Thesis Title Production of Kapi from Mungbeans and Soybeans Using Isolated Bacterial Strains

Author Miss Suttida Wittanalai

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Nuansri Rakariyatham Advisor

Prof. Dr. Richard L. Deming Co-advisor

Dr. Nopakarn Chandet Co-advisor

ABSTRACT

Kapi is a Thai traditional fermented shrimp paste that serves as a flavoring in various Thai foods. Nowadays, the number of people who have become vegetarian has increased. To accommodate vegetarians, fermented legume products are often used as meat condiment substitutes. In this study, 7 traditional kapi samples in Thailand were used as a source for the isolation of bacterial strains. A total of 23 isolates were obtained, 10 of which had the ability to produce both protease and amylase activity and these were selected to produce vegetarian kapi using mung bean protein as a substrate. Among the 10 strains, three isolates; RY1, NW1 and IS4, produced the high content of total nitrogen and free amino acid with low ammoniacal nitrogen and these strains were identified as *Bacillus amyloliquefaciens* RY1, *Bacillus subtilis* NW1 and *Bacillus subtilis* IS4 , respectively by 16s rDNA analysis. However, the preliminary study of fermentation of mungbean protein into vegetatian kapi by *B. subtilis* IS4 and *B. amyloliquefaciens* RY1 found that texture, color and aroma of the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

mungbean kapi samples were not similar to the commercial samples. Therefore, the suitable substrate for vegetarian kapi fermentation by starter cultures has been investigated to accommodate the vegetarian kapi with more satisfactory quality.

Soybean has been selected to be the substrate for vegetarian kapi fermentation due to the result that it has shown the most satisfactory qualities that are similar to commercial kapi condiments, especially in terms of aromatic volatile compounds. In order to determine which strain of bacteria were responsible in bringing about the desirable fermentation, studies of 8 safe and non-pathogenic starter cultures were carried out. The fermented soybean by isolate IS4, CM1, RY1, TD1, NW1, SC1, TISTR001 and TISTR 010, were analyzed for their volatile compounds using SPME coupled with gas chromatography/mass spectrometry, and then compared with the commercial kapi (3 kinds of shrimp paste samples and 3 kinds of vegetarian kapi samples). Principal component analysis and cluster analysis were carried out to visualize data trends and to detect possible clusters among samples. The volatiles profile of the fermented samples could be separated into four groups. Soybean kapi, S1, S2, S5, S6, S7 and S8 which were produced form IS4, CM1, NW1, SC1, TISTR001 and TISTR010, respectively, were classified into the same group as commercial vegetarian kapi samples (J1, J2 and J3) that had a predominance of indoles, S-containing compounds and N-containing compounds. While soybean kapi S3 and S4 (fermented by isolate RY1 and TD1, respectively) were classified into group2, shrimp paste kapi was classified into group 3 and shrimp paste kapi K2 and K3 were classified into group4. However, sensory evaluation of S1 showed a strong kapi odor with higher scores and there were no significant differences in evaluation scores between S1 and the commercial vegetarian kapi samples. These data

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

demonstrate that *B. subtilis* IS4 can be employed as a starter culture to produce an acceptable soybean kapi that can be a substitute for shrimp paste kapi.

