continuously declined after day 86. Isolation for halophilic protease producer showed that isolate 1 which gave highest protease and gelatinase activity possesses morphological as well as biochemical characteristics resemble those of Halococcus should be a good candidate for this purpose. Artificially inoculated with isolate 1 gave higher total nitrogen and amino acid nitrogen but less ammoniacal nitrogen content in comparison to natural fermentation

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2531 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน และ ดร.อุดม จันทรารักษ์ศรี ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำ แนวความคิด ตลอดจนช่วยแก้ไขให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ วีระวุฒิ มหามนตรี และรองศาสตราจารย์ กาญจนา จันทองจีน ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบริษัทสิทธิพรแอสโซซิเอส จำกัด ที่ได้กรุณาตรวจวิเคราะห์กรดอะมิโน

ขอขอบพระคุณท่านคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งเพื่อนและน้องๆ ที่ช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จ

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสำหรับทำการวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของบัณฑิตวิทยาลัยที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกต่างๆ

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบคุณ พี่ของข้าพเจ้าทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ ทั้งกำลังกาย กำลังใจ และกำลังทรัพย์ในการทำวิทยานิพนธ์ตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญรูป ..... ญ

บทที่

1. บทนำ 1

2. ตรวจเอกสาร 3

3. วิธีดำเนินการวิจัย 27

4. ผลการทดลองและอภิปรายผล 39

5. สรุป 71

เอกสารอ้างอิง 76

ภาคผนวก ก 85

ภาคผนวก ข 94

ภาคผนวก ค 100

ประวัติผู้เขียน 113

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงมูลค่าน้ำปลาส่งออกต่างประเทศ	4
2	แสดงส่วนประกอบของปลาบางชนิดที่ใช้ทำน้ำปลา	6
3	แสดงถึงกรดอะมิโนที่พบในปลาบางชนิด	7
4	องค์ประกอบทางเคมีของเกลือที่ผลิตในประเทศไทย	11
5	องค์ประกอบทางเคมีของเกลือที่ผลิตในประเทศแคนาดา	11
6	องค์ประกอบทางเคมีของเกลือสินเธาว์ที่ผลิตในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย	11
7	แสดงชนิดและจำนวนของกรดอะมิโนที่พบในน้ำปลาไทยและน้ำปลาเวียตนาม	18
8	สารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนของน้ำปลาเวียตนามในช่วงระยะเวลาต่างๆ	20
9	วิธีการที่นำมาใช้ในการพัฒนากระบวนการหมักน้ำปลา	24
10	จำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดที่แยกได้จากน้ำปลาอายุ 1 เดือน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ ผสมเกลือ 0.5 เปอร์เซ็นต์	39
11	แสดงลักษณะของโคโลนี สี ขนาด ของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone yeast extract agar ไม่เติมเกลือ เติมเกลือ 5 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมัก	46
12	ปริมาณกรดอะมิโนอิสระและอัตราเพิ่มเฉลี่ยต่อวันในช่วง 223 วันของกระบวนการหมัก	63
13	คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีบางประการของแบคทีเรีย Isolate 1,2,3 และ 4 ที่แยกได้จากน้ำปลา	67
14	แสดงความแตกต่างเฉลี่ยของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน แอมโมเนียคัลไนโตรเจน ค่าความเป็นกรดด่าง(pH) ปริมาณเกลือ และปริมาณเชื้อในโหลควบคุมและโหลที่เติมเชื้อ Isolate 1	69
15	การเปลี่ยนแปลงของ ปริมาณเกลือ ค่าความเป็นกรดด่าง(pH) อุณหภูมิภายในและภายนอกถังหมักปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน แอมโมเนียคัลไนโตรเจน ไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน ในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมักน้ำปลา	101

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

16 แสดงจำนวนทั้งหมดและจำนวนของแต่ละกลุ่มของแบคทีเรียที่เปลี่ยนแปลงไปในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมักน้ำปลา โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือ เติมเกลือ 5 และ 20 เปอร์เซ็นต์.....102

17 ค่าสหสัมพันธ์(r) ระหว่างจำนวนทั้งหมดของเชื้อกลุ่มที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือ เติมเกลือ 5 และ 20 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อกลุ่มที่มีโคโลนีสีแดง.....105

18 ค่าสหสัมพันธ์(r) ระหว่างกลุ่มเชื้อต่างๆกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด แอมโมเนียคัลไนโตรเจน ไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน.....106

19 ค่าสหสัมพันธ์(r) ระหว่างปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด แอมโมเนียคัลไนโตรเจน ไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน ค่าความเป็นกรดด่าง(pH) และปริมาณเกลือ.....107

20 ค่าสหสัมพันธ์(r) ของเชื้อแต่ละชนิดระหว่างพวกที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือ เติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ 108

21 แสดงความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิภายนอกและอุณหภูมิภายในถังหมักในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมัก.....108

22 แสดงค่าสหสัมพันธ์(r)ของกรดอะมิโนอิสระและเชื้อกลุ่มต่างๆในช่วงระยะเวลาต่างๆ...109

23 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน แอมโมเนียคัลไนโตรเจน ไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนของน้ำปลาในโหลควบคุม(M) และโหลที่เติมเชื้อ Isolate 1(N) ในช่วงระยะเวลา 73 วันของกระบวนการหมัก.....110

24 แสดงค่าความเป็นกรดด่าง(pH) ปริมาณเกลือ และอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงของน้ำปลาในโหลควบคุม(M) และโหลที่เติมเชื้อ Isolate 1(N) ในช่วงระยะเวลา 73 วันของกระบวนการหมัก.....111

25 แสดงปริมาณของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเติมเกลือ 25 เปอร์เซ็นต์ที่พบในโหลควบคุม(M) และโหลที่เติมเชื้อ Isolate 1(N) ในช่วงระยะเวลา 62 วันของกระบวนการหมัก.....112

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ไดอะแกรมแสดงการสลายตัวของ ATP. เป็นขั้นตอน.....	9
2	แสดงการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone yeast extract agar เติมเกลือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงระยะเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง.....	42
3	แสดงการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เติมเกลือ เติมเกลือ 5 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมักน้ำปลา.....	44
4	แสดงการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียพวกรูปกลม (Coccus) แกรมบวก (C^+) ในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมักน้ำปลา.....	49
5	แสดงการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียพวกรูปแท่ง (Rod) แกรมบวก (R^+) ในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมักน้ำปลา.....	50
6	แสดงการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียพวกรูปแท่ง (Rod) แกรมลบ (R^-) ในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมักน้ำปลา.....	51
7	แสดงการเปลี่ยนแปลงของ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน แอมโมเนียคัลไนโตรเจน ไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน ในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมักน้ำปลา.....	54
8	แสดงการเปลี่ยนแปลงของ แอมโมเนียคัลไนโตรเจน ในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมักน้ำปลา.....	57
9	แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเกลือเป็นเปอร์เซ็นต์ในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมักน้ำปลา.....	58
10	แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่าง(pH) ในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมักน้ำปลา.....	60
11	แสดงการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิทั้งภายนอกและภายในถังหมักในช่วงระยะเวลา 253 วันของกระบวนการหมักน้ำปลา.....	61
12	แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอะมิโนอิสระ โดยเปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียเชื้อกลุ่มโคโลนีสีแดงชอบเค็มที่พบในกระบวนการหมัก	64