แบคทีเรียชอบเค็มที่สร้างไลเปสในน้ำปลา

นายพงษ์เทพ วิไลพันธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2533

ISBN 974-577-221-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

016631

I10308854

Halophilic Bacteria Producing Lipase in Fish Sauce

Mr. Pongtep Wilaipun

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
1990

ISBN 974-577-221-6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	แบคทีเรียชอบเค็มที่สร้างไลเปสในน้ำปลา
โดย	นายพงษ์เทพ วิไลพันธ์
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน
	อาจารย์ ดร.อุดม จันทรารักษ์ศรี
ปีการศึกษา	2532

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ วีระวุฒิ มหามนตรี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

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

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

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ กาญจนา จันทองจีน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

พงษ์เทพ วิไลพันธ์ : แบคทีเรียชอบเค็มที่สร้างไลเปสในน้ำปลา (HALOPHILIC BACTERIA PRODUCING LIPASE IN FISH SAUCE) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร. สุเทพ ธนียวัน และ อ. ดร. อุดม จันทรารักษ์ศรี, 112 หน้า. ISBN 974-577-221-6

ในการคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 15 และ 25 เปอร์-เซ็นต์จำนวน 8 ชนิด เพื่อนำมาใช้คัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มจากตัวอย่างน้ำปลาภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ พบว่า Tryptic soy yeast extract agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุด เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อนี้มาใช้คัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มจากตัวอย่างน้ำปลาที่มีอายุการหมักแตกต่างกัน 6 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างน้ำปลามีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ระหว่าง 10^3 ถึง 10^5 เซลล์ใน 1 มิลลิลิตร ซึ่งสามารถคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มกลุ่มที่เจริญได้เฉพาะภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำได้ 84 โคโลนี ในจำนวนนี้มี 7 โคโลนีที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ดี เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้อยู่ในสกุล Clostridium ที่มีสมบัติพิเศษคือสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ถึง 29 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์กรดไขมันที่ระเหยได้ด้วยเครื่องกาซโครมาโตกราฟีพบว่า แบคทีเรีย 2 โคโลนีในจำนวน 7 โคโลนีนี้สามารถสร้างกรดอะซีติค กรดโปรปิโอนิค กรดบิวไทริค และกรดไอโซวาเลอริคได้จากไขมันของปลาไส้ตัน (Stolephorus spp.) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของอาหารน้อยที่สุด ซึ่งพบว่าชนิดของกรดไขมันที่ระเหยได้ดังกล่าวใกล้เคียงกับที่พบในน้ำปลาบางชนิดที่ผลิตเป็นการค้า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิสิต พงษ์เทพ วิไลพันธ์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ประกิตติ์สิน สีหนนทน์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

PONGTEP WILAIPAN : HALOPHILIC BACTERIA PRODUCING LIPASE IN FISH SAUCE. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. PRAKITSIN SIHANONTH, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSIS. PROF. SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D. AND UDOM CHANTHARAKSRI, Ph.D. 112 PP. ISBN 974-577-221-6

In the selection of 8 culture media containing 15 and 25 percent of sodium chloride used in the isolation of halophilic bacteria from samples of fish sauces under a microaerobic condition, Tryptic soy yeast extract agar was found to be the most suitable culture medium. When this medium was used in the isolation of halophilic bacteria from 6 Thai fish sauce samples of different fermentation duration, the total number of bacterial cells were found to be between 10^3 to 10^5 cells per milliliter and 84 colonies of obligate microaerobic halophilic bacteria were isolated. Among these, 7 colonies were found to have good lipase-producing activity. Physiological and biochemical studies indicated that this group of bacteria belongs to the genus Clostridium. One special characteristic of these isolates is their ability to grow in 29 percent sodium chloride containing media. From the gas chromatography analysis of the volatile fatty acids two of the seven colonies were found to produce acetic acid, propionic acid, butyric acid and isovaleric acid from anchovy fish fat (Stolephorus spp.) in minimum medium. These volatile fatty acids were found to be similar to those found in some commercial Thai fish sauces.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิสิต พงษ์เทพ วิไลพันธ์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ประกฤษฎิ์ สีหนนท์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน และ ดร.อุดม จันทรารักษ์ศรี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำแนวความคิด ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์วีระวุฒิ มหามนตรี และรองศาสตราจารย์กาญจนา จันทองจีน ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยตลอดจนเจ้าหน้าที่ของบัณฑิตวิทยาลัยที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกต่าง ๆ

ท้ายนี้ ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ซึ่งสนับสนุนในด้านการเงินและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป	ญ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. ตรวจเอกสาร	4
3. วิธีดำเนินการวิจัย	28
4. ผลและอภิปรายผล	39
5. สรุป	82
เอกสารอ้างอิง	86
ภาคผนวก ก	94
ภาคผนวก ข	103
ภาคผนวก ค	108
ประวัติผู้เขียน	112

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงชนิดของวัตถุดิบ อัตราส่วนที่ใช้และระยะเวลาในการผลิตน้ำปลาของประเทศต่าง ๆ 5
2. แสดงปริมาณส่วนประกอบของปลาบางชนิดที่ใช้ทำน้ำปลา 7
3. แสดงปริมาณฟอสโฟลิปิดและไตรกลีเซอไรด์ในปลาชนิดต่างๆ 9
4. แสดงชนิดและปริมาณกรดไขมันของไตรกลีเซอไรด์ในปลาชนิดต่างๆ 10
5. แสดงชนิดและปริมาณกรดไขมันของฟอสโฟลิปิดในปลาชนิดต่างๆ 11
6. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Aw และปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 14
7. แสดงชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีค่า Aw ต่าง ๆ 15
8. แสดงปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในน้ำปลาที่ผลิตในประเทศแถบเอเชีย.....17
9. แสดงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเกลือ (NaCl) ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และปริมาณของสารประกอบไนโตรเจนบางชนิด ในช่วงระยะเวลา 253 วัน ของกระบวนการหมักน้ำปลา 19
10. แสดงปริมาณของกรดไขมันที่ระเหยได้ในน้ำปลาไทยที่อายุการหมักแตกต่างกัน..21
11. แสดงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดที่คัดแยกได้จากน้ำปลาอายุการหมัก 10 วัน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ซึ่งผสมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 และ 25 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน.....41
12. แสดงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดที่คัดแยกได้จากน้ำปลาอายุการหมัก 3 เดือน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ซึ่งผสมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 และ 25 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน.....42
13. แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างน้ำปลาที่นำมาใช้ในการศึกษาเพื่อคัดแยกแบคทีเรีย 45
14. แสดงคุณสมบัติทางเคมีของตัวอย่างน้ำปลาที่นำมาใช้ในการศึกษาเพื่อคัดแยกแบคทีเรีย 46
15. แสดงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดที่คัดแยกได้จากน้ำปลาที่มีอายุการหมักแตกต่างกัน เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy yeast extract agar ผสมโซเดียมคลอไรด์โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 และ 25 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน.....47

16. แสดงจำนวนโคโลนีและกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำปลาอายุการหมักแตกต่างกัน ที่เจริญบน Tryptic soy yeast extract agar โดยมีโซเดียมคลอไรด์ ผสมอยู่ 25 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มี ออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 7 วัน.....50
17. เปรียบเทียบความสามารถของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในการสร้างเอนไซม์ไลเปส โดยแสดงถึงอัตราส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของแบคทีเรีย ในสภาวะที่มีเกลือผสมอยู่ 15 และ 25 เปอร์เซ็นต์.....52
18. แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เปรียบเทียบกับ Clostridium paraperfringens..53
19. แสดงความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เปรียบเทียบกับ Clostridium paraperfringens.....55
20. แสดงผลการคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของอาหารน้อยที่สุด ซึ่งทำให้แบคทีเรียที่คัดเลือกได้สามารถเจริญได้ดี เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน.....58
21. แสดงค่าความเป็นกรด ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมและไม่เติมไขมันจากปลาไส้ตันหลังจากเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน.....59
22. แสดงชนิดและอัตราส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันที่ระเหยได้แต่ละชนิดในแต่ละโครมาโตแกรมของสารสกัดจากอาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ และตัวอย่างน้ำปลาที่ผลิตเป็นการค้า.....75
23. เปรียบเทียบอัตราส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันที่ระเหยได้ชนิดต่างๆที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้และจากตัวอย่างน้ำปลาที่ผลิตเป็นการค้า โดยคำนวณอ้างอิงจาก internal standard.....77
24. แสดงชนิดและอัตราส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากน้ำปลาที่ผลิตเป็นการค้าในประเทศไทยและน้ำปลาผลิตในต่างประเทศที่มีผู้เคยทำการศึกษาโดยใช้เครื่องกาซโครมาโตกราฟี.....80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. แสดงขั้นตอนการผลิตน้ำปลาตามแบบธรรมชาติ.....6
2. แสดงขั้นตอนการเกิดปฏิกริยาเมลลาร์ด.....20
3. แสดงสมการเคมีของการย่อยสลายไขมันโดยเอนไซม์ไลเปส.....24
4. แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม (ไม่ได้เติมเชื้อแบคทีเรีย).....62
5. แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเติมแบคทีเรียหมายเลข 1-6 ที่คัดเลือกได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน.....63
6. แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเติมแบคทีเรียหมายเลข 2-1 ที่คัดเลือกได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน.....64
7. แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเติมแบคทีเรียหมายเลข 3-9 ที่คัดเลือกได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน.....65
8. แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเติมแบคทีเรียหมายเลข 4-8 ที่คัดเลือกได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน.....66
9. แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเติมแบคทีเรียหมายเลข 6-3 ที่คัดเลือกได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นวเลา 14 วัน.....67
10. แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเติมแบคทีเรียหมายเลข 6-5 ที่คัดเลือกได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน.....68
11. แสดงโครมโตนแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเติมแบคทีเรียหมายเลข 13-6 ที่คัดเลือกได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เป็นเวลา 14 วัน.....69
12. แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากน้ำปลาตราทิพรส.....70
13. แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากน้ำปลาตราตราชู.....71
14. แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากน้ำปลาตราชุมพร.....72
15. แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากน้ำปลาตราหอยนางรม..73
16. แสดงโครมาโตแกรมของกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งสกัดจากน้ำปลาตรายอด.....74