The changes in enzymatic activities, aroma profiles, color development, phenolic content, including isoflavones, and radical scavenging properties during fermentation of soybean kapi using two isolates of *B. subtilis* IS4 and *B. amyloliquefaciens* RY1, were investigated. The activities of three hydrolytic enzymes (β-glucosidase, α-amylase and protease) from both strains showed the similar change patterns of which the highest activities have been observed during days 2-4 of fermentation. With respect to the volatile compound formation, the common dominant volatile compounds found in both *B. subtilis* IS4 and *B. amyloliquefaciens* RY1 samples were aldehydes and N-containing compounds. However, *B. subtilis* IS4 also contained the dominant compounds acids/esters, while *B. amyloliquefaciens* RY1 also contained alcohol as the dominant compound. Moreover, the change of color in term of CIE system (increase in a^*- and b*- value and decrease in L*-value) appeared to be coincidental with the development of browning and the increase in fluorescence intensity in all samples of *B. subtilis* IS4 and *B. amyloliquefaciens* RY1. In addition, the fermented samples resulted in a significant increase ($p<0.05$) of phenolic content as well as DPPH radical scavenging activity, which was well correlated. Although the content of glucoside isoflavone (daidzin and genistin) and aglycone isoflaove (daidzein and genistein) increased in the early state of fermentation, and dramatically decreased thereafter in both strains, the derivatives of them may possess the antioxidant activity. These results show the potential of the individual *B. subtilis* IS4 and *B. amyloliquefaciens* RY1 that can be used as functional starter cultures for the enrichment of the antioxidant and free-radical scavenging activity in soybean kapi.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตกะปิจากถั่วเขียวและถั่วเหลืองโดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

ผู้เขียน นางสาวสุทธิดา วิทนาลัย

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร.นวลศรี รักอริยะธรรม	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
Prof. Dr. Richard L. Deming	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร.นพกาญจน์ จันทร์เดช	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

กะปิเป็นอาหารหมักพื้นบ้านของไทยทำมาจากกุ้งนิยมใช้เป็นเครื่องปรุงรสในอาหารไทยหลายชนิด ปัจจุบันจำนวนประชาชนที่บริโภคแบบมังสวิรัติมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคที่เป็นมังสวิรัติ เครื่องปรุงที่ผลิตจากถั่วจึงถูกนำมาใช้แทนผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อสัตว์ เช่นกะปิ ในการทดลองนี้กะปิ 7 ชนิดถูกนำมาใช้เป็นแหล่งในการแยกเชื้อแบคทีเรีย เชื้อที่แยกได้มีจำนวน 23 เชื้อ และมี 10 เชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสถูกใช้เป็นหัวเชื้อหมักกะปิเจจากโปรตีนถั่วเขียว พบว่า ไอโซเลท RY1, NW1 และ IS4 สามารถผลิตกะปิเจจากถั่วเขียวที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด, กรดอะมิโนอิสระสูง และมีปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนต่ำ จากการตรวจสอบเอกลักษณ์ของไอโซเลททั้ง 3 สายพันธุ์โดยวิธี 16s rDNA analysis พบว่าเชื้อดังกล่าวคือ *Bacillus amyloliquefaciens* RY1, *Bacillus subtilis* NW1 และ *Bacillus subtilis* IS4 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาเบื้องต้น กะปิเจที่ผลิตจากโปรตีนถั่วเขียว ไม่สามารถให้ผลิตภัณฑ์ ที่เป็นที่น่าพึงพอใจเนื่องจากลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ได้แตกต่างกับกะปิในแง่ของ เนื้อสัมผัส สี และกลิ่น ดังนั้นจึงต้องคัดเลือกวัตถุดิบที่จะนำมาใช้ในการผลิตกะปิเจเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับ

ถั่วเหลืองถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกะปิเจ เนื่องจากผลิตภัณฑ์จากการหมักถั่วเหลืองที่ได้นั้นมีลักษณะคล้ายกะปิที่ขายในท้องตลาดโดยเฉพาะในแง่ของกลิ่น เพื่อคัดหัวเชื้อที่มีความสามารถในการหมักถั่วเหลืองให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่น่าพอใจมากที่สุด ไอโซเลทที่ปลอดภัยและไม่ก่อให้เกิดโรค 8 ชนิดได้แก่ IS4, CM1, RY1, TD1, NW1, SC1, TISTR001 และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

TISTR 010 ถูกนำมาหมักถั่วเหลือง จากนั้นตรวจสอบสารให้กลิ่นที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับกลิ่นของกะปิกุ้งและกะปิเจที่มีขายในท้องตลาด โดยเทคนิค SPME และ GC-MS และใช้การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis) และการจัดกลุ่ม (cluster analysis) ในการแยกผลิตภัณฑ์หมักชนิดต่างๆเป็นกลุ่ม ตามสารให้กลิ่นที่เป็นองค์ประกอบหลักเหมือนกัน พบว่าสามารถแยกตัวอย่างได้ 4 กลุ่ม โดยที่กลุ่มที่ 1 ได้แก่กะปิเจจากถั่วเหลือง S1, S2, S5, S6, S7 และ S8 ที่ผลิตจากไอโซเลท IS4, CM1, NW1, SC1, TISTR001 และ TISTR010 ตามลำดับ โดยได้ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับกะปิเจ ที่ขายในท้องตลาดทั้ง 3 ชนิด ซึ่งสารให้กลิ่นที่เป็นองค์ประกอบหลักในกลุ่มนี้ได้แก่ indole, S-containing compounds และ N-containing compounds ในขณะที่ กะปิจากถั่วเหลือง S3, S4 (หมักจากไอโซเลท RY1 และ TD1) ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม 2, กะปิกุ้ง K1 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม 3 และ กะปิกุ้ง K2, K3 จัดอยู่ในกลุ่ม 4 อย่างไรก็ตามจากการประเมินทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation) พบว่า S1 ให้กลิ่นคล้ายกะปิและได้คะแนนสูงโดยคะแนนที่ได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ จึงกล่าวได้ว่า *B. subtilis* IS4 สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตกะปิเจจากถั่วเหลืองและสามารถใช้แทนกะปิกุ้งได้

ในการศึกษานี้ ได้ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของเอนไซม์, กลิ่น, การเกิดสี, ปริมาณฟีโนลิครวม, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณไอโซฟลาโวน ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักกะปิเจจากถั่วเหลืองด้วยหัวเชื้อ *B. subtilis* IS4 และ *B. amyloliquefaciens* RY1 พบว่า การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ (β-glucosidase, α-amylase และ protease) มีแนวโน้มที่คล้ายกันด้วยการหมักจากหัวเชื้อตั้งต้นทั้ง 2 ชนิด โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงสุดสามารถสังเกตได้ระหว่างวันที่ 2-4 ของการหมัก ในแง่ของการสร้างสารให้กลิ่น พบว่า กลิ่นที่เป็นองค์ประกอบหลักที่พบในเชื้อทั้ง 2 ชนิดคือ aldehydes และ N-containing compounds อย่างไรก็ตาม เชื้อ *B. subtilis* IS4 ยังมี acids/esters เป็นองค์ประกอบหลัก และ เชื้อ *B. amyloliquefaciens* RY1 ก็ยังพบ alcohol เป็นองค์ประกอบหลักด้วย นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงการเกิดสีที่วัดโดยค่าของ L^*, a^* และ b^* ตามระบบ CIE ยังสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของสีน้ำตาล (browning) และ fluorescence intensity ในกะปิจากถั่วเหลืองที่หมักโดยทั้ง 2 เชื้อ และทั้งนี้ยังพบว่าระหว่างการหมักกะปิจากถั่วเหลืองโดยเชื้อทั้ง 2 ชนิด ปริมาณสารฟีโนลิครวม, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้นระหว่างการหมักและมีความสัมพันธ์กัน ถึงแม้ว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณไอโซฟลาโวนทั้ง glucoside isoflavone (daidzine, genistin) และ aglycone isoflavone (daidzein, genistein) จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยใน ช่วงแรกของการหมัก และหลังจากนั้นพบว่ามีการลดลง ของปริมาณไอโซฟลาโวนไปจนสิ้นสุดการหมัก แต่สารอนุพันธ์ของไอโซฟลาโวนดังกล่าว ก็อาจมีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า *B. subtilis* IS4 และ *B. amyloliquefaciens* RY1 สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตกะปิเจจากถั่วเหลือง ที่เพิ่มคุณค่าทางอาหารในแง่ของการเพิ่มของปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในกะปิเจถั่วเหลือง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved