การคัดเลือกเชื้อ *Aspergillus oryzae* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ทนเกลือ เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมน้ำปลา

Selection of *Aspergillus oryzae* Producing Salt-Tolerant Enzymes for Fish Sauce Industry

อาคม หวานนุ่น

Akom Wannun

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University
2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกเชื้อ *Aspergillus oryzae* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ทนเกลือเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมน้ำปลา

ผู้เขียน นายอาคม หวานนุ่น

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรียานุช บวรเรืองโรจน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

……..
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ สันตินานาเลิศ)

คณะกรรมการสอบ

……..ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

.....……กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรียานุช บวรเรืองโรจน์)

.....…….……กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ สันตินานาเลิศ)

…….……..……..…...กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณกัญภัทร จินดา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

……..……
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกเชื้อ *Aspergillus oryzae* สายพันธุ์ที่ทนเกลือ เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมน้ำปลา

ผู้เขียน นายอาคม หวานนุ่น

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2551

บทคัดย่อ

จากการคัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus oryzae* จำนวน 10 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จาก โคจิซีอิ๊วของโรงงานซีอิ๊วในจังหวัดสงขลาจำนวน 2 สายพันธุ์ เชื้อจากภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จำนวน 3 สายพันธุ์ และเชื้อจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จำนวน 5 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสที่ทนเกลือสูงได้ดี บนอาหาร sodium caseinate agar สำหรับเอนไซม์โปรติเอส และอาหาร Czapex's agar โดยใช้ soluble starch แทน saccharose สำหรับเอนไซม์แอมิเลส ที่ดัดแปลงโดยการเติมเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 และ *A. oryzae* MI PSU1 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุด ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นเกลือ 15เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำเชื้อราที่คัดเลือกได้มาผลิตเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสแบบโคจิ โดยใช้อาหารที่แตกต่างกัน 5 ชนิด คือ ถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง ข้าวสาลี ข้าวเจ้า และรำข้าวเจ้า ที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 45 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เชื้อรา *A. oryzae* สายพันธุ์ TISTR 3083 สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอส ได้สูงกว่า สายพันธุ์ MI PSU1 บนอาหารรำข้าวเจ้า แต่เชื้อราสายพันธุ์ MI PSU1 สามารถสร้างเอนไซม์แอมิเลสได้สูงกว่าสายพันธุ์ TISTR 3083 บนอาหารรำข้าวเจ้าเช่นเดียวกัน

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *A. oryzae* สายพันธุ์ TISTR 3083 คือ ใช้รำข้าวเจ้าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 45 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสได้สูงสุด 4,375.60 และ 141.56 U/g dry koji ตามลำดับ และมีสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลส ที่พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และพบว่า เกลือแกง (NaCl) มีผลยับยั้งทั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสของเชื้อรา อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มปริมาณเกลือ 30 เปอร์เซ็นต์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสยังคงเหลืออยู่ 8.95 และ 19.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสมีความคงทนต่อพีเอชได้ดีที่พีเอช 6.0 – 7.0 และ 7.0 - 9.0 ตามลำดับ และมีความ

คงทนของอุณหภูมิอยู่ในช่วง 30 และ 30 - 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในสภาพที่มีเกลือแกง 25 เปอร์เซ็นต์

การผลิตโคจิเพื่อใช้ในการหมักน้ำปลา โดยเลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3083 บนรำข้าวเจ้าที่มีความชื้นเริ่มต้น 45 เปอร์เซ็นต์ และมีพีเอชเริ่มต้น 7.0 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 600 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้โคจิที่มีกิจกรรมโปรติเอสเท่ากับ 4,208 U/g dry koji ในเวลา 4 วัน

การหมักน้ำปลาจากปลากะตัก (*Stolephorus* sp.) โดยใช้โคจิปริมาณต่างๆ คือ 20, 15, 10, 5 และ 0 เปอร์เซ็นต์ เกลือป่น 25 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ในการทดลองที่หมักโดยเติมโคจิ 5 เปอร์เซ็นต์ จะได้น้ำปลาที่มีคุณภาพดีในเวลาหมักเพียง 4 เดือน โดยน้ำปลาที่หมักได้มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระสูงถึง 8,530.70 มิลลิกรัม/100มิลลิลิตร พีเอช 5.4 มีสีน้ำตาลอมแดง ความเข้มสีจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เท่ากับ 2.39 มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 27.03 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณ total nitrogen 20.97 กรัมต่อลิตร และจากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของกลุ่มตัวอย่างผู้บริโภค พบว่าน้ำปลาที่หมักโดยการเติมโคจิ 5 เปอร์เซ็นต์ ได้รับการยอมรับทั้งทางด้าน กลิ่น สี รสชาติ และความชอบโดยรวมมากกว่าน้ำปลาที่ไม่เติมโคจิอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ น้ำปลาที่เติมโคจิ 10 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น การใส่โคจิร่วมในการหมักน้ำปลามีผลเร่งกระบวนการย่อยสลายโปรตีน กระบวนการเกิดสี และกระบวนการเกิดกลิ่นและรสชาติของน้ำปลาได้

Thesis Title Selection of *Aspergillus oryzae* Producing Salt-Tolerant Enzymes for Fish Sauce Industry

Author Mr. Akom Wannun

Major Program Microbiology

Academic Year 2008

Abstract

Ten strains of *Aspergillus oryzae* comprising two strains isolated from soy sauce in Songkhla province, three strains from culture collection of Department of Microbiology, Prince of Songkla University, HatYai Campus and five strains from Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR). All strains of *A. oryzae* were screened for salt-tolerant protease and amylase on modified sodium caseinate agar medium and modified Czapex's agar with soluble starch fill in saccharose added with NaCl concentrations: 0, 5, 10, 15 and 20%. *A. oryzae* TISTR 3083 and *A. oryzae* MI PSU 1 exhibited highest activity of protease at 15% NaCl, respectively.

In addition, the proteases and amylase production of these two strains in koji-type process with various substrates: soy bean, defatted soy bean, wheat, rice and rice bran were investigated. *A. oryzae* TISTR 3083 exhibited protease activity higher than *A. oryzae* MI PSU 1 on rice bran koji when the initial moisture content was adjusted to 45%. On the other hand, *A. oryzae* MI PSU 1 could produce amylase activity higher than *A. oryzae* TISTR 3083 on rice bran koji.

The optimal condition for the highest enzymes production from *A. oryzae* TISTR 3083 were investigated in rice bran with initial moisture content of 45%, initial pH 7.0 at 30 $^{\circ}$C for 4 days. In addition, the highest protease and amylase activity of 4,375.60 and 141.56 U/g dry koji were obtained. The optimal pH for protease and amylase activity were 8.0 and temperatures were 40 and 45 $^{\circ}$C, respectively. Sodium chloride showed inhibition effect on protease and amylase activity. However, the protease and amylase activity were 8.95 and 19.98%, respectively when NaCl concentration was increased up to 30%. The pH stability of protease and amylase were 6-7 and 7-9, temperature were 30 and 30-55 $^{\circ}$C, respectively together with 25% NaCl at room temperature.

The activity of proteases in koji production for fish sauce fermentation using *A. oryzae* TISTR 3083 grown on rice bran medium with initial moisture content of 45%, initial pH 7.0 at 30 $^{\circ}$C in 600 ml Erlenmeyer flask for 4 days was 4,208 U/g dry koji.

Fish sauce fermentation was carried out using Pla Katak (*Stolephorus* sp.) with koji at different concentrations: 20, 15, 10, 5 and 0%, and 25% of fine powdered salt and incubated at room temperature. The results indicated that fish sauce fermentation with 5% of koji produced the best quality of fish sauce within 4 months of fermentation. It had a characteristic of clear and reddish-brown liquid, an absorbance of 2.39 at 420 nm, pH of 5.4 and sodium chloride content of 27.03%. The amount of free amino acid content was 8,530.7 mg/100ml and amount of total nitrogen was 20.97 g/l. In addition, sensory test were evaluated by using hedonic scale. The results showed that fish sauce prepared with 5% koji had scores significantly different in color, aroma, flavor and overall acceptance compared to sample with no koji at 95% confidence Interval ($p<0.05$) followed by fish sauce with 10% koji. Therefore, Fish sauce prepared with koji could be accelerate protein hydrolyzing process, color development process, as well as flavor and aroma creating process.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(12)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(15)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	24
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	25
วัสดุอุปกรณ์	25
วิธีการทดลอง	26
3. ผลการทดลอง	35
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	76
5. สรุปผลการทดลอง	82
เอกสารอ้างอิง	84
ภาคผนวก ก	92
ภาคผนวก ข	94
ภาคผนวก ค	103
ภาคผนวก ง	122
ประวัติผู้เขียน	123

รายการตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. ปลาชนิดต่างๆ ที่ใช้ทำน้ำปลา 6
2. คุณลักษณะทางฟิสิกส์และเคมี 8
3. คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำปลาตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรมฉบับที่678 พ.ศ.2526 14
4. เปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนระหว่างน้ำปลาเวียดนามและน้ำปลาไทย 15
5. คุณภาพน้ำปลาพื้นเมืองของไทยระดับต่างๆ 16
6. องค์ประกอบทางเคมีในระหว่างการหมักน้ำปลาของไทย 18
7. ส่วนประกอบชุดที่ 1 ในการทดลองหมักน้ำปลาโดยใช้โคจิและเกลือเริ่มต้นการหมักปริมาณต่างๆ 33
8. ส่วนประกอบชุดที่ 2 ในการทดลองหมักน้ำปลาโดยใช้รำข้าวเจ้าและเกลือเริ่มต้นการหมักปริมาณต่างๆ 34
9. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนเกลือ ของเชื้อ *A. oryzae* สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเติมเกลือในอาหาร (PDA) ที่ความเข้มข้น 0 – 25% และบ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน 37
10. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอมิเลสทนเกลือ ของเชื้อ *A. oryzae* สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเติมเกลือในอาหาร Czapex's agar ที่ความเข้มข้น 0 – 25% และบ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน 38
11. ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในน้ำปลาที่หมักจากปลากะตักที่เติมโคจิปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน และน้ำปลาที่หมักตามธรรมชาติ 74
12. ค่าเฉลี่ยของผลการประเมินทางประสาทสัมผัสของน้ำปลาแต่ละชนิด 75

ตารางผนวกที่

1. การผลิตเอนไซม์โปรติเอส (U/g dry Koji) ของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 (a) และ *A. oryzae* MI PSU1 (b) เมื่อเลี้ยงบนสับสเตรท 5 ชนิด คือ กากถั่วเหลือง ถั่วเหลือง รำข้าวเจ้า ข้าวสาลี และข้าวเจ้าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน 103

2. การผลิตเอนไซม์แอมิเลส (U/g dry Koji) ของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 (a) และ *A. oryzae* MI PSU1 (b) เมื่อเลี้ยงบนสับสเตรท 5 ชนิด คือ กากถั่ว-เหลือง ถั่วเหลือง รำข้าวเจ้า ข้าวสาลีและข้าวเจ้า ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน 104
3. ผลของความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 เมื่อเลี้ยงบนรำข้าวเจ้าที่ปรับความชื้นเป็น 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 % ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน 105
4. ผลของพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 เมื่อเลี้ยงบนรำข้าวเจ้าที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 45 % และปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน 106
5. ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 เมื่อเลี้ยงบนรำข้าวเจ้าที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 45 % และปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40 และ 45 $^{\circ}$C ตามลำดับ เป็นเวลา 7 วัน 107
6. ผลของการวิเคราะห์หา Formaldehyde Nitrogen ของน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิรำข้าวเจ้าปริมาณต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน 108
7. ผลของการวิเคราะห์หา Formaldehyde Nitrogen ของน้ำปลาที่หมักโดยเติมรำข้าวเจ้าปริมาณต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน 109
8. ผลการวิเคราะห์หา Total Nitrogen ของน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิรำข้าวเจ้าปริมาณต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 เดือน 110
9. ผลการวิเคราะห์หา Total Nitrogen ของน้ำปลาที่หมักโดยเติมรำข้าวเจ้าปริมาณต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 เดือน 110
10. ผลการวิเคราะห์ค่าพีเอชของน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิรำข้าวปริมาณต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน 111

11. ผลการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์เกลือของน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิรำข้าวปริมาณต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน 112
12. ผลการวิเคราะห์สีของน้ำปลาที่หมักได้ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm โดยเติมโคจิรำข้าวเจ้าปริมาณต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน 113
13. ค่า factor ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ต่างๆ 114
14. ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA post-hoc comparison of means (Duncan's multiple range test) ของสีน้ำปลา 114
15. ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA post-hoc comparison of means (Duncan's multiple range test) ของกลิ่นน้ำปลา 116
16. ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA post-hoc comparison of means (Duncan's multiple range test) ของรสชาติน้ำปลา 117
17. ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA post-hoc comparison of means (Duncan's multiple range test) ของความชอบรวมของน้ำปลา 119
18. ผลการวิเคราะห์ Proximate Analysis ของปลากะตักที่ใช้ในการหมักน้ำปลา 121

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	ปลากะตัก (*Stolephorus* sp.)	7
2.	ขั้นตอนการหมักน้ำปลา (บุญศรี, 2533)	11
3.	บ่อหมักน้ำปลา	12
4.	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (U/g dry Koji) ของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 (a) และ *A. oryzae* MI PSU1 (b) เมื่อเลี้ยงบนสับสเตรท 5 ชนิด คือกากถั่วเหลือง ถั่วเหลือง รำข้าวเจ้า ข้าวสาลีและข้าวเจ้า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	40
5.	กิจกรรมเอนไซม์แอมิเลส (U/g dry Koji) ของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 (a) และ *A. oryzae* MI PSU1 (b) เมื่อเลี้ยงบนสับสเตรท 5 ชนิด คือ กากถั่วเหลือง ถั่วเหลือง รำข้าวเจ้า ข้าวสาลีและข้าวเจ้า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	41
6.	ความชื้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 เมื่อเลี้ยงบนรำข้าวที่ปรับความชื้นเป็น 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 % ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	43
7.	พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 เมื่อเลี้ยงบนรำข้าวเจ้าที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 45 % และปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	45
8.	อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 เมื่อเลี้ยงบนรำข้าวเจ้าที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 45 % และปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40 และ 45 $^{\circ}$C ตามลำดับ เป็นเวลา 7 วัน	46
9.	พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 ที่เลี้ยงบนรำข้าวเจ้า บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน	49
10.	อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 ที่เลี้ยงบนรำข้าวเจ้า บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน	50

11. ผลของความเข้มข้นเกลือ(NaCl) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 ที่เลี้ยงบนรำข้าวเจ้า บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน 52
12. ผลของพีเอชต่อความคงทนของเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 เมื่อเลี้ยงบนรำข้าวเจ้า ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน 54
13. ผลของอุณหภูมิ ต่อความคงทนของเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 เมื่อเลี้ยงบนรำข้าวเจ้า ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน 56
14. ผลของความเข้มข้นเกลือต่อความคงทนของเอนไซม์โปรติเอส (a1และ a2) และ แอมิเลส (b1และ b2) ของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 เมื่อเลี้ยงบนรำข้าวเจ้าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน 58
15. โคจิที่ผลิตได้จากเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3083 เมื่อเลี้ยงบนรำข้าวเจ้าที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 45% พีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 4 วัน 60
16. การเจริญ การผลิตเอนไซม์โปรติเอส และการเปลี่ยนแปลงความชื้น ของเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3083 ที่เลี้ยงบนอาหารรำข้าวเจ้า ในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 600 ml บ่มที่อุณหภูมิ30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วันเพื่อนำไปใช้ในการหมักน้ำปลา 61
17. น้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิปริมาณต่างๆกัน เมื่อหมักเป็นเวลา 2 เดือน 62
18. น้ำปลาที่หมักโดยเติมรำข้าวเจ้าปริมาณต่างๆกัน เมื่อหมักเป็นเวลา 2 เดือน 62
19. ผลการวิเคราะห์หา Formaldehyde Nitrogen ของน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิ (a) และรำข้าวเจ้า (b) ที่ปริมาณต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 เดือน 64
20. ผลการวิเคราะห์หา Total Nitrogen ของน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิ (a) และรำข้าวเจ้า (b) ที่ปริมาณต่างๆ กัน คือ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 เดือน 67
21. เปรียบเทียบปริมาณ Total Nitrogen ของน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิ และรำข้าเจ้า ในปริมาณต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมอห้อง เป็นเวลา 4 เดือน 68
22. การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของน้ำปลาที่หมักได้ โดยการเติมโคจิ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน 69
23. การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์เกลือของน้ำปลาที่หมักได้ โดยการเติมโคจิ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน 70

24. สีของน้ำปลาที่หมักจากปลากะตักที่ไม่เติมโคจิและเติมโคจิ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน 72
25. การเปลี่ยนแปลงสีของน้ำปลาที่หมักจากปลากะตักที่ไม่เติมโคจิและเติมโคจิ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน 72
26. กราฟมาตรฐานของไทโรซีน 95

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

น้ำปลาเป็นเครื่องปรุงรสอาหารที่นิยมกันอย่างกว้างขวางในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งได้แก่ เวียดนาม ไทย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย สิงคโปร์ ลาว กัมพูชา ญี่ปุ่น อินโดนีเซีย และพม่า และปัจจุบันน้ำปลาเริ่มได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นในประเทศแถบทวีปยุโรป และทางตอนเหนือของอเมริกา และอีกหลายๆประเทศ (Brillantes และคณะ, 2002) นอกจากนี้น้ำปลายังมีความสำคัญทางด้านโภชนาการและทางด้านเศรษฐกิจ โดยในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2525-2540 มูลค่าการส่งออกน้ำปลาของประเทศไทยได้เพิ่มสูงขึ้นทุกปี ประเทศไทยได้ส่งออกน้ำปลาเป็นสินค้าส่งออกไปจำหน่ายยังประเทศต่างๆ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น ฮ่องกง ฝรั่งเศส และออสเตรเลีย เป็นต้น (กรมศุลกากร กระทรวงการคลัง , 2540) สำนักข่าวไทย (2548) รายงานว่าศูนย์วิจัยกสิกรไทย คาดว่าในปี 2548 มูลค่าตลาดเครื่องปรุงรสอาหารในประเทศไทยมีขนาดใหญ่ถึง 9,700 ล้านบาท และมีอัตราการขยายตัวของตลาดในแต่ละปีเฉลี่ยร้อยละ 10 โดยเฉพาะน้ำปลา คาดว่ามูลค่าน้ำปลาในปี 2548 เท่ากับ 4,000 ล้านบาท โดยเฉพาะน้ำปลาแท้มีอัตราการขยายตัวร้อยละ 20-30 ขณะที่น้ำปลาผสมและน้ำปลาวิทยาศาสตร์เริ่มหายไปจากตลาด

ปัจจุบันการผลิตน้ำปลาในอุตสาหกรรมยังคงหมักโดยวิธีธรรมชาติแบบดั้งเดิม ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการหมักนานถึง 8 – 12 เดือน และคุณภาพน้ำปลาที่ได้ไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตน้ำปลาโดยวิธีการต่างๆ หลายวิธี งานวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิตน้ำปลาส่วนใหญ่จะมุ่งไปในเรื่องของการลดระยะเวลาของการหมักให้สั้นลงโดยวิธีการต่างๆ เช่น การใช้กรด – ด่าง การใช้อุณหภูมิสูง รวมถึงการใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ได้จากแหล่งต่างๆ เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งอาจจะเป็นเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นในห้องปฏิบัติการหรือเป็นเอนไซม์ที่ผลิตขายในทางการค้าซึ่งมีราคาแพง อย่างไรก็ตาม ปัจจัยสำคัญที่จะทำให้ผู้บริโภคยอมรับน้ำปลา ได้แก่ กลิ่นแ ละรสชาติ ทั้งนี้เนื่องจากสีของน้ำปลาสามารถปรุงแต่งได้ด้วยการใช้น้ำตาลเคี่ยวไหม้ (caramel) แต่กลิ่นและรสชาติของน้ำปลาแท้เกิดจากของผสมหลายชนิด จนยากที่จะปรุงแต่งตามต้องการได้ (Beddows และ Ardeshir, 1979) กลิ่นแระรสชาติของน้ำปลา เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมัก แต่น้ำปลาที่หมักตามวิธีธรรมชาติจะมีกลิ่นเฉพาะค่อนข้างแรง ซึ่งทำให้มีความจำกัดต่อความชอบของผู้บริโภคโดยเฉพาะชาวต่างประเทศ ได้มีผู้รายงานว่าการใช้กล้าเชื้อโคจิซีอิ๊วในการหมักน้ำปลาช่วยขจัดกลิ่นที่แรงลงได้และช่วยเพิ่มกลิ่นที่ดีให้กับน้ำปลา ซึ่งทำให้มีการยอมรับของผู้บริโภคน้ำปลาที่ผลิตโดยการใช้

กล้าเชื้อโคจิซีอิ๊วในการหมักมากกว่าการหมักโดยวิธีธรรมชาติ (Lee และคณะ, 1989; Kunimoto และคณะ, 1992 และ Uchida และคณะ, 2005)

นอกจากนี้ Uchida และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาผลของเอนไซม์จากโคจิถั่วเหลืองที่ใช้หมักซีอิ๊วต่อกระบวนการหมักน้ำปลา เปรียบเทียบกับการหมักน้ำปลาโดยที่ไม่เติมโคจิ โดยผลที่ได้คือ น้ำปลาที่หมักโดยการเติมโคจิจะมีองค์ประกอบทางเคมีของน้ำปลาที่สำคัญๆ สูงกว่าน้ำปลาที่ไม่เติมโคจิ เช่น สารประกอบอินทรีย์ ปริมาณไนโตรเจน กรดอินทรีย์ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งคือ มีชนิดและปริมาณกรดอ ะมิโนที่สูงกว่า จึงมีผลทำให้ได้น้ำปลาที่มีกลิ่นและรสชาติที่ดีกว่าน้ำปลาที่หมักโดยไม่เติมโคจิ

ต่อมาในปี 2006 Indoh และคณะ ได้ทำการศึกษาสมบัติของน้ำปลาที่หมักจากปลาแซลมอน โดยเปรียบเทียบระหว่างการหมักน้ำปลาร่วมกับโคจิที่ผลิตจากจมูกข้าวสาลี และหมักร่วมกับโคจิที่ผลิตจากถั่วเหลือง ซึ่งผลปรากฏว่า เมื่อหมักน้ำปลาจนครบ 3 เดือน น้ำปลาที่หมักร่วมกับโคจิที่ทำมาจากจมูกข้าวสาลีช่วยส่งเสริมให้น้ำปลามีปริมาณ ไนโตรเจน กรดแลคติก และเอทธานอลสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และสูงกว่าน้ำปลาที่หมักร่วมกับโคจิที่ทำมาจากถั่วเหลือง อีกทั้งยังมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่สูงกว่าด้วย ตัวอย่างเช่น glutamic acid

จากการศึกษาการใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนช่วยในการหมักน้ำปลาของ ปรียานุช (2548) พบว่า แบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นสูงสายพันธุ์ *Halobacterium salinalium* PB407 ที่แยกได้จากน้ำปลาไทยสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของเกลือที่ 4 M (24%, w/v) และได้ผลิตในรูปเอนไซม์ผง และทดลองเติมเอนไซม์โปรติเอสนี้ในการหมักน้ำปลา พบว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 1.5% จะช่วยลดระยะเวลาในการหมักน้ำปลาลงเหลือ 6 เดือน เมื่อเทียบกับการหมักแบบเดิมที่ใช้เวลาประมาณ 8 – 12 เดือน

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนากรรมวิธีการผลิตน้ำปลาให้มีระยะเวลาสั้นลงรวมถึงการปรับปรุงกลิ่นและรสชาติของน้ำปลาให้ดีขึ้น น่าที่จะทำได้โดยการใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนจากเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ปริมาณสูง ที่ความเข้มข้นเกลือสูง และไม่เป็นพิษในรูปกล้าเชื้อโคจิซีอิ๊ว เพื่อเร่งกระบวนการย่อยโปรตีนของเนื้อปลาจึงน่าจะมีประโยชน์ในการพัฒนากรรมวิธีการผลิตน้ำปลาทั้งในเรื่องของการลดระยะเวลาในการผลิต และในเรื่องของกลิ่นและรสชาติของน้ำปลาให้
เป็นที่ยอมรับในการบริโภคของทั้งชาวไทยและชาวต่างประเทศเพิ่มมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้แล้ว การผลิตเอนไซม์ทนเกลือจากเชื้อราโดยวิธีที่เตรียมโคจิยังเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และมีต้นทุนในการผลิตต่ำ

การตรวจเอกสาร

1.น้ำปลา

น้ำปลา (fish sauce) คือ ผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลว ใส สีเหลืองถึงน้ำตาล มีรสเค็ม ใช้ปรุงแต่งรสของอาหาร (Lopetcharat และคณะ, 2001) น้ำปลาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักปลากับเกลือในอัตราส่วน 2 : 1 หรือ 3 : 1 แล้วบ่มไว้ในโอ่ง หรือบ่อซีเมนต์ที่มีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 35 – 40 ^{o}C (Gildberg และ Thongthai, 2001; Saisithi, 1994) ในระหว่างกระบวนการหมักจะเกิดการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อปลาด้วยเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ในกระเพาะและ ลำไส้ของปลาเอง(autolytic action) (Sikorski และคณะ, 1995) ใช้เวลาในการหมักอย่างต่อเนื่องและเป็นเวลานาน จนแน่ใจว่ากระบวนการย่อยสลายเกิดขึ้นสมบูรณ์ เพื่อให้ได้น้ำปลาที่มีกลิ่น สี และรสชาติที่ดี ซึ่งน้ำปลาที่ผลิตขึ้นในประเทศไทยส่วนใหญ่จะใช้เวลาในการหมักไม่น้อยกว่า 18 เดือน (Lopetcharat และ Park, 2002) น้ำปลาเป็นเครื่องปรุงแต่งรสอาหารที่สำคัญและนิยมกันอย่างกว้างขวางของประชาชนในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แต่ละประเทศจะมีชื่อเรียกน้ำปลาหรือของเหลวซึ่งผลิตโดยวิธีการที่คล้ายคลึงกับการผลิตน้ำปลาแตกต่างกันออกไป เช่น เวียดนาม เรียกว่า Nuoc-mam กัมพูชา เรียกว่า Nuoc-mam-gua-ca พม่า เรียกว่า Ngam-ya-ye อินโดนีเซีย เรียกว่า Ketjap-Ikan มาเลเซีย เรียกว่า Budu สิงคโปร์ เรียกว่า Sambal-Ikam ฟิลิปปินส์ เรียกว่า Patis ญี่ปุ่น เรียกว่า Shottsuru ลาว เรียกว่า Nam-pa และไทย เรียกว่า Nam-pla (Park และคณะ, 2001)

ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 203(2543) ได้ให้คำกำจัดความของน้ำปลาไว้ว่า น้ำปลา หมายความว่า ผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวรสเค็มใช้ปรุงแต่งกลิ่นรสของอาหาร แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ดังต่อไปนี้

(1) น้ำปลาแท้ หมายความว่า น้ำปลาที่ได้จากการหมัก หรือย่อยปลา หรือส่วนของปลา หรือกากของปลาที่เหลือจากการหมักตามกรรมวิธีการผลิตน้ำปลา

(2) น้ำปลาที่ทำจากสัตว์อื่น หมายความว่า น้ำปลาที่ได้จากการหมัก หรือย่อยสัตว์อื่นซึ่งมิใช่ปลา หรือส่วนของสัตว์อื่นหรือกากของสัตว์อื่นที่เหลือจากการหมัก ตามกรรมวิธีการผลิตน้ำปลา และให้หมายความรวมถึงน้ำปลาที่ทำจากสัตว์อื่นที่มีน้ำปลาแท้ผสมอยู่ด้วย

(3) น้ำปลาผสม หมายความว่า น้ำปลาตาม (1) หรือ (2) ที่มีสิ่งอื่นที่ไม่เป็นอันตรายแก่ผู้บริโภคเจือปน หรือเจือจาง หรือปรุงแต่งกลิ่นรส ทั้งนี้หมายความรวมถึงน้ำปลาตาม (1) (2) หรือ (3) ที่ได้ระเหยน้ำออกด้วย

น้ำปลาแท้และน้ำปลาที่ทำจากสัตว์อื่น ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐาน ดังต่อไปนี้

(1) มีสี กลิ่น และรส ของน้ำปลาแท้หรือน้ำปลาที่ทำจากสัตว์อื่น แล้วแต่กรณี

(2) ใส ไม่มีตะกอน เว้นแต่ตะกอนอันเกิดขึ้นตามธรรมชาติไม่เกิน 0.1 กรัม ต่อน้ำปลา 1 ลิตร

(3) มีเกลือในน้ำปลา 1 ลิตร

(3.1) โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride) ไม่น้อยกว่า 200 กรัม

(3.2) กรณีที่ใช้เกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ผสมกับเกลือใน (3.1) หรือใช้เกลือโพแทสเซียมคลอไรด์อย่างเดียวให้มีปริมาณเกลือชนิดใดชนิดหนึ่งหรือทั้ง 2 ชนิดรวมกันแล้วไม่น้อยกว่า 200 กรัม

(4) มีไนโตรเจนทั้งหมดไม่น้อยกว่า 9 กรัม ต่อน้ำปลา 1 ลิตร

(5) มีไนโตรเจนจากกรดอ ะมิโนไม่น้อยกว่าร้อยละ 40 และไม่เกินร้อยละ 60 ของไนโตรเจนทั้งหมด

(6) มีกรดกลูตามิคต่อไนโตรเจนทั้งหมดไม่น้อยกว่า 0.4 แต่ต้องไม่เกิน 0.6

(7) ไม่ใช้สี เว้นแต่สีน้ำตาลเคี่ยวไหม้หรือสีคาราเมล

(8) ใช้วัตถุที่ให้ความหวานแทนน้ำตาลได้ตามมาตรฐานอาหาร เอฟ เอ โอ/ดับบลิว เอช โอ, โคเด็กซ์ (Joint FAO/WHO, Codex) ที่ว่าด้วยเรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร และฉบับที่ได้แก้ไขเพิ่มเติม

น้ำปลาผสม ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐาน ดังต่อไปนี้

(1) มีสี กลิ่น และรส ของน้ำปลาผสม

(2) ใส ไม่มีตะกอน เว้นแต่ตะกอนอันเกิดขึ้นตามธรรมชาติไม่เกิน 0.1 กรัม ต่อน้ำปลา 1 ลิตร

(3) มีเกลือในน้ำปลา 1 ลิตร

(3.1) โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride) ไม่น้อยกว่า 200 กรัม

(3.2) กรณีที่ใช้เกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ผสมกับเกลือใน (3.1) หรือใช้เกลือโพแทสเซียมคลอไรด์อย่างเดียวให้มีปริมาณเกลือชนิดใดชนิดหนึ่งหรือทั้ง 2 ชนิดรวมกันแล้วไม่น้อยกว่า 200กรัม

(4) มีไนโตรเจนทั้งหมดไม่น้อยกว่า 4 กรัม ต่อน้ำปลา 1 ลิตร

(5) มีกรดกลูตามิคต่อไนโตรเจนทั้งหมดไม่น้อยกว่า 0.4 แต่ต้องไม่เกิน 1.3

(6) ไม่ใช้สี เว้นแต่สีน้ำตาลเคี่ยวไหม้หรือสีคาราเมล

(7) ใช้วัตถุที่ให้ความหวานแทนน้ำตาลหรือใช้ร่วมกับน้ำตาลนอกจากการใช้น้ำตาลได้โดยใช้วัตถุที่ให้ความหวานแทน น้ำตาลได้ตามมาตรฐานอาหาร เอฟเอโอ/ดับบลิวเอชโอ, โคเด็กซ์ (Joint FAO/WHO, Codex) ที่ว่าด้วยเรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร

2.กระบวนการหมักน้ำปลา

1.วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักน้ำปลา

1.1 ปลา

วัตถุดิบที่สำคัญในกระบวนการผลิตน้ำปลา ได้แก่ ปลาสดและเกลือ โดยปลาที่จะใช้จะใช้ได้ทั้งปลาน้ำเค็มและน้ำจืด แต่การใช้ปลาน้ำจืดมาทำน้ำปลาจะทำให้ได้น้ำปลาที่มีกลิ่นและรสชาติด้อยกว่าการใช้ปลาน้ำเค็ม น้ำปลาคุณภาพดีเป็นน้ำปลาที่ผลิตจากปลาน้ำเค็มถึง 97 เปอร์เซ็นต์ เช่น ปลากะตัก (*Stolephorus* sp.) ปลาไส้ตัน (*Stolephorus* sp.) ปลาหลังเขียว (*Sardinella* sp.) ปลาทรายแดง (*Nemipterus* sp.) และปลาเบญจพรรณอื่นๆ ส่วนปลาน้ำจืดมีการนำมาใช้ในการผลิตน้ำปลาเพียง 3 เปอร์เซ็นต์ เช่น ปลาสร้อย (*Cirrhinus* sp.) ปลาตะเพียน (*Puntius* sp.) และปลาซิว (*Rasbora* sp.) เป็นต้น สำหรับปลาที่นิยมใช้ทำน้ำปลาในบางประเทศแสดงในตารางที่ 1 มักเป็นปลาทั้งตัว คือ มีอวัยวะภายในอยู่ด้วย เนื่องจากในการย่อยสลายปลาโดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนจะต้องอาศัยเอนไซม์ที่อยู่ในระบบการย่อยอาหารของปลานั่นเอง มีการรายงานว่ามีการใช้ปลาทั้งตัวเป็นวัตถุดิบจะใช้เวลาในการเกิดน้ำปลาน้อยกว่าการใช้ปลาที่ควักไส้ออก และมีปริมาณกระอะมิโนสูงกว่าปลาที่ควักไส้ออก (Greig และ Estrella, 1988)

น้ำปลาคุณภาพดีส่วนใหญ่จะผลิตจากปลากะตัก ซึ่งเรียกกันในภาษาอังกฤษว่า Anchovy (รูปที่ 1) เนื่องจากลักษณะเนื้อของปลากะตักจะแน่นและละเอียดกว่าปลาชนิดอื่นทำให้เมื่อนำมาทำน้ำปลาแล้วจะมีกลิ่นและรสชาติดี สีสวย เป็นน้ำปลาที่มีคุณภาพดีที่สุด (นงนุช , 2538) ปลากะตักเป็นปลาผิวน้ำขนาดเล็ก ชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง พบทุกจังหวัดชายทะเล ทั้งฝั่งอ่าวไทยและฝั่งอันดามัน มีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น ปลาไส้ตัน ปลาหัวอ่อน ปลานิ่วเกี๊ยะ และปลามะลิ ปลากะตักเป็นปลาที่เกล็ดหลุดง่าย ย่อยสลายเร็ว การใช้ประโยชน์ส่วนใหญ่นิยมนำมาเป็นวัตถุดิบในการทำน้ำปลา น้ำ บูดู ปลาตากแห้ง และปลาป่น เป็นต้น

ในปี 200 1 Park และคณะ ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำปลาที่ผลิตขึ้นในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่า น้ำปลาที่ผลิตขึ้นในประเทศญี่ปุ่นเวียดนาม และไทย และผลิตขึ้นจากปลากะตัก และปลาซาดีน มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำสำคัญของน้ำปลาอยู่สูงกว่าการหมักด้วยปลาชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะปริมาณไนโตรเจนที่สูง ซึ่งพบว่า มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเป็น 97.9% เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนจากเนื้อปลาที่เริ่มหมัก เช่นเดียวกับการศึกษาของ Gildberg และThongthai ในปี 2001 ซึ่งพบว่า น้ำปลาที่หมักด้วยปลากะตัก และ ปลาซาดีน เป็นน้ำปลาที่มีคุณภาพดี มีกลิ่น สี และรสชาติที่ดี ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคมากที่สุด

ตารางที่ 1 ปลาชนิดต่างๆ ที่ใช้ทำน้ำปลา

ประเทศ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ถิ่นอาศัย
ฮ่องกง	*Sphyraena* spp.	น้ำเค็ม
	Carangideae	น้ำเค็ม
	Sardinella aurita	น้ำเค็ม
	Teuthis albapuncanus	น้ำเค็ม
	Engranulis purava	น้ำเค็ม
อินโดนีเซีย (บอร์เนีย)	*Ciupea* spp.	น้ำเค็ม
	Stoleophorus spp.	น้ำเค็ม
	Osteochilus spp.	น้ำเค็ม
	Puntius spp.	น้ำเค็ม
	Ctenops spp.	น้ำเค็ม
ฟิลิปปินส์	*Stolephorus*	น้ำเค็ม
	commersonii	น้ำเค็ม
	Stolephorus indicus	น้ำเค็ม
	Clupeioides lile	น้ำเค็ม
	Sardinella perforate	น้ำเค็ม
	Sardinella longiceps	น้ำเค็ม
	Decapterus macrosoma	น้ำเค็ม
ไทย	*Stolephorus indicus*	น้ำเค็ม
	Stolephorus	น้ำเค็ม
	commersonii	น้ำเค็ม
	Rastrelliger tri	น้ำเค็ม
	Clupea spp.	น้ำเค็ม
	Sardinella spp.	น้ำเค็ม
	Cirrhinus spp.	น้ำเค็ม
เวียดนาม	*Stolephorus* spp.	น้ำเค็ม
	Clupeioides lile	น้ำเค็ม
	Engraulis mystax	น้ำเค็ม
	Decapterus spp.	น้ำเค็ม

ที่มา : ประเสริฐ สายสิทธิ์ (2527)

รูปที่ 1 ปลากะตัก (*Stolephorus* sp.)
ที่มา: http//:www.msnth.com/msn/new/economicchighlights/ articll.asp

1.2 เกลือ

ในกระบวนการหมักน้ำปลา เกลือเป็นวัตถุดิบสำคัญเช่นเดียวกับปลา เกลือที่ใช้มี 2 ชนิด คือ เกลือทะเล และเกลือสินเธาว์ โดยมากนิยมใช้เกลือทะเล เพราะมีความชื้นพอดีและสารประกอบจำพวกเกลือแร่ต่างๆ ในเกลือทะเล มีคุณค่าทางอาหารมาก ส่วนเกลือหินหรือเกลือสินเธาว์ซึ่งมีมากตามภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ถึงแม้จะมีความเค็มมากกว่า แต่มีความชื้นน้อยและสารจำพวกเกลือแร่ต่างๆ เกือบจะไม่มีคุณค่าทางอาหารเลย นอกจากนั้นยังทำให้เกิดปัญหาทางชีวเคมีในหารหมักน้ำปลาอีกด้วย จุลินทรีย์ที่พบในเกลือทะเลส่วนใหญ่เป็น *Bacillus*, *Micrococcus*, *Sarcina* และ *Halobacterium* สำหรับเกลือสินเธาว์ จุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่ 70 เปอร์เซ็นต์ คือแบคทีเรียในกลุ่ม *Micrococcus* ส่วน *Corynebacterium* พบ 20 เปอร์เซ็นต์ และ *Bacillus* พบเพียง 4 เปอร์เซ็นต์ ส่วน จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับเกลือโดยที่มักจะทำให้อาหารเน่าเสียมีกลิ่นไม่ดีมักจะพบ *Sarcina litoralis* และ *Pseudomonas* เนื่องจากเอนไซม์ Cystein desulphydrase ถูกผลิตโดย *Pseudomonas* จะย่อยสลายโปรตีนให้เป็นสารอินโดลและไฮโดรเจนซับไฟด์ (กฤษดา, 2529)

ในปี 1967 Voskresensky ได้อธิบายการซึมซาบของเกลือเข้าไปในเนื้อปลา ซึ่งเริ่มโดยวิธีการ Osmosis น้ำในตัวปลาจะถูกขับออกมาในขณะที่เกลือซึมซาบเข้าไปแทนที่ ในระยะสุดท้ายเกลือจะเข้าไปทดแทนน้ำหนักที่หายไป ทำให้น้ำหนักเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนความเข้มข้นของเกลือภายในเท่ากับน้ำเกลือภายนอก เนื้อปลาจะเปลี่ยนแปลงไป คือ เนื้อแข็งและเปราะ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เกลือจะซึมซาบเข้าเนื้อปลาได้เร็วที่สุดตามธรรมชาติและเสียคุณสมบัติเนื่องจากกระบวนการ Salting out ดังนั้นจุลินทรีย์จึงหยุดการเจริญ ซึ่งบทบาทของเกลือที่มีต่อแบคทีเรียทั้งทางตรงและทางอ้อมคือ

1.ทำให้เกิดแรงดันออสโมซิส (Osmosis) ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียเกิดการสูญเสียน้ำ (Plasmolysis) ได้รับอันตรายถึงตายหรือชะงักการเจริญ

2.ดึงความชื้นออกจากอาหารซึ่งจะเป็นการควบคุมปริมาณของน้ำในอาหารเนื่องจากแบคทีเรียแต่ละชนิดต้องการปริมาณน้ำในอาหารสำหรับการเจริญ

3.การแตกตัว (Ionization) ของเกลือ (NaCl) ทำให้ได้โซเดียมไอออน (Na^+) และคลอไรด์ไอออน (Cl^-) ซึ่งเป็นตัวอันตรายต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่ไวต่ออิออนชนิดนั้นๆ โดยโซเดียมไอออน (Na^+) จะไปทำปฏิกิริยากับโปรโตพลาสมิค (Protoplasmic anion) ของเซลล์ ทำให้แบคทีเรียตายและคลอไรด์ไอออน (Cl^-) จะไปรวมตัวกับสารที่มีกลุ่มซัลไฟด์ดริล (- SH) ทำให้สารนั้นไม่สามารถถ่ายเทกลุ่มเอซิล (Acyl) ได้

4.ขัดขวาง (Interfere) การทำงานของเอนไซม์ที่จะย่อยสลายโปรตีน

5.การละลายเกลือช่วยลดการแพร่หรือการผ่านของออกซิเจนดังนั้นจึงทำให้มีปริมาณของออกซิเจนน้อยลงแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนจึงเจริญได้ยาก

จากการศึกษาของ Kumalaningsib ในปี 1986 พบว่าการใช้เกลือ 30 เปอร์เซ็นต์ในการหมักน้ำปลาจะได้น้ำปลาที่มีคุณภาพดีกว่าการใช้เกลือ 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ แต่การใช้เกลือที่ความเข้มข้นของเกลือสูงเกินไปจะทำให้การย่อยสลายเกิดขึ้นได้ช้าและในขณะที่ใช้เกลือที่มีความเข้มข้นต่ำเกินไปก็จะทำให้เกิดการเน่าเสียได้

คุณลักษณะโดยทั่วไปของเกลือแบ่งออกได้ดังนี้

1.เกลือบริโภคชนิดผง ต้องมีลักษณะเป็นเม็ดละเอียดหรือเป็นผงไม่มีสิ่งปนเปื้อนที่มองเห็นได้

2.เกลือบริโภคชนิดป่น ต้องมีลักษณะเป็นเม็ดเล็ก ๆ มีสีตามธรรมชาติ ไม่มีสิ่งปนเปื้อนที่มองเห็นได้ เช่น ดิน กรวด ทราย

3.เกลือบริโภคชนิดเม็ด ต้องมีลักษณะเป็นเม็ด หยาบ มีสีตามธรรมชาติ ไม่มีสิ่งปนเปื้อนที่มองเห็นได้ เช่น ดิน กรวด ทราย

คุณลักษณะทางฟิสิกส์และเคมีของเกลือ ต้องเป็นไปตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 คุณลักษณะทางฟิสิกส์และเคมีของเกลือ

รายการที่	คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด		
		ชนิดผง	ชนิดป่น	ชนิดเม็ด
1	ความชื้น ร้อยละไม่เกิน	4.0	6.0	7.0
2	สารที่ไม่ละลายน้ำ ร้อยละไม่เกิน	0.1	0.3	0.5
3	โซเดียมคลอไรด์ ร้อยละไม่น้อยกว่า	96.0	94.0	93.0
4	สารประกอบของไอโอดีน (คิดเป็นไอโอดีน) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	30.0	30.0	30.0

หมายเหตุ - เกณฑ์ที่กำหนดคำนวณจากน้ำหนักเกลือบริโภคตัวอย่างที่ได้ทำแห้งแล้วยกเว้นรายการที่ 1 ความชื้น

- คุณลักษณะในรายการที่ 4 สารประกอบของไอโอดีนใช้เฉพาะเกลือบริโภคเสริมไอโอดีน

2.วิธีการหมักน้ำปลาตามวิธีการพื้นเมือง

นำปลาที่ได้มาล้าง เพื่อให้น้ำคาวปลา เลือด และโคลนตมออก ถ้าตัวปลายังมีคาวและไม่เปียกจะเกิดลักษณะที่เรียกว่า "ไม่กินเกลือ" คือ เกลือจะแทรกซึมเข้าไปในตัวปลาน้อยหรือเข้าไปไม่ได้เลยเนื่องจากผิวปลาแห้ง จะทำให้ปลาบวมและเน่าในที่สุด เมื่อล้างปลาแล้วจึงนำมาคลุกเคล้ากับเกลือ โดยใช้เกลือในอัตรา 1 ส่วนต่อปลา 1 ถึง 4 ส่วน ปริมาณเกลือที่ใช้ทำน้ำปลาในทางปฏิบัติจริงๆ นั้นไม่แน่นอน แต่โดยทั่วๆ ไปมักใช้เกลือมากกว่าความจำเป็น ถ้าใช้เกลือมากปลาจะแข็งตัวไม่เละ เมื่อได้น้ำปลาแล้วตัวปลายังขายเป็นปลาร้าได้อีก

การใส่เกลือปลาด้วยเกลือเม็ดเป็นวิธีที่ง่ายที่สุด และใช้ได้ดีทั้งปลาเล็กและปลาใหญ่ การโรยเกลือบนปลาหรือคลุกเคล้าปลากับเกลือจะต้องให้เกลือกระจายทั่วตัวปลาทุกตัว เพราะการซึมซาบของเกลือช้ามาก ถ้ามีส่วนเล็กๆ ส่วนใดส่วนหนึ่งที่ไม่ถูกเกลือก็อาจจะเกิดการเน่าเสียตรงส่วนนั้นได้

เมื่อคลุกเคล้าปลากับเกลือเข้ากันดีแล้วจึงนำไปบรรจุในภาชนะ ซึ่งอาจเป็น ไห โอ่ง หรือบ่อซีเม็นต์ (รูปที่ 3) ภาชนะที่ใช้บรรจุปลาจะมีเกลือจำนวนหนึ่งรองอยู่ก่อนแล้ว เพราะเมื่อปลาถูกเกลือจะเริ่มคายน้ำออกมา แต่ถ้าน้ำที่คายออกมาไม่เค็มพอจะทำให้ปลาที่อยู่ ใกล้กับน้ำที่ไม่เค็มมีสีดำคล้ำและอาจทำให้น้ำปลามีกลิ่นตุๆ หรือเสียได้ เมื่อบรรจุส่วนผสมของปลาและเกลือแล้วต้องโรยเกลือทับชั้นบน เพื่อป้องกันไม่ให้ปลาชั้นบนเน่าเสียเพราะไม่ถูกกับน้ำเกลือที่เกิดขึ้น จากนั้นเอาเสื่อลำแพน หรือกากไผ่ หรือถุงพลาสติก คลี่ปิดข้างบนกันแมลงลงไปไข่ ปล่อยทิ้งไว้ 1 วัน ปลาจะคายน้ำและยุบตัวลงประมาณร้อยละ 20 เมื่อปลายุบตัวลงแล้วให้ใช้ไม้ขัด โดยวางเรียงไม้ขัดลงบนเสื่อลำแพน หรือกากไผ่ หรือถุงพลาสติก แล้วจึงทับด้วยหินก้อนโตๆ เพื่อกันปลาลอยพ้นน้ำเกลือขึ้นมาเวลาเกินน้ำปลา

เมื่อหมักไปประมาณ 2 – 4 เดือน น้ำเกลือข้างบนซึ่งแต่ก่อนใสจะค่อยๆ กลายเป็นสีเหลืองมัวๆ แล้วค่อยๆ กลายเป็นสีน้ำตาลแดง ปล่อยให้หมักต่อไปจนครบอายุครบการหมัก ซึ่งโดยทั่วๆ ไปประมาณหนึ่งปี กล่าวกันว่าถ้าถังหมักปลาได้รับแสงบ้างจะทำให้ได้น้ำปลาเร็วขึ้น แต่ไม่ควรให้ถูกแสงแดดจัด จะทำให้เนื้อปลาร้อน

จนสุก แบคทีเรียจะไม่ทำปฏิกิริยากับเนื้อปลาสุก หรือทำปฏิกิริยาได้น้อยมาก ทำให้กลิ่น รสของน้ำปลาไม่ดีเท่าที่ควร ผู้ชำนาญการเท่านั้นที่จะบอกได้ว่าน้ำปลาหมักได้ที่แล้ว จากนั้นก็สูบหรือไขออกมา

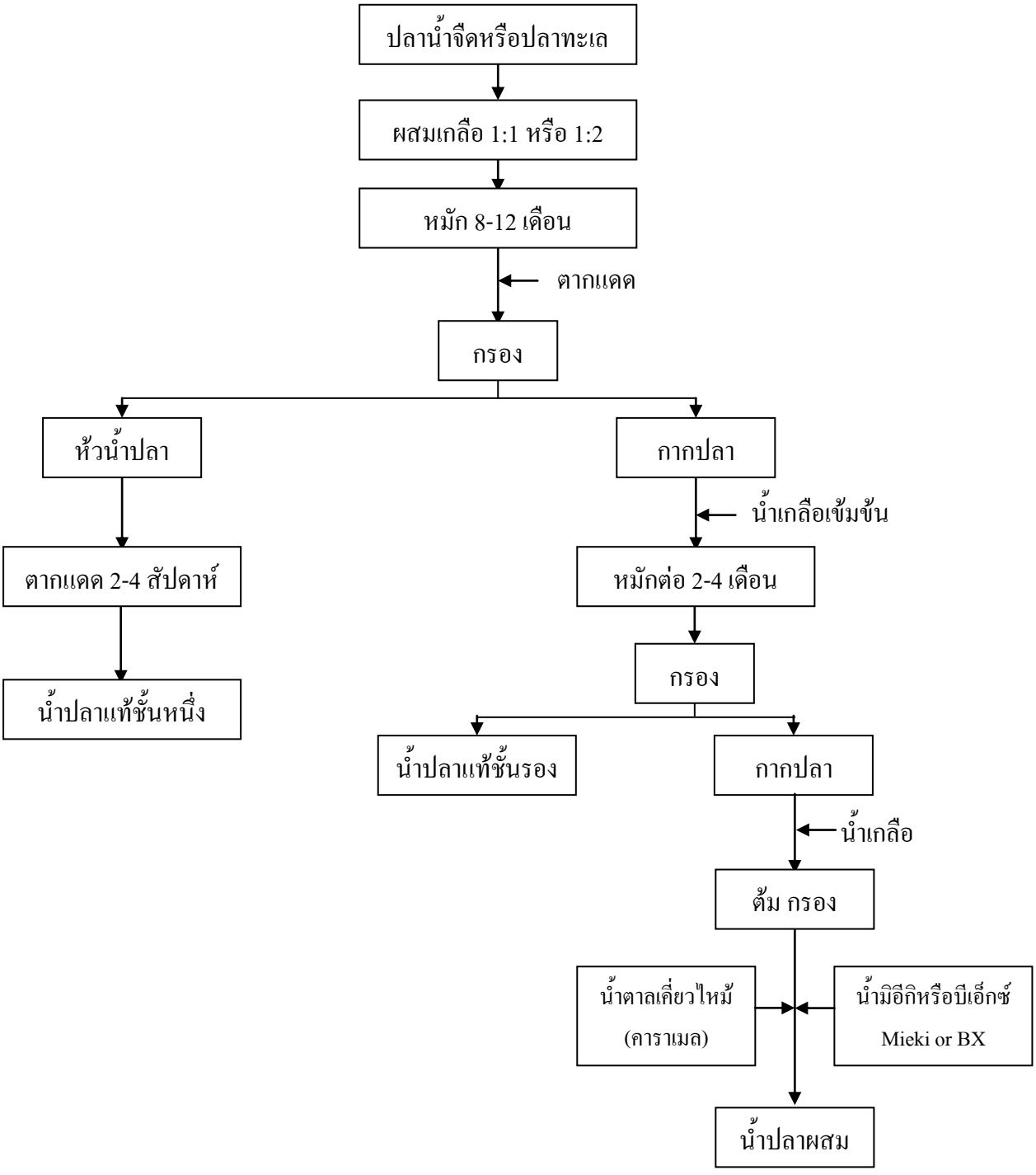
น้ำปลาที่ได้คราวแรกนี้จะมีสีน้ำตาลแดง ขุ่น และมีกลิ่นคาว เรียกว่า หัวน้ำปลาหรือน้ำปลาชั้นหนึ่ง ถ้าลองเอาจุ่มและบี้ไปมา จะรู้สึกลื่นมือเพราะยังมีคาวปลาอยู่บ้าง นำน้ำปลาที่ได้นี้ไปผึ่งแดดประมาณ 2 สัปดาห์ถึง 1 เดือน ก็จะได้น้ำปลาแท้มีคุณภาพดีสีน้ำตาลแดงใส มีกลิ่นรสที่ดีของน้ำปลา น้ำปลาแท้ชั้นหนึ่งนี้ผู้ผลิตบางรายจะไม่ขาย แต่จะเก็บไว้ใช้สำหรับผสมน้ำปลาชั้นสองเพื่อขายเป็นน้ำปลาดีต่อไป สำหรับกากปลาที่เหลือจากการทำ น้ำปลาชั้นหนึ่งแล้ว ยังสามารถนำไปทำน้ำปลาชั้นรองๆ ได้อีก โดยนำไปหมักกับเกลือเข้มข้นอีก 2 ถึง 3 ครั้ง แต่ละครั้งใช้เวลาประมาณ 2 – 3 เดือน ก็จะได้น้ำปลาชั้นที่ 2, 3 และ 4 ซึ่งมีคุณภาพลดหลั่นกันตามลำดับ (รูปที่ 2) กากปลาที่เหลือจากการหมักครั้งสุดท้ายจะถูกนำไปต้มกับน้ำเกลือ แล้วกรองเป็นน้ำปลาเช่นเดียวกัน การกรองน้ำปลาอาจกรองด้วยทราย กากปลา หรือขี้เถ้าที่แช่น้ำ 2 – 3 วัน เพื่อให้น้ำด่างจากขี้เถ้ามีน้อยลง แล้วจึงเอามากรอง ในบางโรงงานจะกรองด้วยเครื่องกรองพิเศษ น้ำปลาชั้นที่ 3 , 4 และน้ำปลาที่ได้จากการต้มกากปลากับน้ำเกลือนั้น เนื่องจากคุณภาพไม่ค่อยดีจึงมักนำไปปรุงแต่งสี กลิ่น รส โดยแต่งสีด้วยคาราเมลหรือน้ำตาลเคี่ยวไหม้ แต่งรสให้ดีขึ้นด้วยผงชูรส หรือน้ำที่เหลือจากการแยกผงชูรสที่เรียกว่า น้ำบีเอ็กซ์ บางครั้งก็ใช้หัวน้ำปลา น้ำปลาที่มีการแต่งสี กลิ่น รส นี้เรียกว่าน้ำปลาผสม

3.การเกิดสีของน้ำปลา

การเกิดสีของน้ำปลาเป็นปฏิกิริยาที่สำคัญที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักน้ำปลาแล้วทำให้เกิดสีน้ำตาลในน้ำปลาซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสารประกอบคาร์บอนิล และสารประกอบอะมิโนที่พบในเนื้อปลา คือ โปรตีน กรดอะมิโน และบางส่วนของกรดอะมิโนที่ถูกย่อยสลายแล้ว ส่วนสารประกอบคาร์บอนิลเป็นสารในกลุ่มน้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาลหรือสารประกอบที่เกิดจากการเติมออกซิเจนของไขมัน ดังนั้นปฏิกิริยาการเกิดสีของน้ำตาลอาจเกิดได้ 2 วิธี คือ ปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลและสารประกอบอะมิโน และปฏิกิริยาระหว่างไขมันและสารประกอบอะมิโน

สีน้ำตาลของน้ำปลาเกิดจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างสารประกอบที่มีอนุมูลอะมิโน (- NH_2) กับสารประกอบที่มีอนุมูลคาร์บอนิล (-C=O) (ประเสริฐ, 2537) การเกิดปฏิกิริยามี 3 ขั้นตอน คือ ระยะแรกจะเกิดสารประกอบไกลโคซิลเอมีน (glycosylamine) จากนั้นสารชนิดนี้จะจัดตัวกันใหม่เกิดเป็นสารประกอบ 1-amino-1-deoxy-2-ketose (Amadori compound) ซึ่งภายหลังจะเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบที่มีสีน้ำตาล (melanoidin) (Ijong และ Ohta, 1995) สีของน้ำปลาที่ได้จะอยู่ระหว่างสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาลเข้ม ความเข้มของสีน้ำปลาจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับอุณหภูมิและปริมาณออกซิเจนที่เพิ่มขึ้น รวมทั้งชนิดของเกลือ เช่น K_2HPO_4 ส่งเสริมให้เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด ส่วน Ca^{2+}, Fe^{2+} และ Mg^{2+} ในปริมาณ 0.1-1.0 ppm. จะกระตุ้นการเกิดสีน้ำตาลได้ นอกจากนี้น้ำตาลเป็นปัจจัยอีกอย่างหนึ่งที่สำคัญต่อการเกิดสีน้ำตาล

การใช้ปลาทั้งตัวจะทำให้ได้น้ำปลาที่มีสีเข้มกว่าการใช้ปลาที่ควักไส้ออก (Greg and Estrella, 1988) นอกจากนี้ชนิดของปลายังมีผลต่อสีของน้ำปลา เช่น การใช้ปลาแมคเคอเรลจะได้น้ำปลาสีน้ำตาลแดง แต่ถ้าใช้ปลาแองโชวี (Anchovy) จะได้น้ำปลาสีเหลืองทอง (Chaiyanan และคณะ, 1988)



รูปที่ 2 ขั้นตอนการหมักน้ำปลา (บุญศรี, 2533)

รูปที่ 3 บ่อหมักน้ำปลา

ที่มา: http//:www.msnth.com/msn/new/economicchighlights/ articll.asp

4.การเกิดกลิ่นรสของน้ำปลา

4.1การเกิดกลิ่น

ในการบ่งบอกถึงคุณภาพของน้ำปลา ผู้บริโภคมักจะใช้กลิ่นของน้ำปลาเป็นตัวกำหนด ซึ่ง Dougan และ Howard (1975) รายงานว่ากลิ่นของน้ำปลาประกอบด้วยกลิ่น 3 ชนิด ได้แก่ ชนิดแรก กลิ่นคล้ายแอมโมเนีย เกิดจากแอมโมเนียและไตรเมทิลลามีน (trimethylamine) ชนิดที่สอง กลิ่นคล้ายเนย เกิดจากกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ประกอบด้วยกรดอะซิติกและกรดบิวทีริกเป็นส่วนใหญ่ ชนิดสุดท้ายคือ กลิ่นคล้ายเนื้อซึ่งยังไม่สามารถจำแนกได้ว่าเป็นสารประกอบชนิดใด ส่วนองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่ทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติของน้ำปลาคือ Lysine, Proline, Alanine, Glycine, Serine, Glutamic acid และ Leucine กรดไขมันที่ระเหยได้ส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดรสชาติที่พบในน้ำปลาได้แก่ กรด n–butyric ซึ่งจะให้กลิ่นเหมือนเนยแข็ง พบว่าสารระเหย กรดระเหย เอมีน และสารประกอบคาร์บอนิลที่พบมากที่สุด ซึ่งจะเป็นตัวให้กลิ่นรสในน้ำปลา ได้แก่ Ethanol, n-butyric acid, Trimethylamine และ Acetaldehyde ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม Dougan และ Howard, 1975 รายงานว่า สารที่ให้กลิ่นคล้ายเนื้อในปลาทูน่ากระป๋องคือ 2-methyl-3-furanthiol

Saisithi (1967) ได้ศึกษาเรื่องแบคทีเรียที่พบในน้ำปลาพบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดกลิ่นในน้ำปลาได้ 3 พวก คือ

1. พวกที่สร้างกลิ่นหอมคล้ายกุหลาบ กลิ่นนี้จะสังเคราะห์ได้จากกระบวนการย่อยสลาย (strecker degradation) ของ aromatic amino acids แบคทีเรียเหล่านี้มีลักษณะเป็นแท่งแกรมบวก ไม่ต่องการออกซิเจนในการเจริญ และในอาหารที่ใช้เลี้ยงจะต้องมีเกลืออยู่ด้วยไม่น้อยกว่า 10.0 เปอร์เซ็นต์

2. พวกที่สร้างกลิ่นเหมือนกลิ่นเนื้อ พวกนี้เป็นแบคทีเรียทีลักษณะแกรมลบไม่เคลื่อนที่ เป็นแท่งสั้นและปลายมน

3. พวกที่ให้กลิ่นที่เป็นกรดซึ่งใกล้เคียงกับกลิ่นของน้ำปลามาก กลิ่นนี้ได้จากแบคทีเรียที่มีลักษณะกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม จากการศึกษาลักษณะรูปร่างและสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียจึงจัดเข้าไว้ในสกุล *Pediococcus* ของวงศ์ *Lactobacillaceae* มีชื่อ *Padiococcus halophilus*

4.2 การเกิดรสชาติ

รสชาติของน้ำปลาประกอบด้วยเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระหลายชนิด ซึ่งมีรสเฉพาะตัว แม้ว่าน้ำปลาจะประกอบไปด้วยกรดอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดแลคติกและกรดอะซิติก แต่กรดเหล่านี้ไม่ให้รสชาติในน้ำปลา เนื่องจากในสภาพความเป็นกรด-ด่างของน้ำปลาที่ 5.3-6.7 กรดเหล่านี้จะอยู่ในรูปของเกลือ ซึ่งไม่ทำให้เกิดรสเปรี้ยว (Fuke, 1994) รสที่เกิดจากกรดอะมิโนแบ่งออกเป็น 4 ชนิด คือ รสหวาน รสขม รสเปรี้ยว และรสอร่อย กร ดอะมิโนที่ให้รสหวานคือ ไกลซีน อะลานีน ซิลีน ทรีโอนีน โปรลีน ไฮดรอกซีโปรลีน ไลซีน และกลูตามีน รสขมเกิดจาก วาลีน ลิวซีน ไอโซลิวซีน เมทไทโอนีน เฟนนิลอะลานีน ทรีพโตแฟน อาร์จินีน และฮีสติดีน รสเปรี้ยวเกิดจากกรดแอสพาร์ติกและกรดกลูตามิก ส่วนรสอร่อยเกิดจากโซเดียมแอสพาร์เตต และโมโนโซเดียมกลูตาเมต สำหรับเปปไทด์เป็นสารที่ให้รสขม (Ijong และ Ohta, 1995)

Barzana และ Garcia-Garibay (1994) รายงานว่า การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์มักจะทำให้เกิดรสขม ซึ่งเป็นผลของเปปไทด์ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic peptide) ที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลายโปรตีน รสขมจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับขนาดของเปปไทด์และชนิดของพันธะเปปไทด์ที่แตกออก ตัวอย่างเช่นการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนโดเปปติเดสจะทำให้เกิดรสขม ในขณะที่เอนไซม์เอกโซเปปติเดสจะย่อยสลายโปรตีนได้มากกว่าและทำให้เกิดกรดอะมิโนอิสระเป็นจำนวนมากซึ่งทำให้รสขมมีน้อยลง

5. คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำปลา

น้ำปลามีลักษณะเป็นของเหลวใสสีน้ำตาลแดง ปราศจากตะกอน ยกเว้นผลึก ซึ่งเกิดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ ในประกาศกระทรวงอุตสาหกรรมฉบับที่ 678 (2526) เรื่องมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำปลาพื้นเมือง แบ่งน้ำปลาออกเป็น 2 ชั้นคุณภาพ คือ ชั้นคุณถาพที่ 1 และชั้นคุณภาพที่ 2 โดยมีคุณลักษณะทางกายภาพและเคมี (ตารางที่ 3)

จากการวิเคราะห์ของกองโภชนาการ (2526) พบว่า น้ำปลาของไทยมีปริมาณกรดกลูตามิก และไลซีนสูงกว่าน้ำปลาเวียดนามที่วิเคราะห์โดย Subba Rao (1961) (ตารางที่ 4) ซึ่งปริมาณไลซีนสูงสามารถชดเชยการขาดไลซีนสำหรับผู้บริโภคข้าวได้ ส่วนปริมาณกรดกลูตามิกสูงอาจเนื่องจากมีการเติม 1% monosodium glutamate ในน้ำปลาที่ขายกันอยู่ เพราะโดยทั่วๆ

ไปในปลาบดจะมีปริมาณกรดกลูตามิกพอๆ กับกรดแอสปาติกเท่านั้น (Thongthai และ Okada, 1980) สำหรับคุณภาพน้ำปลาพื้นเมืองของไทย จากรายงานของกรมวิทยาศาสตร์ (2515) แสดงไว้ในตารางที่ 5 และองค์ประกอบทางเคมีในระหว่างการหมักน้ำปลาของไทย ดังในตารางที่ 6 (Saisithi และคณะ, 1966)

ตารางที่ 3 คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำปลาตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 678 พ.ศ.2526

ลำดับที่	คุณลักษณะที่ต้องการ	ชั้นคุณภาพที่	
		1	2
1	ความใส	ใส	ใส
2	กลิ่น รส และสี (คะแนนรวม) ไม่น้อยกว่า	80*	80*
3	ความหนาแน่นสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิ 27-28°C ไม่น้อยกว่า	1.20	1.20
4	ความเป็น กรด – ด่าง	5.0-6.0	5.0-6.0
5	โซเดียมคลอไรด์(กรัมต่อลิตร)ไม่น้อยกว่า	230	230
6	ไนโตรเจนทั้งหมด(กรัมต่อลิตร)ไม่น้อยกว่า	20	15
7	ไนโตรเจนจากกรดอะมิโน(กรัมต่อลิตร)ไม่น้อยกว่า	10	7.5
8	อัตราส่วนของกรดกลูตามิกต่อไนโตรเจนทั้งหมด	0.4-0.6	0.4-0.6

* นอกจากนี้ น้ำปลาต้องได้คะแนนต่ำสุดของแต่ละคุณลักษณะไม่น้อยกว่าร้อยละ 50 ของคะแนนเต็ม โดยที่กลิ่น จะต้องดีตามธรรมชาติของน้ำปลา มีคะแนนเต็ม 50 คะแนน รสดีมีคะแนนเต็ม 40 คะแนน และสีเป็นสีน้ำตาลอมแดง มีคะแนนเต็ม 10 คะแนน

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนระหว่างน้ำปลาเวียดนามและน้ำปลาไทย

กรดอะมิโน (กรัม/ลิตร)	น้ำปลาเวียดนาม	น้ำปลาไทย
Alanine	4.2	4.1
Arginine	2.0	trace
Aspartic acid	2.4	2.8
Cystine	0.25	0
Glutamic acid	4.0	10.0
Glycine	2.4	1.5
Histidine	0.3	3.6
Isoleucine	4.0	2.4
Leucine	4.0	3.5
Lysine	4.0	6.5
Methionine	0.8	1.7
Phenylalanine	1.5	2.5
Proline	0.5	trace
Serine	0.8	1.2
Threonine	2.0	2.1
Tyrosine	0.8	1.1
Tryptophan	0.5	5.6
Valine	3.0	3.2

ที่มา : Park และคณะ (2001)

ตารางที่ 5 คุณภาพน้ำปลาพื้นเมืองของไทยระดับต่างๆ

รายการ	น้ำปลาพื้นเมือง				
	โดยทั่วๆไป	มาตรฐานฯ	อย่างดี	อย่างปานกลาง	อย่างเลว
ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH)	5.40 – 5.90	5.00 – 6.00	5.40 – 5.90	5.40 – 5.90	5.40 – 5.90
ความถ่วงจำเพาะ	1.19 – 1.22	ไม่น้อยกว่า 1.20	1.21 – 1.22	1.21 – 1.22	1.19 – 1.20
Total Nitrogen	0.60 – 44.1	ไม่น้อยกว่า 19.0	20.1 – 44.1	10.1 – 20.0	0.60 – 10.0
Amino Acid Nitrogen คิดเป็น % ของ Total N	40 – 60	ไม่น้อยกว่า 50	50 – 60	40 – 60	40 - 60
Ammoniacal Nitrogen คิดเป็น % ของ Total N	10 – 30	-	10 – 20	10 – 20	10 - 30
เกลือ กรัม / ลิตร	260 – 310	ไม่น้อยกว่า 230	260 – 290	270 – 300	280 - 310
ยากันบูด	พบบ้าง	ต้องไม่มี	ไม่พบ	พบบ้าง	พบบ้าง
ซัคคารีน	พบบ้าง	-	ไม่พบ	พบบ้าง	พบบ้าง
วิตามิน					
ไรโบเฟลวิน mg/100 ml	0.15 – 0.29	-	-	-	-
ไนอาซีน mg/100 ml	1.34 – 6.51	-	-	-	-
แฟนโตทินิค แอซิค mg/100 ml	0.20 – 6.51	-	-	-	-

ตารางที่ 5 (ต่อ)

รายการ	น้ำปลาพื้นเมือง				
	โดยทั่วๆไป	มาตรฐานฯ	อย่างดี	อย่างปานกลาง	อย่างเลว
สารที่มีจำนวนน้อย					
เหล็ก	0.46 – 2.51	-	-	-	-
ฟอสฟอรัส	20.4 – 50.5	-	-	-	-
แคลเซียม	20.2 – 69.6	-	-	-	-
แมกนีเซียม	14.4 – 184.0	-	-	-	-
แมงกานีส	0.29 – 2.07	-	-	-	-
ไอโอดีน	0.19 – 0.92	-	-	-	-
ความใส	ไม่มีตะกอน	ไม่มีตะกอน	ไม่มีตะกอน	ไม่มีตะกอน	ไม่มีตะกอน
สี	น้ำตาลอมแดง	น้ำตาลอมแดง	น้ำตาลอมแดง	น้ำตาลอมแดง	น้ำตาลอมแดง
กลิ่น	หอม	หอมน่ากิน	หอมน่ากิน	หอม	หอม
รส	อร่อย	อร่อย	อร่อย	อร่อย	อร่อย

ที่มา : กรมวิทยาศาสตร์ (2515)

ตารางที่ 6 องค์ประกอบทางเคมีในระหว่างการหมักน้ำปลาของไทย

Fermentation period (month)	pH	NaCl(%)	m moles / 100 ml				
			Total nitrogen	Ammonia nitrogen	Titratable acid - lactic	Volatile acid – lactic	Volatile base (meq / 100 ml)
1	6.4	30.1	49	8	6.8	4.3	4.01
3	6.2	30.3	52	7	8.0	3.3	6.61
6	6.6	30.2	56	14	5.2	8.7	10.21
9	6.2	30.2	130	15	5.9	4.3	14.71
12	6.4	27.9	140	15	15.8	6.3	3.01

ที่มา : Saisithi และคณะ (1966)

6.การพัฒนากรรมวิธีการหมักน้ำปลา

อุตสาหกรรมการหมักน้ำปลาในประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ยังคงหมักน้ำปลาด้วยวิธีการดั้งเดิม ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการหมักนาน ทำให้ต้องใช้พื้นที่และถังหมักปลาจำนวนมาก อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตด้วย ดังนั้น จึงมีการศึกษาวิจัยการหมักน้ำปลาอย่างมากเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมทำน้ำปลาในประเทศแถบนี้ วัตถุประสงค์ในการพัฒนากรรมวิธีการหมักน้ำปลาโดยทั่วไปคือ

1. เพื่อลดระยะเวลาการหมักให้สั้นลง ช่วยให้สามารถผลิตน้ำปลาได้หลายครั้งต่อปี เป็นการเพิ่มผลผลิตและการลงทุนแต่ละครั้งไม่นานเกินไป ซึ่งเป็นการลดต้นทุนด้วย
2. เพื่อให้โปรตีนที่ไม่ละลายถูกเปลี่ยนเป็นโปรตีนที่ละลายได้ ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการให้มากที่สุด
3. สามารถสร้างกลิ่นและรสชาติที่ดีของน้ำปลาและคว บคุมการผลิตนี้ได้
4. สามารถลดปริมาณเกลือที่ใช้ในการหมักได้ เพื่อให้มีการบริโภคน้ำปลาได้สูงขึ้น
5. สามารถใช้ปลาที่เหลือทิ้งในการผลิตน้ำปลาได้

เท่าที่ผ่านมาได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านทำการศึกษาเพื่อเร่งกระบวนการหมักน้ำปลาไว้มากมายหลายวิธี โดยอาศัยหลักการลดระยะเวลาในการเกิดน้ำปลาทั้ง 3 กระบวนการ ได้แก่ การลดเวลาในการย่อยสลายของปลา การลดเวลาในการเกิดสี และการลดเวลาในการเกิดกลิ่นและรสของน้ำปลา นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาถึงวิธีปรับสภาวะบางอย่างเพื่อเร่งกระบวนการหมักน้ำปลาด้วย

6.1 การลดเวลาในการย่อยสลายของปลา

การทำน้ำปลาแต่ดั้งเดิมอาศัยเอนไซม์จากตัวปลาและจากแบคทีเรียที่อยู่ในตัวปลา หรือที่ติดอยู่กับตัวปลาภายนอก ทำให้กินเวลาในการหมักนาน 12 ถึง 18 เดือน จึงจะย่อยสลายเนื้อปลาเป็นน้ำปลาได้ เพื่อให้การย่อยสลายเนื้อปลาเป็นน้ำปลาเร็วขึ้น จึงอาจใช้วิธีทางเคมี หรือชีวเคมีเข้ามาช่วย วิธีดังกล่าวคือ การย่อยสลายด้วยด่าง การย่อยสลายด้วยกรด และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

6.1.1 การย่อยสลายเนื้อปลาด้วยด่าง

ตามที่ทราบกันดีว่าการย่อยสลายเนื้อปลาเพื่อให้ได้โปรตีนที่ละลายน้ำได้นั้น ทางหนึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการย่อยสลายตัวปลาเองโดยเอนไซม์โปรติเอสในระบบย่อยอาหาร แต่ภายใต้สภาพพีเอชของน้ำปลาซึ่งอยู่ในช่วงมีฤทธิ์เป็นกลางถึงเป็นกรดเล็กน้อย เป็นสภาพที่มีกิจกรรมการย่อยโดยโปรติเอสนี้ได้น้อย (Gildberg, 1982) ดังนั้น การปรับพีเอชให้สูงขึ้นหรือต่ำลงจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ดีขึ้นได้

อรพิน ภูมิภมร (2526) ได้กล่าวถึงการใช้ด่างในการย่อยสลายปลาว่าเป็นการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 10-12 ย่อยสลายปลาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นปรับความเป็นกรด-ด่างของน้ำปลาที่ได้ให้เป็นกลางด้วยกรดอะซิติก วิธีนี้มีข้อเสียคือ การย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลาไม่สมบูรณ์เท่ากับการใช้กรดและกลิ่นรสไม่ดีเท่ากับการใช้กรด

6.1.2 การย่อยสลายเนื้อปลาด้วยกรด

Beddows และ Ardeshir (1979) พบว่าการใช้กรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 ย่อยปลากะตักบด (*Stolephorus* sp.) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 6 วัน ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.0 ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 5 จะทำให้ได้น้ำปลาที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงที่สุด แต่ของเหลวที่ได้จะมีความหนืดมาก ทำให้ยากต่อการกรอง แต่ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.0 ใช้ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 10 จะกรองของเหลวได้ง่ายและใช้ปริมาณของกรดในการปรับความเป็นกรด-ด่างน้อยกว่าที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 น้ำปลาที่ได้มีกลิ่นรสของน้ำปลาน้อย แต่จะมีปริมาณไนโตรเจนสูง จึงเหมาะสำหรับใช้ผสมในน้ำปลาแบบดั้งเดิมเพื่อเพิ่มปริมาตร และจากการทดลองนี้พบว่า การใช้เกลือเป็นปริมาณมากจะทำให้การย่อยสลายช้าลง แต่จะช่วยให้กรองน้ำปลาได้ง่ายขึ้น

6.1.3 การย่อยสลายเนื้อปลาด้วยเอนไซม์

เนื่องจากตัวปลาประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน และเกลือแร่ในปริมาณแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของปลา โดยส่วนประกอบหลักคือโปรตีน ดังนั้นปฏิกิริยาการย่อยสลายที่สำคัญ คือ การย่อยสลายโปรตีน

โปรตีนในตัวปลาจะถูกย่อยสลายทันทีภายหลังที่ปลาตาย โดยเอนไซม์ที่อยู่แต่เดิมในตัวปลา กระบวนการดังกล่าวเรียกว่า autolysis ขณะเดียวกันแบคทีเรียที่ติดมากับปลาซึ่งต่างก็มีเอนไซม์ จะเริ่มย่อยโปรตีนจากโมเลกุลใหญ่ให้เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลเล็กลง เช่น เปปไทด์ และกรดอะมิโนทันที โดยวิถีกระบวนการง่ายๆ ดังนี้

$$\text{โปรตีน} \xrightarrow{\text{โปรติเอส}} \text{เปปไทด์} \xrightarrow{\text{เปปติเดส}} \text{กรดอะมิโน}$$

กรดอะมิโนจะถูกย่อยสลายต่อไปอีกเป็น อามีน กรดคีโต แอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์

เอนไซม์สำคัญที่พบในระบบทางเดินอาหารของปลา ได้แก่ โปรติเอส ไลเปส และแอมิเลส เมื่อปลาตาย เอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนทั้งในส่วนเนื้อปลา กระเพาะ ลำไส้ หรือจากจุลินทรีย์ จะย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลาเป็นเปปไทด์และกรดอะมิโน ซึ่งกรดอะมิโนอาจจะถูก

ย่อยสลายต่อไปกลายเป็นเอมีน กรดคีโต แอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีน (protease) สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ตามกลไกการทำงานดังนี้

1. Serine protease เป็นเอนไซม์ที่มีอนุมูลเซริล (seryl sesidue) และมีหมู่อิมิดาโซลอยู่ที่บริเวณเร่งเอนไซม์ทั้งหมดเป็นพวกเอนโดเปปติเดส (endopeptidase) มีความสามารถในการทำงานได้อย่างเหมาะสมในสภาพความเป็นกรด-ด่าง เป็นกลาง จนถึงด่าง ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่

กลุ่มที่มีแหล่งจากสัตว์ เช่น ทริปซิน ไคโมทริปซิน ทรอมบิน และอิลาสเทส

กลุ่มที่มีแหล่งจากจุลินทรีย์ เช่น subtilisin และ α-lytic protease

2. Sulhydryl protease เป็นเอนไซม์ที่มีหมู่ซัลไฟดริลที่บริเวณเร่ง ความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้ค่อนข้างจะเป็นกลาง คือ ที่ 6-7.5 ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่

กลุ่มที่มีแหล่งจากพืช เช่น ปาเปน (จากมะละกอ) , ฟิซิน (จากมะเดื่อ) และโบรมิเลน (จากสับปะรด)

กลุ่มที่มีแหล่งจากจุลินทรีย์ เช่น *Streptococcus* protease

3. Metal-containing protease เป็นเอนไซม์ที่มีอิออนของโลหะเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในบริเวณเร่งและเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากปลายสายของโปรตีน (exopeptidase) มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 6.5-7.5 ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่

กลุ่มที่มีแหล่งจากสัตว์ เช่น Carboxypeptidase A, B และ Glycyl-glycinedipeptidase

กลุ่มที่มีแหล่งจากจุลินทรีย์ เช่น เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. และ *Aspergillus* sp. เป็นต้น

4. Acid protease เป็นเอนไซม์ที่มีความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการทำงาน อยู่ในช่วง 2-4 ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่

กลุ่มที่มีแหล่งจากสัตว์ เช่น เรนนิน และเปปซิน

กลุ่มที่มีแหล่งจากจุลินทรีย์ เช่น เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *Mucor* sp.

การย่อยสลายโปรตีนของน้ำปลาเกิดขึ้นเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม Proteolytic enzyme จากระบบทางเดินอาหารของปลาเอง และจากกิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรียโดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียที่ชอบเกลือ เอนไซม์จากตัวปลาที่มีความสำคัญ คือ เปปซิน (pepsin) และทริปซิน (trypsin) ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ที่ 40-50 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากการศึกษาของ Chaveesuk และคณะ ในปี 1993 พบว่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเปปซินอยู่ที่ประมาณ 7.6 ส่วนทริปซินอยู่ที่ประมาณ 4.5 ส่วนเอนไซม์ที่ถูกสร้างจากจุลินทรีย์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเอนไซม์

Proteinase จะเป็นเอนไซม์ที่ช่วยทำให้เกิด กลิ่น รสชาติ และสี ในการหมักน้ำปลา แต่ในทางตรงข้าม เอนไซม์ Proteinase ก็สามารถทำให้ผลิตภัณฑ์จากสัตว์เสื่อมคุณภาพได้ ซึ่งเนื่องมาจาก Endogneous enzyme

Raksakulthai และคณะ (1986) เปรียบเทียบการใช้เอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา (fungal protease), โปรเนส (pronase), ทรีปซิน, ไคโมทริปซิน และต่อมที่ผลิตเอนไซม์ของปลาหมึกในการทำน้ำปลา โดยหมักปลาเคปลินบดกับเกลือในอัตราส่วน 4 ต่อ 1 ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส พบว่า กรดอะมิโนอิสระในน้ำปลาที่ได้จากการใช้ต่อมที่ผลิตเอนไซม์ของปลาหมึกมีมากที่สุด และให้ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสสูงเมื่อเทียบกับปาทีสเอนไซม์ที่พบในระหว่างการหมักเป็นพวกซัลไฟดริลโปรติเอส (sulfhydryl protease)ได้แก่ ไดเปปติดิลไฮโดรเลส (dipeptidylhydrolase หรือเรียกว่าคาเทปซินซี) ซึ่งมี pH ที่เหมาะสมที่เป็น 6.0

6.2 การลดระยะเวลาในการเกิดสีของน้ำปลา

การเกิดสีเป็นกระบวนการทางเคมีที่เรียกว่า Maillard reaction ในการทำน้ำปลาแบบเร่งรัด ถ้าปล่อยให้กระบวนการนี้เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอาจยังไม่สมบูรณ์พอที่จะทำให้เกิดสีของน้ำปลาได้ จึงอาจใช้วิธีอื่นช่วย ซึ่งในปัจจุบันนี้โรงงานน้ำปลาบางแห่งก็ใช้อยู่ คือ เติมน้ำตาลเคี่ยวไหม้ (caramel) ลงไป แต่มีปัญหาคือ สีของน้ำปลาที่ได้โดยวิธีนี้เมื่อเก็บไว้นานเข้าจะเปลี่ยนเป็นสีดำมากขึ้น และอาจมีผลทำให้กลิ่นและรสของน้ำปลาผิดไปบ้างเล็กน้อย (Beddows และคณะ, 1976)

6.3 การลดเวลาการเกิดกลิ่นและรสของน้ำปลา

กลิ่นและรสของน้ำปลาเกิดจากการกระทำของจุลินทรีย์ การที่จะลดเวลาการกิดกลิ่นและรสของน้ำปลาจึงอาจทำได้โดยคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีบทบาทอย่างแท้จริงในการเกิดกลิ่นและรสของน้ำปลาใส่ลงไปในถังหมักปลาเป็นจำนวนมาก ซึ่งก็จะทำให้ปฏิกิริยาการเกิดกลิ่นและรสของน้ำปลาเร็วขึ้นมาก (Uchida และคณะ, 2005)

7. การเลี้ยงเชื้อราในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี koji-type process (bran process หรือ solid-state fermentation)

การเลี้ยงเชื้อราในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี koji-type process เพื่อใช้เร่งกระบวนการย่อยสลายเนื้อปลาในการหมักน้ำปลา

การเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์โดยทั่วไปมี 2 วิธี คือ การเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว (submerged culture) และอีกวิธีหนึ่งคือ การเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งที่มีความชื้นอยู่ (solid culture) วิธีการผลิตเอนไซม์ในอุตสาหกรรมส่วนมากมักใช้วิธี submerged culture แต่เนื่องจากวิธีการแบบนี้เป็นวิธีการที่ต้องการการลงทุนสูงมาก จำเป็นต้องมีกระบวนการกวน การพ่นอากาศลงไปในถังหมักอย่างดีและมีประสิทธิภาพสูง อีกทั้งยังมีปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นในการใช้ submerged process อาจหลีกเลี่ยงได้หากใช้วิธีการแบบ koji-type process เพราะการผลิตเอนไซม์โดยวิธีนี้มีข้อดี คือ การลงทุนในด้านเครื่องมือต่ำกว่าแบบ submerged process และระบบการควบคุมต่างๆ มีน้อย อีกทั้งปัญหาด้านการปนเปื้อนอาจหลีกเลี่ยงได้ง่าย เนื่องจากปริมาณน้ำมีน้อย ดังนั้น วิธีนี้จึงเหมาะในการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา ยีสต์ หรือ จุลินทรีย์พวก *Streptomyces* แต่ถ้าจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตเอนไซม์เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการ water activity ในการเจริญสูง จำเป็นต้องใช้ submerged process ดังนั้นในการผลิตเอนไซม์จาก จุลินทรีย์จึงนิยมใช้วิธีนี้ (Cannel และ Moo-Young, 1980)

ในปี 2004 Sandhya และคณะ ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. จำนวน 3 สายพันธุ์ และ *Penicillium* sp. จำนวน 4 สายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบระหว่างการหมักบนอาหารเหลว (submerged fermentation) และการหมักบนอาหารแข็ง (solid-state fermentation) โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเป็นวัสดุหมัก (รำข้าวสาลี , แกลบ, รำข้าวเจ้า, กากมะพร้าว, กากปาล์ม, เมล็ดงา, เมล็ดขนุน และผลมะกอก) ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่า เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือ *A. oryzae* NRRL 1808 ด้วยวิธีการหมักแบบแห้ง ซึ่งวัสดุหมักที่ดีที่สุดคือ รำข้าวสาลี เมื่อมีการเติมเชื้อรา 1 มิลลิลิตร (8 x 10^8 สปอร์) ความชื้นเริ่มต้นเป็น 43.6 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตได้มมีปริมาณสูงกว่าการหมักบนอาหารเหลว 3.5 เท่า

ต่อมาในปี 2008 Chutmanop และคณะ ได้ทำการศึกษาผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* (Ozykat-1) ด้วยการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งที่มีความชื้นอยู่ (solid-state fermentation) โดยประยุกต์ใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมมาเป็นวัสดุหมัก ซึ่งประกอบด้วย รำข้าวเจ้า และรำข้าวสาลี ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่า เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงบนรำข้าวเจ้าเป็นเวลา 84 ชั่วโมง ความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ pH 7.5 และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงถึง 1400 U/g โดยน้ำหนักแห้ง

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus oryzae* สายพันธุ์ที่มีสมบัติในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสที่ทนเกลือสูงได้ดี
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโคจิจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ให้ได้เอนไซม์โปรติเอสที่ทนเกลือปริมาณสูง
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ที่แยกได้
4. ศึกษาแนวทางในการเร่งกระบวนการหมักน้ำปลาโดยการใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

รายการ	ยี่ห้อ
Autoclave	Tomy ES-315, SS320, Japan
Centrifuge	รุ่น Harrier 18/80
Hot air oven	WTB Binder, BD/ED/FD with R3-
Hot plate stirrer	Fisher sciencetific, USA
Incubator	MMM medcenter
Laminar air flow cabinet	Micro flow advanced bio safety cabinet
Microscope	Olympus Optical Co., Ltd. รุ่น 2 Genie.
Microwave	Sanyo
pH meter	Mettler Toledo seven easy
Pipette & Autopipette	Eppendorf
Vortex mixer	Mettler Toledo PB602-L
Water bath	TW20 Julabo

วิธีการทดลอง

1.เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อรา *Aspergillus oryzae* ที่ใช้ในการศึกษาได้แก่

1.เชื้อ *Aspergillus oryzae* จากภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่

- *Aspergillus oryzae* MI PSU1
- *Aspergillus oryzae* MI PSU2
- *Aspergillus oryzae* MI PSU3

2.เชื้อ *Aspergillus oryzae* จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR) จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่

- *Aspergillus oryzae* TISTR 3018
- *Aspergillus oryzae* TISTR 3027
- *Aspergillus oryzae* TISTR 3085
- *Aspergillus oryzae* TISTR 3102
- *Aspergillus oryzae* TISTR 3104

3.เชื้อ *Aspergillus oryzae* จากตัวอย่างโคจิของโรงงานซีอิ๊วในเขต จ.สงขลา จำนวน 2 โรงงาน ได้แก่ โรงงานซีอิ๊วอ่องเฮียบเซ่ง และโรงงานซีอิ๊วตราไก่ โดยนำมาแยกเชื้อและทำเชื้อราให้บริสุทธิ์ โดยนำโคจิจากโรงงานซีอิ๊ว ทั้ง 2 แห่งมาแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อราแต่ละชนิดไปลากบนอาหาร potato dextrose agar บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 - 3 วัน เมื่อเชื้อเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ใช้ลวดเขี่ยตัดปลายเส้นใยมาวางลงตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิมอีก ทำเช่นนี้ประมาณ 3-4 ครั้ง ตรวจดูลักษณะการเจริญ ลักษณะเส้นใย และสีของสปอร์ นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จนได้เชื้อบริสุทธิ์จึงเขี่ยเส้นใยมาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญขึ้นมา ใช้เวลาประมาณ 4 วัน จึงนำเชื้อไปเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2. การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ทนเกลือ

2.1 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

นำเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 1 มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส โดยนำเชื้อที่เลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ด้วยวิธี point inoculation อายุ 5 วัน มาตัดเฉพาะส่วนปลายของสายใยของเชื้อรา วางลงตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ sodium caseinate agar ดัดแปลงโดยการเติมเกลือแกง 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ที่ปรับ pH

เป็น 6.5 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสและโคโลนี คัดเลือกเชื้อราที่รอบๆ โคโลนีที่มีบริเวณใสกว้างไว้ศึกษาต่อไป

2.2 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอมิเลส

นำเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 1 มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ แอมิเลส โดยนำเชื้อที่เลี้ยงไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ด้วยวิธี point inoculation อายุ 5 วัน มาตัดเฉพาะส่วนปลายของสายใยของเชื้อรา วางลงตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารดัดแปลงจาก Czapex's agar โดยใช้ soluble starch แทน saccharose ที่เติมเกลือแกง (NaCl) 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ในสูตรอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน ทดสอบเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อในการย่อยแป้ง โดยใช้สารละลายไอโอดีน ราดลงไปในจานเลี้ยงเชื้อ สังเกตการเกิดบริเวณใสรอบๆ โคโลนี เชื้อที่ให้บริเวณใสรอบๆ โคโลนีกว้างแสดงว่ามีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้สูง เก็บเชื้อไว้บน potato dextrose agar slant ไว้ศึกษาต่อไป

3.ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ทนเกลือของเชื้อที่คัดเลือกได้

3.1 ศึกษาการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราบนอาหารชนิดต่าง ๆ

3.1.1 การเตรียมสารละลายสปอร์

เขี่ยเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 ลงบนอาหาร potato dextrose agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเติม สารละลาย polyxyethylene sorbitan mono-oleate (tween 80) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อ 5 มิลลิลิตร ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ เขย่าให้สปอร์กระจายสม่ำเสมอ เจือจางให้มีจำนวนสปอร์ประมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.1.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารชนิดต่าง ๆ

เพาะเลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้บนอาหารรำข้าวเจ้า ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ถั่วเหลือง และกาก - ถั่วเหลือง ด้วยการหมักแบบโคจิ โดยนำถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง ข้าวเจ้า และข้าวสาลีไปแช่น้ำเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และนำรำข้าวเจ้าไปอบที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}$C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่อาหารแต่ละชนิดจำนวน 20 กรัม ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดัน ที่อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$C เป็นเวลา 30 นาที ปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 45 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งโดยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ ปลูกเชื้อด้วยสารละลายสปอร์ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ทั่ว บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งของโคจิ กิจกรรมโปรติเอส กิจกรรมแอมิเลส และวัดค่า pH

3.1.3 การสกัดเอนไซม์และการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

3.1.3.1. การสกัดเอนไซม์

นำโคจิของเชื้อราที่เพาะเลี้ยงตามระยะเวลาที่กำหนด 10 กรัม มาสกัดเอนไซม์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ทำในห้องเย็น) เขย่าเป็นครั้งคราวใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบางและกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสที่ได้นี้มาวิเคราะห์กิจกรรมโปรติเอส โดยวิธีที่ดัดแปลง มาจากวิธีของ Anson (Anson, 1983) และกิจกรรมแอมิเลส ตามวิธีการของ Fuwan (1938)

3.1.3.2. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

โดยวิธีดัดแปลงมาจากวิธีของ Anson (1983) นำสารละลายสกัดเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ เติมสารละลายเคซีนเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์จำนวน 1 มิลลิลิตร (ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 10 นาที) บ่มให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารละลายที่กรองได้ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ เติม 0.4 M Na_2CO_3 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติม 1 N folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis recording spectrophotometer (Perkin Elmer instruments) UV-240 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (สำหรับหลอดควบคุม ปฏิบัติในทำนองเดียวกันแต่ เติมสารละลาย TCA ก่อนเติมสารละลายเคซีน) ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีน โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยเคซีนให้ได้ไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ภายในเวลา 1 นาที ในสภาวะของการวิเคราะห์

3.1.3.3. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แอมิเลส

โดยวิธีดัดแปลงมาจากวิธีของ Fuwan (1938) นำสับสเตรท 3.0 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร ไปบ่มในอ่างน้ำ (water bath) ควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 10 นาที เตรียมสารละลายไอโอดีน 0.167 มิลลิโมลาร์ โดยดูดสารละลายไอโอดีนเข้มข้น ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 60 มิลลิลิตร (เตรียมแล้วใช้ทันที) ดูดใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืด เติมสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นเหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร ลงไปในสับสเตรท บ่มต่อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที โดยใช้นาฬิกาจับเวลา ชุดควบคุมทำเช่นเดียวกัน แต่ใช้น้ำกลั่น 0.1 มิลลิลิตรแทนสารละลายเอนไซม์ เมื่อครบ 10 นาทีดูดสารละลายผสมของสับสเตรทกับเอนไซม์ 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในสารละลายไอโอดีน นำไปวัด

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบล็งค์ (blank) โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือปริมาณค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไป 1 หน่วย ในเวลา 10 นาที ที่สภาวะการทดลองเทียบกับชุดควบคุม

3.2 ความชื้นเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

เตรียมโคจิของเชื้อราที่คัดเลือกได้โดยใช้อาหารที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1.2 ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 40, 45, 50, 55. 60, 65 และ 70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง ปลูกเชื้อด้วยสารละลายสปอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวันจนครบ 6 วัน วิเคราะห์น้ำหนักแห้งโคจิ กิจกรรมโปรติเอส กิจกรรม แอมิเลส ดังวิธีการข้อ 3.1.3 และวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter

3.3 พีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

เตรียมโคจิของเชื้อราที่คัดเลือกได้โดยใช้อาหารที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1.2 ปรับความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.2 ด้วยน้ำกลั่นที่ผสมกับ 0.5 N HCl หรือ 0.5 N NaOH ให้ได้พีเอช 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ปลูกเชื้อด้วยสารละลายสปอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกวันจนครบ 6 วัน วิเคราะห์น้ำหนักแห้งโคจิ กิจกรรมโปรติเอส กิจกรรมแอมิเลส ดังวิธีการข้อ 3.1.3 และวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter

3.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

เตรียมโคจิของเชื้อราที่คัดเลือกได้โดยใช้อาหารที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1.2 ปรับความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.2 พีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.3 ปลูกเชื้อด้วยสารละลายสปอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.1 บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40 และ 45 $^{\circ}$C เก็บตัวอย่างทุกวันจนครบ 6 วัน วิเคราะห์น้ำหนักแห้งโคจิ กิจกรรมโปรติเอส กิจกรรม แอมิเลส ดังวิธีการข้อ 3.1.3 และวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter

3.5 ระยะเวลาที่เชื้อผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด

เตรียมโคจิของเชื้อราที่คัดเลือกได้โดยใช้อาหารที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1.2 ปรับความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.2 พีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.3 ปลูกเชื้อด้วยสารละลายสปอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.1 บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.4 เก็บตัวอย่างทุกวันจนครบ 6 วัน วิเคราะห์น้ำหนักแห้งโคจิ กิจกรรมโปรติเอส กิจกรรม แอมิเลส ดังวิธีการข้อ 3.1.3 และวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลส

4.1 การเตรียมเอนไซม์

เตรียมโคจิ โดยใช้อาหารที่ คัดเลือกได้ จากข้อ 3.1.2 ใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 20 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปรับ

ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.2 ให้ได้พีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.3 ปลูกเชื้อด้วยสารละลายสปอร์เขย่าให้คลุกเคล้ากับอาหารที่เหมาะสมอย่างทั่วถึง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.4 เป็นระยะเวลาที่เชื้อสร้างเอนไซม์สูงสุดจากข้อ 3.5 เมื่อครบกำหนดนำโคจิส่วนหนึ่งมาหาน้ำหนักแห้ง และอีกส่วนหนึ่งจำนวน 10 กรัม นำมาสกัดเอนไซม์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ทำในห้องเย็น) เขย่าเป็นครั้งคราวใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบางและกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ส่วนใสที่ได้นี้มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและความคงทนของเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลส

4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์

4.2.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมโปรติเอสและ แอมิเลส ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เอช 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ

พีเอช 4-5 ใช้ 0.05 M Na-acetate-Acetic acid buffer

พีเอช 6-8 ใช้ 0.05 M Phosphate buffer

พีเอช 9-10 ใช้ 0.05 M Glycine-NaOH buffer

โดยนำสารละลายเอนไซม์มาทำให้เจือจางด้วย สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชต่างๆ แล้วนำมาหากิจกรรมโปรติเอสและแอมิเลสดังวิธีการข้อ 3.1.3

4.2.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมโปรติเอสและ แอมิเลส ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยเจือจางเอนไซม์ด้วย สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.1 แล้วนำมาหากิจกรรมโปรติเอสและแอมิเลสดังวิธีการข้อ 3.1.3 โดยให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส

4.2.3 ผลของความเข้มข้นเกลือ(NaCl) ต่อกิจกรรมโปรติเอสและ แอมิเลส ศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยเจือจางเอนไซม์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.1 มาเติมเกลือแกงให้มีปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือแกงในสารละลายปฏิกิริยาเป็น 0 , 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาหากิจกรรมโปรติเอสและแอมิเลส ดังวิธีการข้อ 3.1.3 โดยให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.2

4.2.4 ผลของพีเอชต่อความคงทนของเอนไซม์โปรติเอสและ แอมิเลส ศึกษาผลของพีเอชต่อความคงทนของเอนไซม์โดยเจือจางสารละลายเอนไซม์ให้เหมาะสมโดยใช้ สารละลายบัฟเฟอร์ที่แตกต่างกันให้มีพีเอชเป็น 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหากิจกรรมโปรติเอสและ แอมิเลส ดังวิธีการข้อ 3.1.3 โดยให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.2

4.2.5 ผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของเอนไซม์โปรติเอสและ แอมิเลส ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของเอนไซม์ โดยนำสารละลายเอนไซม์ไปวางไว้ที่อุณหภูมิที่

แตกต่างกัน คือ 30, 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เจือจางเอนไซม์ด้วย สารละลาย บัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.1 แล้วนำมาหากิจกรรมโปรติเอสและ แอมิเลส ดังวิธีการข้อ 3.1.3 โดยให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.2

4.2.6 ผลของความเข้มข้นของเกลือ(NaCl) ต่อความคงทนของเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลส ศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยแบ่งเอนไซม์ออกเป็น 2 ชุด ชุดแรกไม่เติมเกลือ ส่วนชุดที่สองเติมเกลือให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25% แล้วนำเอนไซม์ทั้ง 2 ชุด ไปวางบ่มไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 4, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเอนไซม์ที่ชั่วโมงต่างๆ คือ 0, 1, 2, 3, 6, 24, 120, 240, 360, 480 และ 720 มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเอสและ แอมิเลส ดังวิธีการข้อ 3.1.3 โดยให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 4.2.2

5. การเตรียมโคจิเพื่อใช้ในการผลิตน้ำปลา

5.1 การเตรียมสปอร์เชื้อรา

เตรียมสปอร์เชื้อรา *A. oryzae* ที่คัดเลือกจากการศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ และสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์จากข้อ 3 และ 4 โดยใช้ข้าวหอมมะลิจำนวน 10 กรัมต่อน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วใส่สารละลายสปอร์ *A. oryzae* ซึ่งเตรียมตามวิธีการข้อ 3.1.1 ลงไป 0.1 มิลลิลิตร หมุนฟลาสก์ให้ปลายข้าวติดข้างฟลาสก์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จึงนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง เพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป

5.2 การเตรียมโคจิเพื่อใช้ในการหมักน้ำปลา

เตรียมการทดลองแยกออกเป็น 2 ชุด โดยชุดแรก เตรียมโคจิเพื่อใช้ในการหมักน้ำปลาโดยใช้สปอร์เชื้อราจากข้อ 5.1 นำอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.1.2 ที่ปรับความชื้นและพีเอชที่เหมาะสม (ข้อ 3.2 และ 3.3) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 30 นาที ปลูกเชื้อด้วยสปอร์ที่เตรียมจากข้อ 5.1 ปริมาณ 0.2 เปอร์เซ็นต์ คลุกให้ทั่วแล้วเทลงขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 600 ml เกลี่ยให้กระจาย โดยให้มีความหนาประมาณ 1 นิ้ว แล้วนำไปบ่ม โดยควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อ 3.4 เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง และกิจกรรมโปรติเอสทุก 6 ชั่วโมง เก็บโคจิระยะที่เชื้อสร้างเอนไซม์สูงสุดไว้ในตู้เย็น เพื่อนำไปใช้หมักน้ำปลาต่อไป และชุดที่ 2 ใช้อาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.1.2 ปรับความชื้น และพีเอชที่เหมาะสม (ข้อ 3.2 และ 3.3) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 30 นาที โดยไม่เติมเชื้อราเพื่ อใช้เป็นชุดควบคุม(control) ในการศึกษาประสิทธิภาพของโคจิในการหมักน้ำปลา

6. การหมักน้ำปลาโดยใช้โคจิช่วยเร่งกระบวนการหมัก

6.1 การหมักน้ำปลา

วางแผนการทดลองแบบ split plot ในลักษณะ completely randomized design (CRD) 3 ซ้ำ โดยชั่งปลากะตัก 1.5 กิโลกรัม ซึ่งปลากะตักที่ใช้ในการทดลองนี้มีขนาดความยาวประมาณ 7 เซนติเมตร มีค่าการวิเคราะห์ Proximate Analysis ดังแสดงในตารางที่ 18 (ภาคผนวก ค) ใส่ขวดแก้วปากกว้าง ขนาดความจุ 3 ลิตร แล้วใส่โคจิที่เตรียมได้จากข้อ 5.2 ลงไป 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ใส่เกลือในการหมัก 25 เปอร์เซ็นต์ (ดังแสดงในตารางที่ 7) สำหรับชุดควบคุม (control) ทำเช่นเดียวกับชุดทดสอบ แต่ใส่อาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.1.2 แต่ไม่มีการเลี้ยงเชื้อรา ดังแสดงในตารางที่ 8 คลุกเคล้าให้เข้ากัน ปิดฝาให้สนิท บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ไปตลอดระยะเวลาของการหมัก

6.2 ศึกษาสมบัติของน้ำปลาที่หมักได้

เก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์จนครบ 4 เดือน นำตัวอย่างน้ำปลา มากรองด้วยกระดาษของ Whatman เบอร์ 1 ส่วนใสที่กรองได้นำมาวิเคราะห์ Formaldehyde Nitrogen Total Nitrogen เปอร์เซ็นต์เกลือ(NaCl) พีเอช เข้มของสีด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรและเมื่อหมักครบ 4 เดือน นำตัวอย่างน้ำปลามาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน

6.3 การประเมินทางประสาทสัมผัส

ในการประเมินทางประสาทสัมผัสของตัวอย่างผู้บริโภคต่อน้ำปลาที่ผลิตขึ้นในสภาวะต่างๆ โดยแบ่งคุณลักษณะของน้ำปลาที่จะประเมินออกเป็น 4 หัวข้อ ได้แก่ กลิ่น รสชาติ สี และความชอบโดยรวม ซึ่งมีระดับความชอบของการให้คะแนนเป็น 9 ระดับ ซึ่งแบบสอบถามการในการประเมินทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคดังแสดงในภาคผนวก ง โดยให้ผู้ร่วมทดสอบชิมตัวอย่างน้ำปลาตามลำดับที่เสนอ และให้คะแนนตามระดับความชอบที่มีต่อผลิตภัณฑ์ และบ้วนปากก่อนชิมตัวอย่างต่อไปทุกครั้ง แล้วนำผลการประเมินไปวิเคราะห์ โดยใช้วิธีทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS สำหรับ Windows XP version 14 (SPSS Inc. Chicago, III., U.S.A.) One-Way ANOVA post-hoc comparison of means (Duncan's multiple range test)

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบชุดที่ 1 ในการทดลองหมักน้ำปลาโดยใช้โคจิและเกลือเริ่มต้นการหมักปริมาณต่างๆ

การทดลองที่	ส่วนประกอบในการหมักน้ำปลา					
	ปลากะตัก		โคจิ		เกลือป่น	
	กรัม	%	กรัม	%	กรัม	%
1	1,500	55	545	20	682	25
2	1,500	55	545	20	682	25
3	1,500	55	545	20	682	25
4	1,500	60	375	15	625	25
5	1,500	60	375	15	625	25
6	1,500	60	375	15	625	25
7	1,500	65	230	10	577	25
8	1,500	65	230	10	577	25
9	1,500	65	230	10	577	25
10	1,500	70	107	5	535	25
11	1,500	70	107	5	535	25
12	1,500	70	107	5	535	25
13	1,500	75	0	0	500	25
14	1,500	75	0	0	500	25
15	1,500	75	0	0	500	25

ตารางที่ 8 ส่วนประกอบชุดที่ 2 ในการทดลองหมักน้ำปลาโดยใช้รำข้าวเจ้าและเกลือเริ่มต้นการหมักปริมาณต่างๆ

การทดลองที่	ส่วนประกอบในการหมักน้ำปลา					
	ปลากะตัก		รำข้าวเจ้า		เกลือป่น	
	กรัม	%	กรัม	%	กรัม	%
1	1,500	55	545	20	682	25
2	1,500	55	545	20	682	25
3	1,500	55	545	20	682	25
4	1,500	60	375	15	625	25
5	1,500	60	375	15	625	25
6	1,500	60	375	15	625	25
7	1,500	65	230	10	577	25
8	1,500	65	230	10	577	25
9	1,500	65	230	10	577	25
10	1,500	70	107	5	535	25
11	1,500	70	107	5	535	25
12	1,500	70	107	5	535	25
13	1,500	75	0	0	500	25
14	1,500	75	0	0	500	25
15	1,500	75	0	0	500	25

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1.เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus oryzae* รหัส MI PSU1, MI PSU2 และ MI PSU3 ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ส่วนเชื้อรา *Aspergillus oryzae* รหัส TISTR 3018, TISTR 3027, TISTR 3083, TISTR 3102 และ TISTR 3104 จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR) และได้ทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างโคจิซีอิ๊วของโรงงานซีอิ๊วในจังหวัดสงขลาจำนวน 2 โรงงาน คือ โรงงานซีอิ๊วอ่องเฮียบเซ่ง และ โรงงานซีอิ๊วตราไก่ จากการแยกเชื้อบนอาหาร potato dextrose agar พบว่า เชื้อทั้งสองโรงงาน สร้าง conidia สีเขียว ลักษณะของเชื้อจากกล้องจุลทรรศน์มี conidiophore ซึ่งเกิดจาก foot cell และปลาย conidiophore ขยายใหญ่เป็น vesicle มี sterigma ซึ่งสร้าง conidia ติดอยู่ เมื่อเทียบเคียงกับการจัดจำแนกเชื้อราพบว่า เชื้อราที่แยกจากโคจินี้เป็น *Aspergillus* sp. และให้รหัสเป็น EX1 และ EX2 ตามลำดับ

2. การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ทนเกลือ

จากการคัดเลือกเชื้อ *A. oryzae* สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ทนเกลือ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ sodium caseinate agar ดัดแปลงโดยการเติมเกลือ(NaCl) 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เชื้อทั้ง 10 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองสามารถเจริญและสร้างเอนไซม์โปรติเอสทนเกลือได้ โดย มีเชื้อ *A. oryzae* จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *A. oryzae* TISTR 3083 และ *A. oryzae* MI PSU1 มีความสามารถในการเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ความเข้มข้นของเกลือสูงที่สุด 15% โดยมีอัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อเป็น 1.08 และ 1.07 ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *A. oryzae* สายพันธุ์ MI PSU2 มีความสามารถในการเจริญและสร้างเอนไซม์โปรติเอสที่ความเข้มข้นของเกลือต่ำที่สุดคือ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยมี อัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อเป็น 1.04 (ตารางที่ 9)

จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์แอมิเลสโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่ ดัดแปลงจากสูตรอาหาร Czapex's agar โดยใช้ soluble starch แทน saccharose ที่เติมเกลือ (NaCl) 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ แล้วตรวจสอบการสร้างเอนไซม์แอมิเลสโดยใช้สารละลายไอโอดีนตามวิธีการของ Hesseltine และคณะ (1963) พบว่า เชื้อราทั้ง 10 สายพันธุ์ สามารถ

เจริญและสร้างเอนไซม์แอมิเลสทนเกลือได้ โดย มีเชื้อรา *A. oryzae* จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ MI PSU1, MI PSU3, TISTR 3027 และ TISTR 3102 สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ แอมิเลสได้ที่ความเข้มข้นของเกลือ 25% โดยมีอัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อเป็น 3.08, 2.00, 1.83 และ 2.00 ตามลำดับ เชื้อ *A. oryzae* สายพันธุ์ TISTR 3083 สามารถสร้างเอนไซม์ แอมิเลสได้ที่ความเข้มข้นเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยมีอัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อเป็น 0.08 ส่วนเชื้อ *A. oryzae* สายพันธุ์ TISTR 3018 มีความสามารถในการเจริญและสร้างเอนไซม์แอมิเลสที่ความเข้มข้นของเกลือต่ำที่สุดคือ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยมี อัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อเป็น 1.03 (ตารางที่ 10)

จากการทดลองนี้สามารถคัดเลือกเชื้อรา *A. oryzae* สายพันธุ์ MI PSU1 และ TISTR 3083 ไว้ศึกษาต่อไป เนื่องจากสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ที่ความเข้มเกลือสูงสุดที่ 15% ถึงแม้ว่าเชื้อราสายพันธุ์ TISTR 3083 จะมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์แอมิเลสที่ความเข้มข้นเกลือต่ำ (10%) แต่เอนไซม์ที่มีบทบาทมากที่สุดในกระบวนการหมักน้ำปลาคือเอนไซม์โปรติเอส

ตารางที่ 9 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนเกลือ ของเชื้อ *A. oryzae* สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเติมเกลือในอาหาร sodium caseinate agar ที่ความเข้มข้น 0 – 25% และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

สายพันธุ์	ความเข้มข้นของ NaCl (%)																	
	0			5			10			15			20			25		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
EX1	3.20	3.25	1.01	3.15	3.25	1.03	1.30	1.45	1.16									
EX2	3.10	3.10	1.00	3.15	3.30	1.05	1.65	1.75	1.06									
MI PSU1	3.05	3.05	1.00	2.50	3.00	1.20	1.65	1.95	1.18	0.70	0.75	1.07						
MI PSU2	3.50	3.50	1.00	2.65	2.75	1.04												
MI PSU3	3.15	3.25	1.03	2.60	2.85	1.09	1.05	1.05	1.00									
TISTR 3027	2.80	2.80	1.00	2.55	2.80	1.09	1.30	1.30	1.00									
TISTR 3018	2.55	2.55	1.00	1.80	2.60	1.44	0.95	1.05	1.10									
TISTR 3083	2.45	2.60	1.06	1.80	1.95	1.08	1.30	1.35	1.03	0.60	0.65	1.08						
TISTR 3102	2.60	2.60	1.00	2.40	2.65	1.10	1.15	1.20	1.04									
TISTR 3104	2.55	2.55	1.00	2.20	2.55	1.16	1.05	1.10	1.04									

กำหนดให้ A = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อ (cm)

B = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (cm)

C = อัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อ (cm/cm)

ตารางที่ 10 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอมิเลสทนเกลือ ของเชื้อ *A. oryzae* สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเติมเกลือในอาหาร Czapex's agar ที่ความเข้มข้น 0 – 25% และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

สายพันธุ์	ความเข้มข้นของ NaCl (%)																	
	0			5			10			15			20			25		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
EX1	4.40	4.60	1.05	3.50	3.80	1.09	1.65	1.65	1.00									
EX2	4.55	4.35	0.96	3.75	3.55	0.95	1.55	1.40	0.90									
MI PSU1	4.55	4.70	1.03	3.95	4.30	1.09	1.75	2.20	1.26	0.75	1.80	2.40	0.60	1.95	3.25	0.60	1.85	3.08
MI PSU2	5.10	5.10	1.00	2.45	3.00	1.22	0.60	1.85	3.08	0.60	1.20	2.00						
MI PSU3	4.10	4.40	1.07	2.80	3.35	1.19	1.25	2.20	1.76	0.60	1.60	2.67	0.60	1.20	2.00	0.60	1.20	2.00
TISTR 3027	4.75	5.05	1.06	3.00	3.55	1.18	1.15	2.25	1.96	0.60	1.90	3.17	0.60	1.45	2.42	0.60	1.10	1.83
TISTR 3018	3.50	3.50	1.00	1.65	1.70	1.03												
TISTR 3083	2.00	2.45	1.23	1.80	1.80	1.00	0.85	0.70	0.08									
TISTR 3102	4.50	4.70	1.04	1.90	2.45	1.29	0.75	1.90	2.53	0.60	1.30	2.17	0.60	1.15	1.92	0.60	1.20	2.00
TISTR 3104	4.00	4.25	1.06	3.75	2.95	0.79	0.75	1.35	1.80	0.60	0.75	1.25						

กำหนดให้ A = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อ (cm)

B = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (cm)

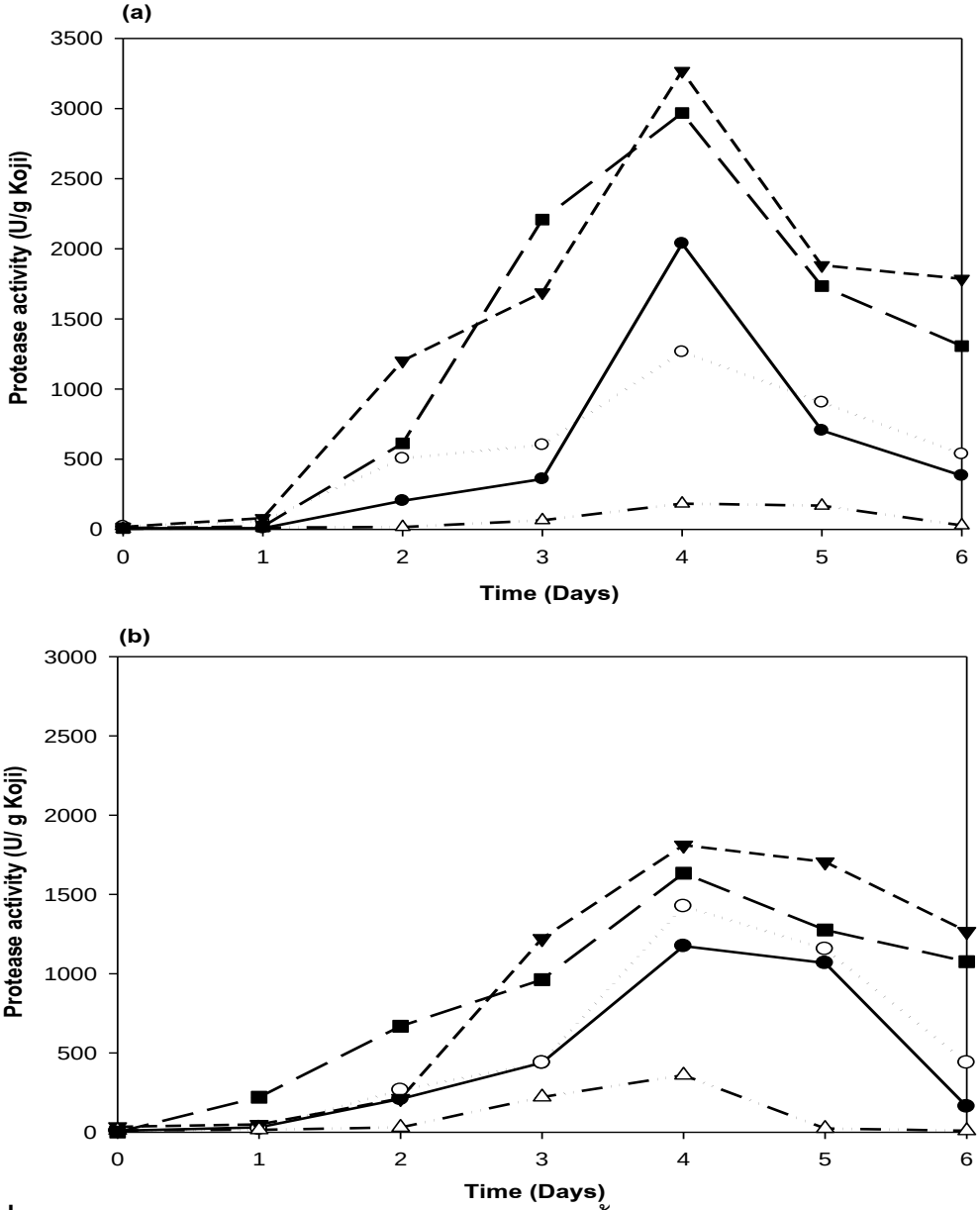
C = อัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อ (cm/cm)

3. ศึกษาการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราบนอาหารชนิดต่าง ๆ

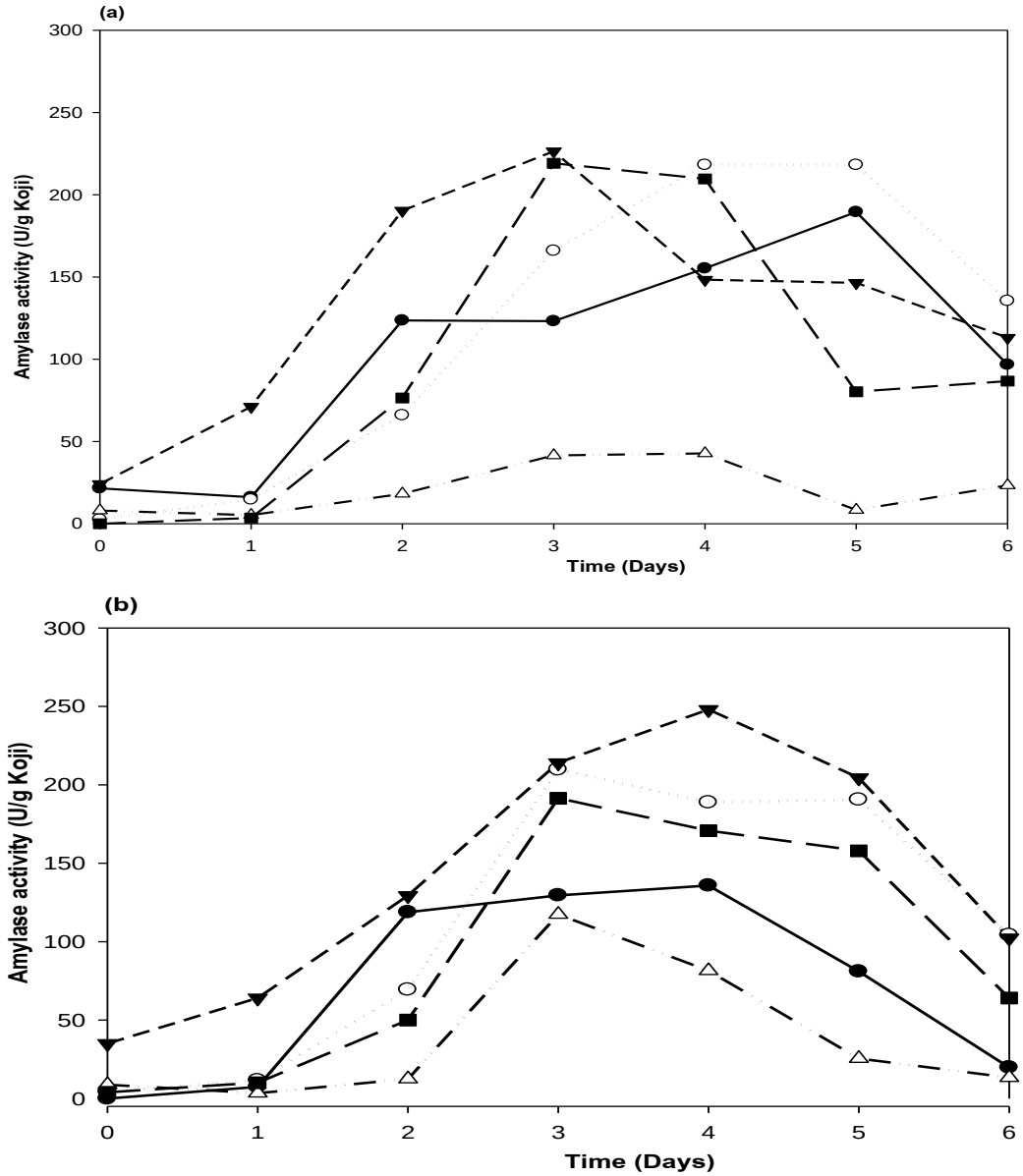
จากการเลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3083 และ *A. oryzae* MI PSU 1 บนอาหารกากถั่วเหลือง ถั่วเหลือง รำข้าวเจ้า ข้าวเจ้าและ ข้าวสาลี ที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 45% บ่มที่อุณหภูมิห้อง และเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสทุกวันจนครบ 7 วัน พบว่า *A. oryzae* TISTR 3083 และ *A. oryzae* MI PSU 1 สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอส ได้ปริมาณสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงบนอาหารรำข้าวเจ้า เป็นเวลา 4 วัน (รูปที่ 4) รองลงมาคือ เข้าเจ้า กากถั่วเหลือง ถั่วเหลือง และข้าวสาลี ตามลำดับสำหรับเชื้อสายพันธุ์ TISTR 3083 และ ข้าวเจ้า ถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง และข้าวสาลี ตามลำดับสำหรับเชื้อสายพันธุ์ MI PSU 1 โดยเชื้อรา *A. oryzae* สายพันธุ์ TISTR 3083 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงกว่าสายพันธุ์ MI PSU1 (3,267.60 U/g dry koji และ 1,810.40 U/g dry koji ตามลำดับ) บนอาหารรำข้าวเจ้าเป็นเวลา 4 วัน (รูปที่ 4)

ส่วนการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์แอมิเลส หลังจากเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทุกวันจนครบ 7 วัน พบว่า เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์สร้างเอนไซม์แอมิเลสได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงบนอาหารรำข้าวเจ้าเป็นเวลา 3 วันสำหรับเชื้อสายพันธุ์ TISTR 3083 และ 4 วันสำหรับเชื้อสายพันธุ์ MI PSU 1 (รูปที่ 5) รองลงมาคือ ข้าวเจ้า ถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง และข้าวสาลี ตามลำดับสำหรับเชื้อสายพันธุ์ TISTR 3083 และ ถั่วเหลือง ข้าวเจ้า กากถั่วเหลือง และข้าวสาลี ตามลำดับสำหรับเชื้อสายพันธุ์ MI PSU 1 โดยเชื้อราสายพันธุ์ MI PSU1 มีกิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสสูงกว่าสายพันธุ์ TISTR 3083 (247.96 U/g dry koji และ 226.38 U/g dry koji ตามลำดับ) บนอาหารรำข้าวเจ้าเป็นเวลา 4 วันสำหรับเชื้อสายพันธุ์ MI PSU 1 และ 3 วันสำหรับเชื้อสายพันธุ์ TISTR 3083 (รูปที่ 5)

ดังนั้น หลังจากการทดลองนี้ สามารถคัดเลือกเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ โปรติเอสได้สูงสุด ถึงแม้ว่าเชื้อสายพันธุ์นี้จะมีความสามารถในการ ผลิตเอนไซม์ แอมิเลสได้ต่ำกว่าสายพันธุ์ MI PSU1 แต่ก็อยู่ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน และ เอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักน้ำปลาคือเอนไซม์โปรติเอส ดังนั้นจึงเลือกเชื้อราสายพันธุ์ดังกล่าวไว้ศึกษาต่อไป และสับสเตรทที่ดีที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์คือ รำข้าวเจ้า (รูปที่ 4 และ 5)



รูปที่ 4 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (U/g dry Koji) ของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 (a) และ *A. oryzae* MI PSU1 (b) เมื่อเลี้ยงบนสับสเตรท 5 ชนิด คือ กากถั่วเหลือง ถั่วเหลือง รำข้าวเจ้า ข้าวสาลีและข้าวเจ้า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน



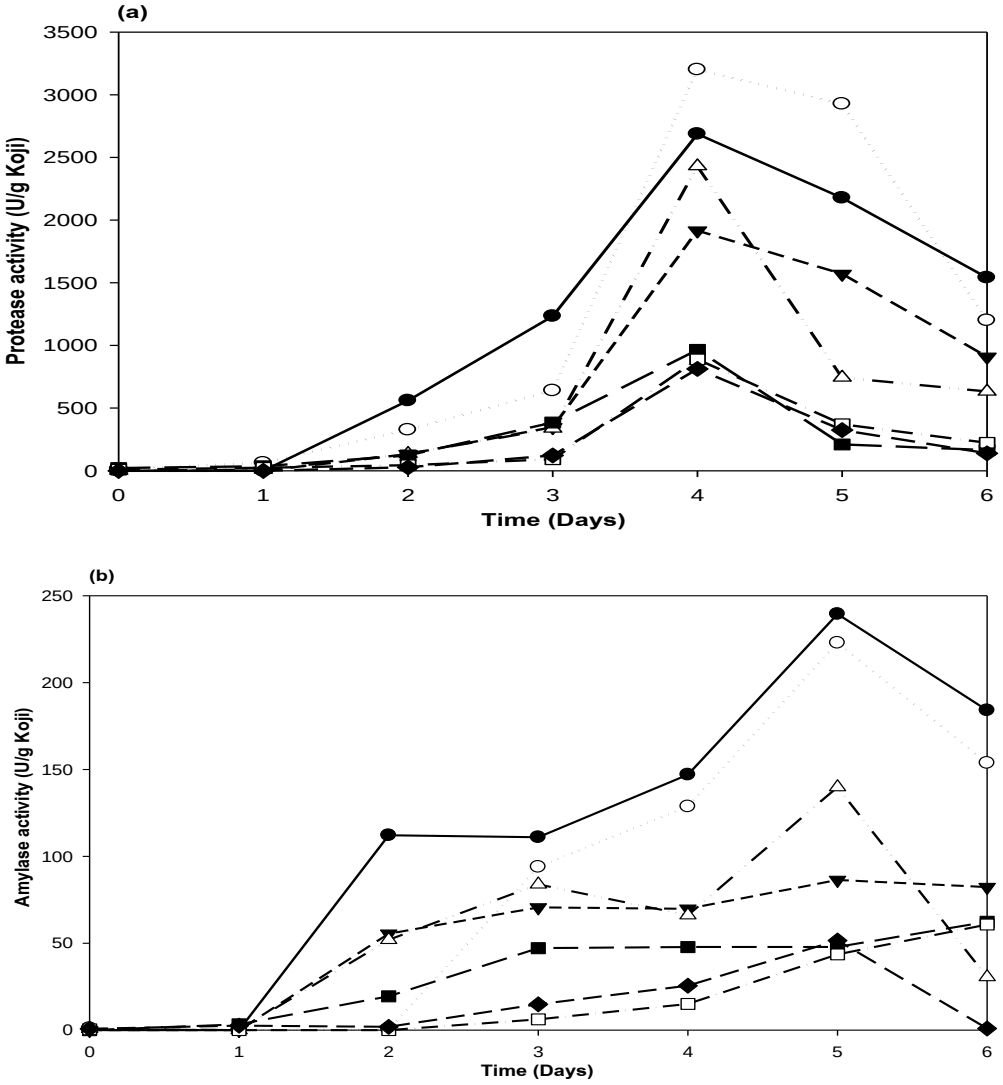
รูปที่ 5 กิจกรรมเอนไซม์แอมิเลส (U/g dry Koji) ของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 (a) และ *A. oryzae* MI PSU1 (b) เมื่อเลี้ยงบนสับสเตรท 5 ชนิด คือ กากถั่วเหลือง ถั่วเหลือง รำข้าวเจ้า ข้าวสาลีและข้าวเจ้า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ทนเกลือของเชื้อที่คัดเลือกได้

4.1 ความชื้นเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3083 บนอาหารรำข้าวเจ้า ที่มีความชื้นเริ่มต้นต่างๆ คือ 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 % บ่มที่อุณหภูมิห้อง และเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสทุกวันจนครบ 7 วัน พบว่า รำข้าวที่ปรับความชื้นเป็น 45 % จะมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด (3 ,199.80 U/g dry koji) ในวันที่ 4 ของการทดลอง รองลงมาคือ ความชื้น 40% , 55%, 50%, 60%, 65% ตามลำดับ และรำข้าวเจ้าที่ปรับความชื้นเป็น 70 % จะมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่ำที่สุด (812.60 U/g dry koji) และจากการทดลองพบว่า เชื้อราเริ่มมีการผลิตเอนไซม์หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน และผลิตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในวันที่ 3 จนถึงวันที่ 4 เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด (รูปที่ 6 a) ส่วนการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ แอมิเลสนั้นพบว่า รำข้าวเจ้าที่ปรับความชื้นเป็น 40 % จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสสูงที่สุดคือ 239.48 U/g dry koji รองลงมาคือรำข้าว เจ้าที่ปรับความชื้นเป็น 45% ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เป็น 222.86 U/g dry koji และที่ความชื้น 65% จะมีกิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสต่ำสุดคือ 43.54 U/g dry koji ในวันที่ 5 ของการทดลอง (รูปที่ 6 b)

ดังนั้น ความชื้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ในรูปของโคจิคือ 45% ถึงแม้ว่าเอนไซม์แอมิเลสจะมีความสามารถใจการผลิตเอนไซม์ได้ดีที่ความชื้นเริ่มต้นเป็น 40% แต่เอนไซม์ที่มีบทบาทมากที่สุดในกระบวนการหมักน้ำปลาคือเอนไซม์โปรติเอส ดังนั้นจึงนำผลของความชื้น 45% ไปใช้ในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 6 ความชื้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 เมื่อเลี้ยงบนรำข้าวที่ปรับความชื้นเป็น 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 % ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

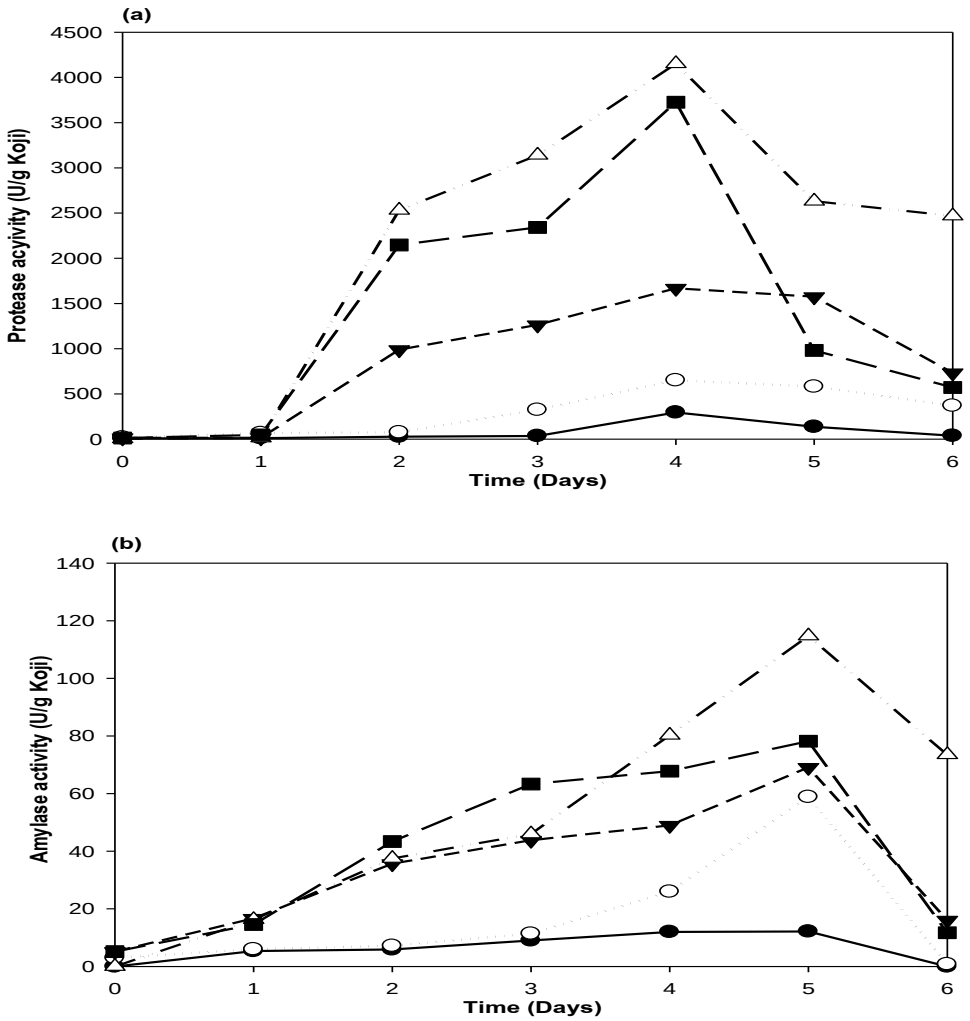
ความชื้น 40%
ความชื้น 45%
ความชื้น 50%
ความชื้น 55%
ความชื้น 60%
ความชื้น 65%
ความชื้น 70%

4.2 พีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

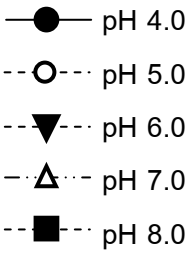
จากการเลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3083 บนอาหารรำข้าวเจ้า ที่มีความชื้นเริ่มต้น 45 % ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0 , 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง และเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและ แอมิเลสทุกวันจนครบ 7 วัน พบว่า รำข้าวเจ้าที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 จะมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด (4 ,151.20 U/g dry koji) รองลงมาคือ 8.0, 6.0 และ 5.0 ตามลำดับ ซึ่งรำข้าวที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0 จะมีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสต่ำสุด (294.80 U/g dry koji) และจากการทดลองพบว่า เชื้อราเริ่มมีการผลิตเอนไซม์ โปรติเอส หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน และผลิตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในวันที่ 3 จนถึงวันที่ 4 เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ โปรติเอสได้สูงสุด (รูปที่ 7 a) ส่วนการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสนั้นพบว่า รำข้าวเจ้าที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 จะมีกิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสสูงสุดคือ 114.69 U/g dry koji รองลงมาคือ พีเอช 8.0 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสเป็น 87.17 U/g dry koji และ ที่พีเอช 4.0 จะมีกิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสต่ำที่สุดคือ 12.15 U/g dry koji ในวันที่ 5 ของการทดลอง (รูปที่ 7 b)

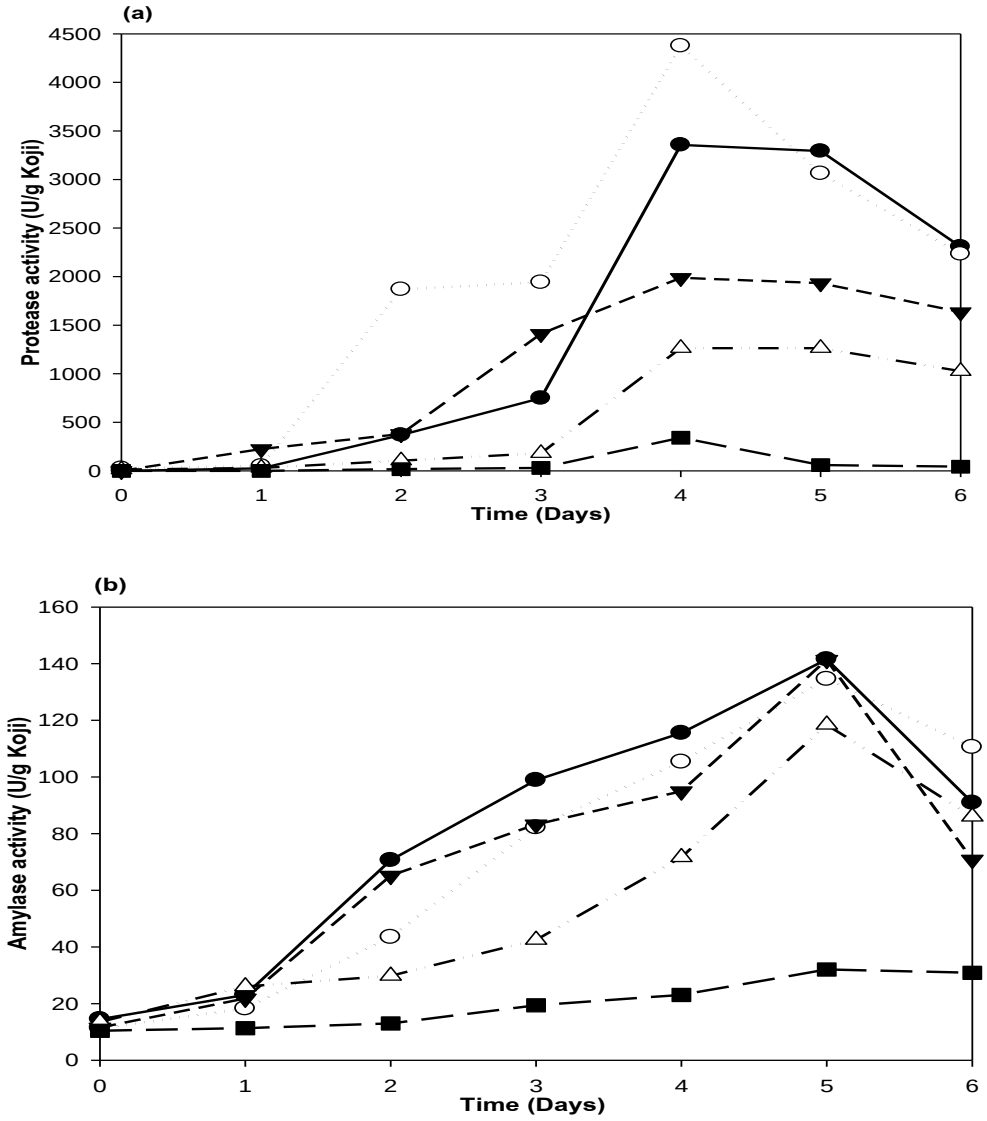
4.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3083 บนอาหารรำข้าวเจ้าที่มีความชื้นเริ่มต้น 45% พีเอชเริ่มต้น 7.0 และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิแตกต่างกัน คือ 25, 30, 35, 40 และ 45 °C ตามลำดับ เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและ แอมิเลสทุกวันจนครบ 7 วัน พบว่า เมื่อบ่มเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 °C จะมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด (4 ,375.60 U/g dry koji) รองลงมาคือ 25, 35 และ 40 °C ตามลำดับ เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45 °C จะมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่ำสุด (340.80 U/g dry koji) และจากการทดลองพบว่า เชื้อราเริ่มมีการผลิตเอนไซม์หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน และผลิตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในวันที่ 3 จนถึงวันที่ 4 เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด (รูปที่ 8 a) ส่วนการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ แอมิเลสนั้นพบว่า เมื่อบ่มเชื้อรา ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 °C จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ แอมิเลส สูงที่สุด คือ 141.56, 134.61 และ 141.35 U/g dry koji ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 45 °C จะมีกิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสต่ำที่สุด คือ 32.06 U/g dry koji ในวันที่ 5 ของการทดลอง (รูปที่ 8 b)



รูปที่ 7 พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 เมื่อเลี้ยงบนรำข้าวเจ้าที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 45% และปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0 , 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน





รูปที่ 8 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 เมื่อเลี้ยงบนรำข้าวเจ้าที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 45% และปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40 และ 45 °C ตามลำดับ เป็นเวลา 7 วัน

5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมโปรติเอสและแอมิเลส

5.1 การเตรียมเอนไซม์

การเตรียมเอนไซม์จากโคจิ โดยเลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3083 บนอาหารรำข้าวเจ้าที่ปรับให้มีความชื้นเริ่มต้น 45 เปอร์เซ็นต์ และมีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศา - เซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เมื่อครบกำหนดนำโคจิมาวิเคราะห์น้ำหนักแห้ง กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลส

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสซึ่งให้ผลแตกต่างกันคือ เอนไซม์โปรติเอสสามารถผลิตได้สูงสุดในวันที่ 4 ส่วนเอนไซม์แอมิเลสผลิตได้สูงสุดในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ แต่เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลายเนื้อปลาระหว่างการหมักน้ำปลา และโดยที่มีจุดประสงค์จะเร่งกระบวนการหมักน้ำปลาโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสจากโคจิของเชื้อรา ดังนั้นจึงทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสจากโคจิของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 หลังจากที่เลี้ยงเชื้อตามสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เป็นเวลา 4 วัน เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพิจารณานำโคจิไปใช้เร่งกระบวนการหมักน้ำปลา

5.2 สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมโปรติเอสและแอมิเลส

ในการทดลองนี้เป็นการศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสทั้งหมด (total protease) และเอนไซม์แอมิเลสทั้งหมด (total amylase) ในสภาพที่มี พีเอช อุณหภูมิ และความเข้มข้นของเกลือแกงต่างๆ ทั้งนี้โดยพิจารณาจากสภาวะการนำเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสในรูปของโคจิมาใช้ในการเร่งกระบวนการหมักน้ำปลา ซึ่งผลการย่อยสลายโปรตีนเป็นผลร่วมของกิจกรรมโปรติเอสทั้ง 3 ชนิดประกอบกัน (acid protease, neutral protease และ alkaline protease) โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นกับสภาพพีเอชในการหมัก มิได้เป็นผลจากเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งโดยสิ้นเชิง (Chaveesuk และคณะ, 1993)

5.2.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมโปรติเอสและแอมิเลส

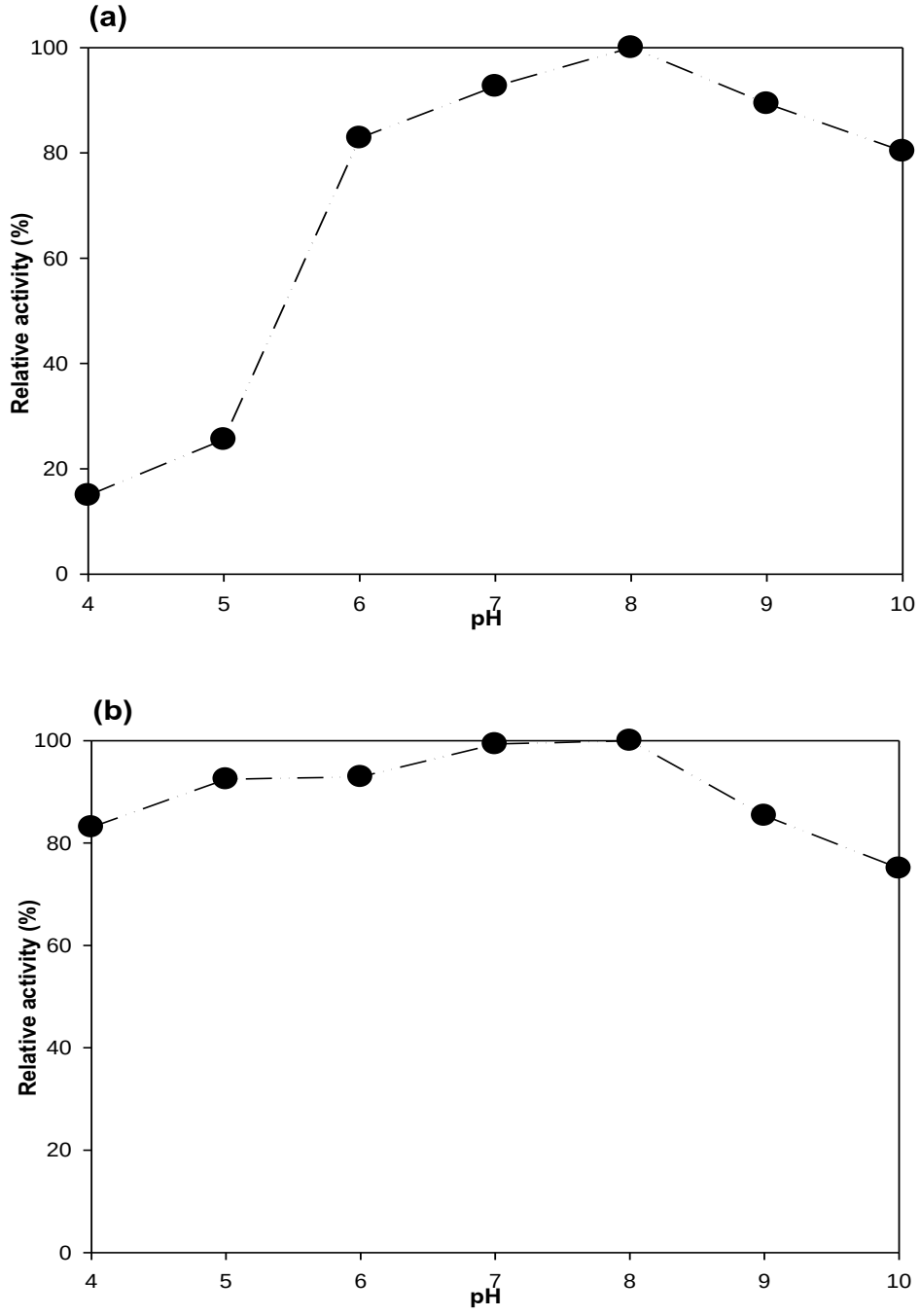
จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและ แอมิเลสที่พีเอชต่างๆ คือ 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ10 พบว่า พีเอชต่างๆ มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 ซึ่งใช้เคซีนเป็นสับสเตรท (รูปที่ 9 a) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ที่ระดับพีเอชต่างๆ มีลักษณะแตกต่างกันอย่างชัดเจน คือ ที่พีเอช 4.0 ถึง 5.0 ซึ่งช่วงนี้ตรวจวิเคราะห์กิจกรรมโปรติเอสได้เพียงเล็กน้อย ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสช่วงพีเอช 6.0 ถึง 8.0 จะมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3083 เพิ่มสูงขึ้นจนถึงพีเอช 8.0 ซึ่งมีระดับกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด และเมื่อพีเอชเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ช่วงพีเอช 9.0 ถึง 10.0

กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสลดลงอย่างรวดเร็ว และ จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสที่พีเอชต่างๆ คือ 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ10 พบว่า พีเอชต่างๆ มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 ซึ่ง เอนไซม์แอมิเลสนั้นมีแนวโน้มเช่นเดียวกับเอนไซม์โปรติเอสคือ ที่พีเอช 4.0 มีกิจกรมของเอนไซม์ แอมิเลสต่ำและกิจกรรมของเอนไซม์ แอมิเลส จะสูงขึ้นเรื่อยๆจนถึงพีเอช 8.0 ซึ่งจะมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดและเริ่มลดลงเมื่อเพิ่มพีเอชเป็น 9.0 และ 10.0 ตามลำดับ(รูปที่ 9 b)

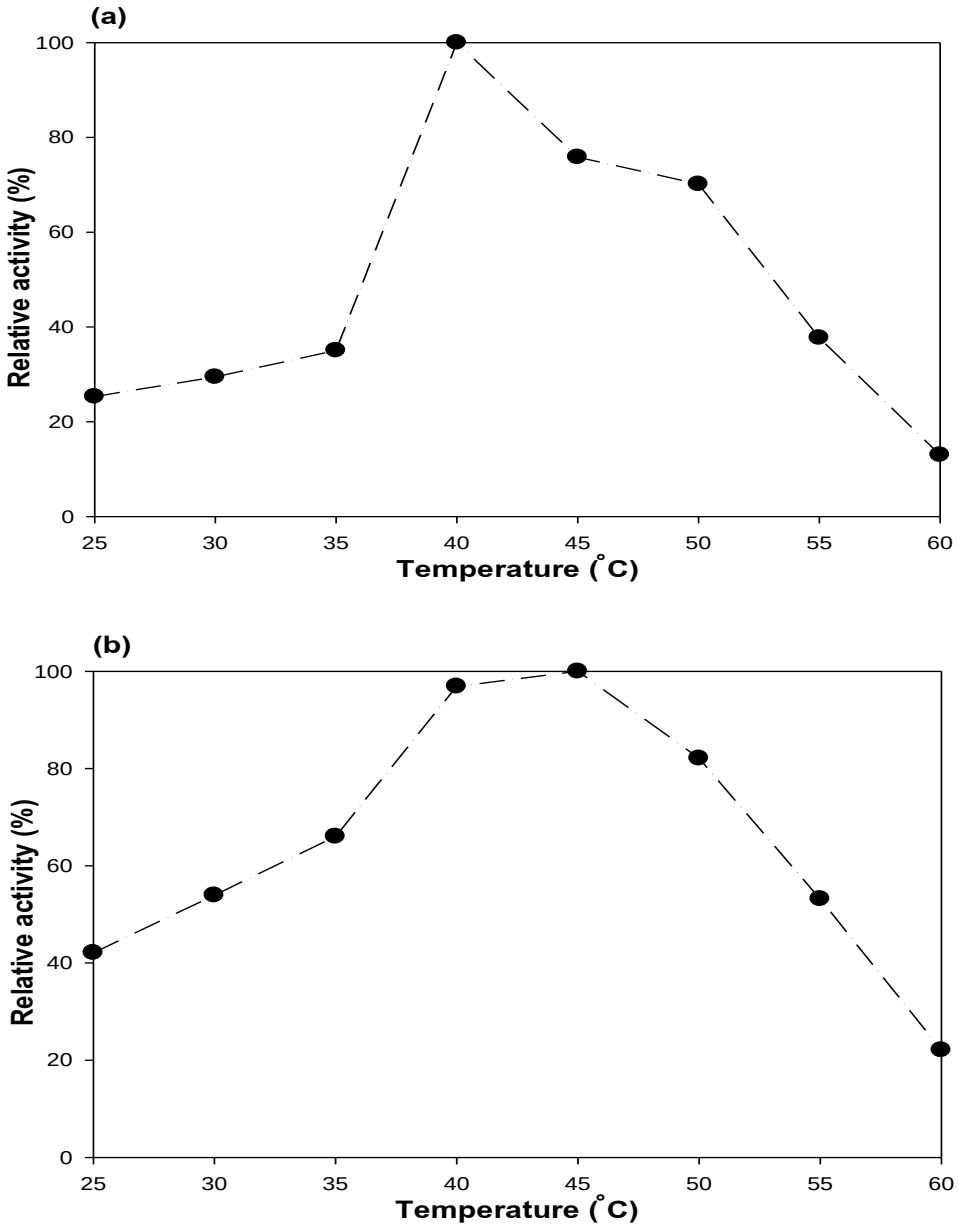
ดังนั้น พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปติเอสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 เท่ากับ 8.0 เมื่อใช้เคซีนที่ละลายใน 0.05 M phosphate buffer พีเอช 8.0 เป็นสับสเตรท ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สำหรับเอนไซม์โปรติเอส และพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 เท่ากับ 8.0 เช่นเดียวกัน เมื่อใช้แป้งที่ละลายใน 0.05 M McIlvaine buffer พีเอช 8.0 เป็นสับสเตรท

5.2.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมโปรติเอสและแอมิเลส

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้เคซีนที่ละลายใน 0.05 M phosphate buffer พีเอช 8.0 เป็นสับสเตรท ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (รูปที่ 9 a) พบว่า ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด และเมื่อให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้นค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง (รูปที่ 10 a) ส่วนกิจกรรมเอนไซม์แอมิเลส เมื่อใช้แป้งที่ละลายใน 0.05 M McIlvaine buffer พีเอช 8.0 เป็นสับสเตรท ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งเป็น พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์แอมิเลส (รูปที่ 9 b) พบว่า ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะมีกิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสสูงที่สุด รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสจะค่อยๆ ลดลง เช่นเดียวกับเอนไซม์โปรติเอส และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจะมีกิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสต่ำที่สุด (รูปที่ 10 b)



รูปที่ 9 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 ที่เลี้ยงบนรำข้าวเจ้า บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน

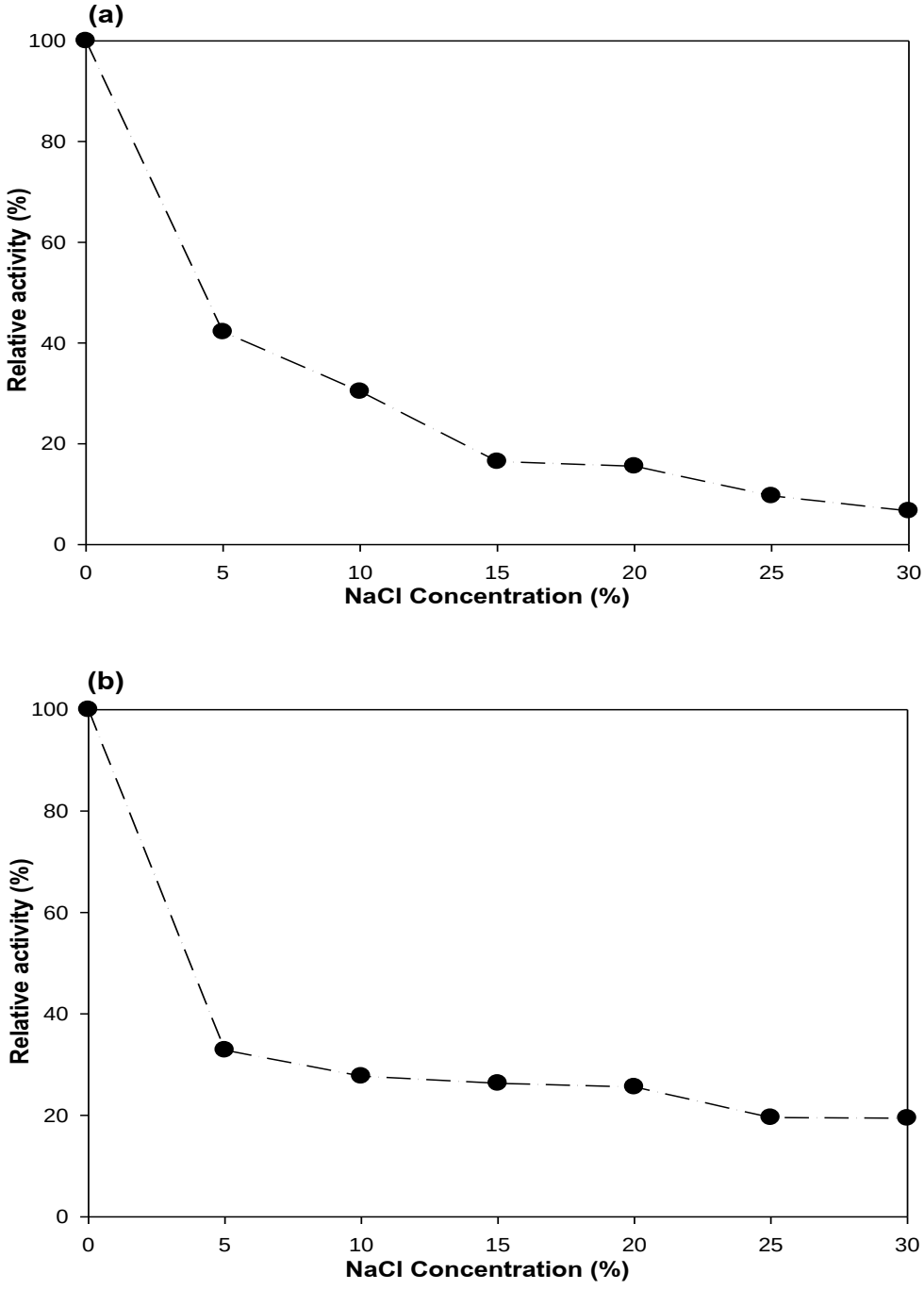


รูปที่ 10 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 ที่เลี้ยงบนรำข้าวเจ้า บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน

5.2.3 ผลของความเข้มข้นเกลือแกง (NaCl) ต่อกิจกรรมโปรติเอสและแอมิเลส

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในสภาพที่มีเกลือแกงในระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ใช้เกลือแกงมาเจือจางใน 0.05 M phosphate buffer พีเอช 8.0 ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (รูปที่ 9 a) ให้มีปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือแกงในสารละลายปฏิกิริยาเป็น 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเจือจางสารละลายเอนไซม์ และใช้เคซีนที่ละลายใน 0.05 M phosphate buffer พีเอช 8.0 และละลายในเกลือแกงให้มี ปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือแกงในสารละลายปฏิกิริยาเป็น 0 , 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นสับสเตรท ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส เป็นเวลา 10 นาที พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเกลือแกงเพิ่มขึ้นมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสลดลงตามลำดับ (รูปที่ 11 a) โดยในสารละลายปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นเกลือแกง 30 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสลดลงจากสภาวะที่ไม่มีเกลือแกงอยู่เลยถึง 91.05 เปอร์เซ็นต์

ส่วนการศึกษากิจกรรมเอนไซม์แอมิเลสในสภาวะที่มีเกลือแกงในระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ใช้เกลือแกงมาเจือจางใน 0.05 M McIlvaine buffer พีเอช 8.0 ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (รูปที่ 9 b) ให้มีปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือแกงในสารละลายปฏิกิริยาเป็น 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเจือจางสารละลายเอนไซม์ และใช้แป้งที่ละลายใน 0.05 M McIlvaine buffer พีเอช 8.0 เป็นสับสเตรท ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศา - เซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์แอมิเลส เป็นเวลา 10 นาที พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเกลือแกงเพิ่มขึ้นมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสลดลงเช่นเดียวกับเอนไซม์โปรติเอส (รูปที่ 11 b) โดยในสารละลายปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นเกลือแกง 30 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสลดลงจากสภาวะที่ไม่มีเกลือแกงอยู่เลยถึง 80.02 เปอร์เซ็นต์

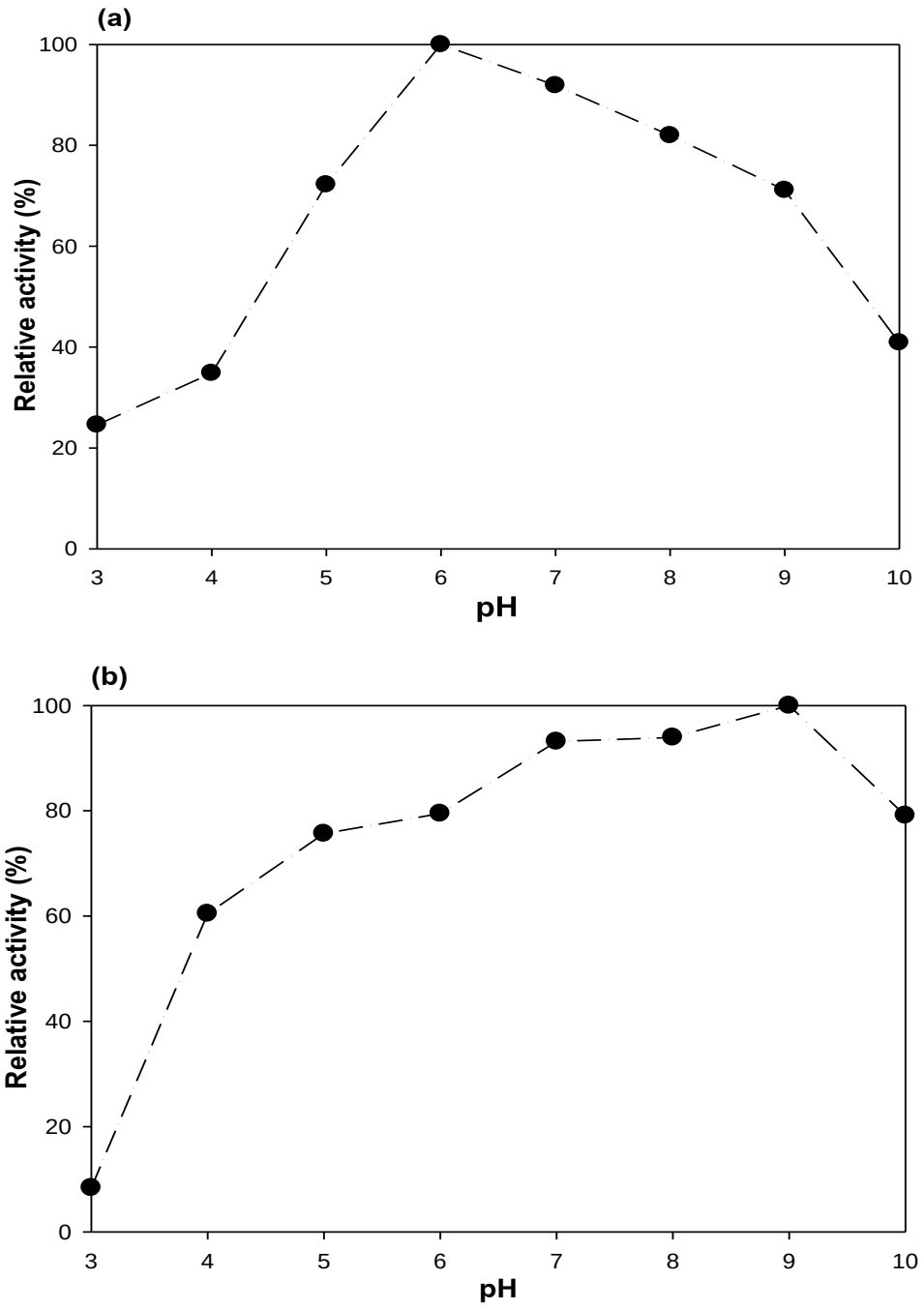


รูปที่ 11 ผลของความเข้มข้นเกลือ (NaCl) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 ที่เลี้ยงบนรำข้าวเจ้าบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน

5.2.4 ผลของพีเอชต่อความคงทนของเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลส

เนื่องจากในกระบวนการหมักน้ำปลาหรือสภาวะการนำเอนไซม์ไปใช้งานต่างๆ ระดับพีเอชอาจแตกต่างจากพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ดังนั้น จึงศึกษาความคงทนของเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 โดยเจือจางสารละลายเอนไซม์ให้เหมาะสมโดยใช้บัฟเฟอร์ที่แตกต่างกันให้มีพีเอชเป็น 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำมาหากิจกรรมโปรติเอสและแอมิเลส

สำหรับผลของพีเอชต่อความคงทนของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อนำสารละลายเอนไซม์ ไปเจือจางกับบัฟเฟอร์ที่ระดับพีเอชที่แตกต่างกัน แล้วนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (รูปที่ 10 a) เป็นเวลา 10 นาที พบว่า เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 มีความคงทนสูงที่ระดับ พีเอช 6.0 – 7.0 และที่พีเอช 3.0 และ 4.0 เอนไซม์จะมีความคงทนต่ำที่สุด ดังรูปที่ 12 (a) ส่วนเอนไซม์แอมิเลสนั้นเมื่อนำสารละลายเอนไซม์ ไปเจือจางกับบัฟเฟอร์ที่ระดับพีเอชที่แตกต่างกัน แล้วนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แอมิเลสที่อุณหภูมิ 45 องศา - เซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลส (รูปที่ 10 b) พบว่าเอนไซม์แอมิเลส มีความคงทนสูง ที่ระดับพีเอช 7.0 – 9.0 และที่พีเอช 3.0 เอนไซม์จะมีความคงทนต่ำที่สุด ดังรูปที่ 12(b)

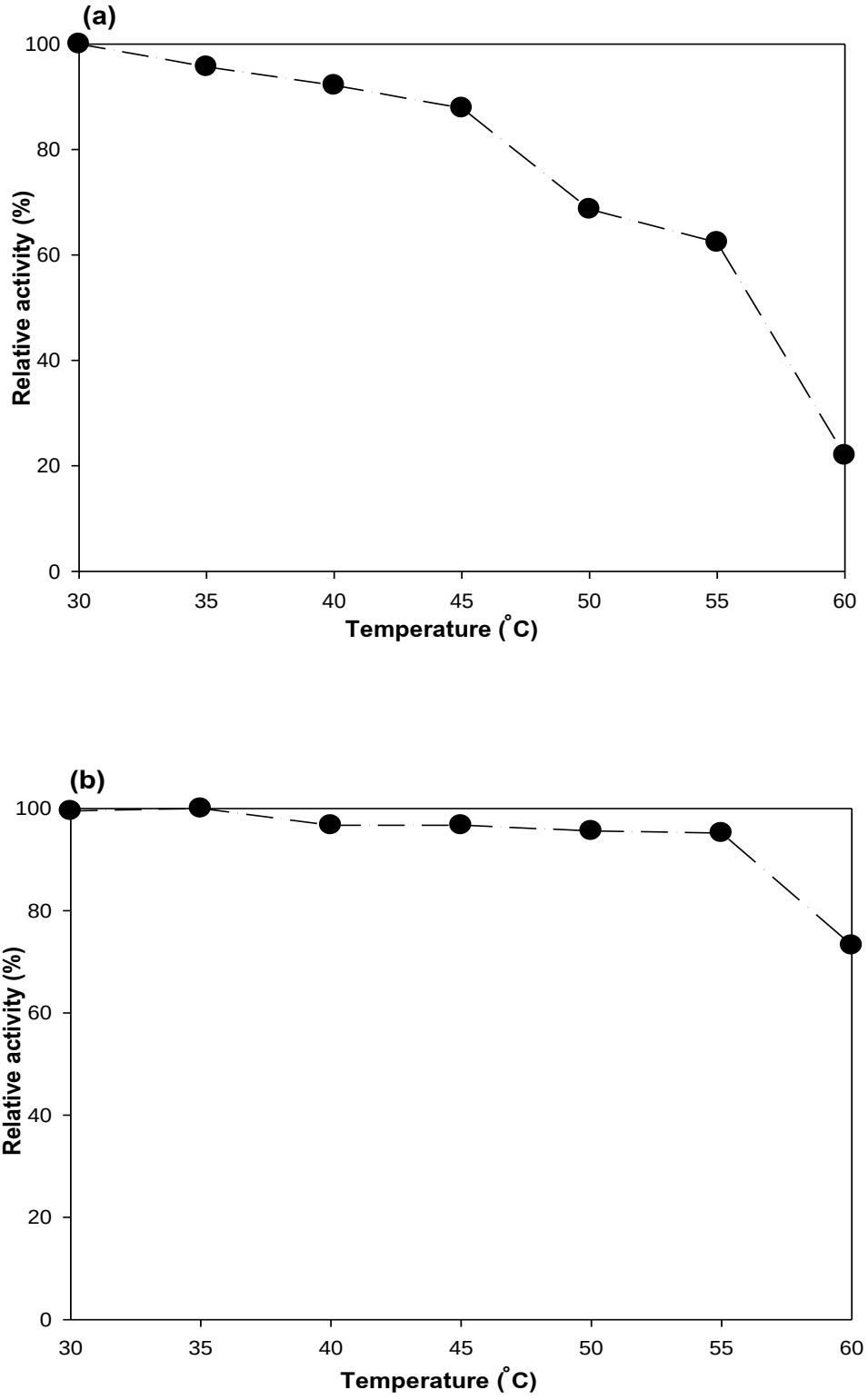


รูปที่ 12 ผลของพีเอชต่อความคงทนของเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 เมื่อเลี้ยงบนรำข้าวเจ้า ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน

5.2.5 ผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลส

เนื่องจากในกระบวนการหมักน้ำปลาหรือสภาวะการนำเอนไซม์ไปใช้งานต่างๆ ระดับอุณหภูมิอาจแตกต่างจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ดังนั้น จึงทำการทดลองโดยศึกษาความคงทนของเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 โดยบ่มเอนไซม์ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ คือ 30, 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลส

สำหรับผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของเอนไซม์โปรติเอส เมื่อนำสารละลาย เอนไซม์ไปตั้งที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน เมื่อเวลาครบ 30 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (รูปที่ 10 a) เป็นเวลา 10 นาที พบว่า เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 มีความคงทนต่ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเอนไซม์โปรติเอสจะมีความคงทนลดต่ำลง และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์สามารถรักษาระดับกิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้ 82.5 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 1 3 a) ส่วน เอนไซม์ แอมิเลสนั้นเมื่อนำสารละลายเอนไซม์ไปวางที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน เมื่อเวลาครบ 30 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แอมิเลสที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลส (รูปที่ 10 b) เป็นเวลา 10 นาที พบว่า เอนไซม์แอมิเลสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 มีความคงทนต่ออุณหภูมิในช่วง 30 - 55 องศาเซลเซียส ซึ่งมีระดับกิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสไกล้เคียงกัน และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์แอมิเลสมีระดับกิจกรรมลดลง (รูปที่ 13 b)



รูปที่ 13 ผลของอุณหภูมิ ต่อความคงทนของเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 เมื่อเลี้ยงบนรำข้าวเจ้า ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน

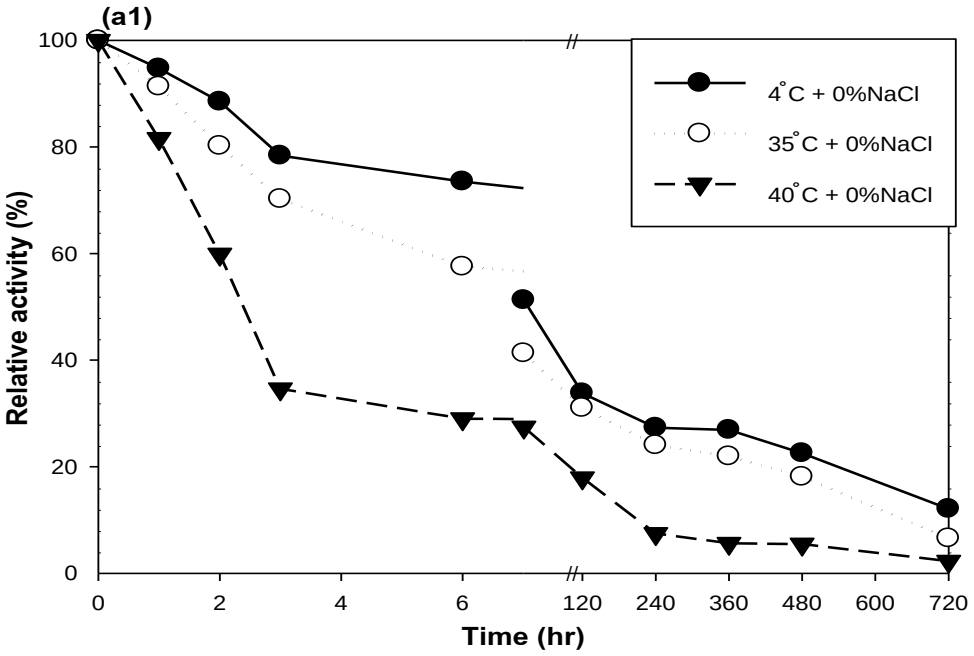
5.2.6 ผลของความเข้มข้นของเกลือ(NaCl)ต่อความคงทนของเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลส

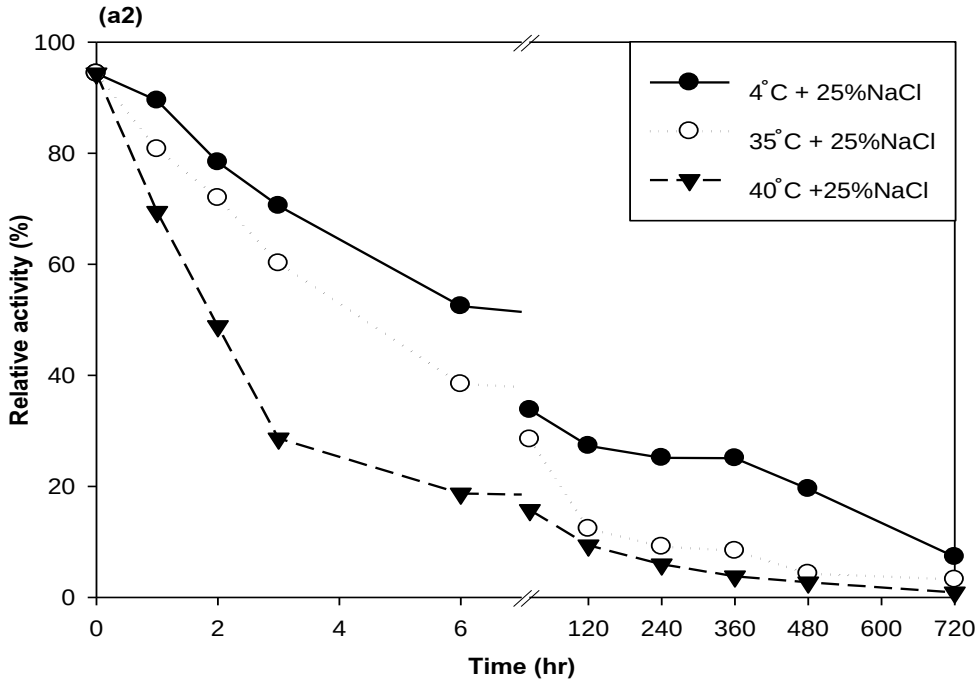
ศึกษาความคงทนของเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 ในสภาวะที่ไม่มีเกลือแกง และสภาวะที่มีเกลือแกง 25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นเกลือแกงสูงสุดในสารละลายเอนไซม์ และสารละลายเคซีนที่สามารถเตรียมได้ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4, 35 และ 40 องศาเซลเซียส

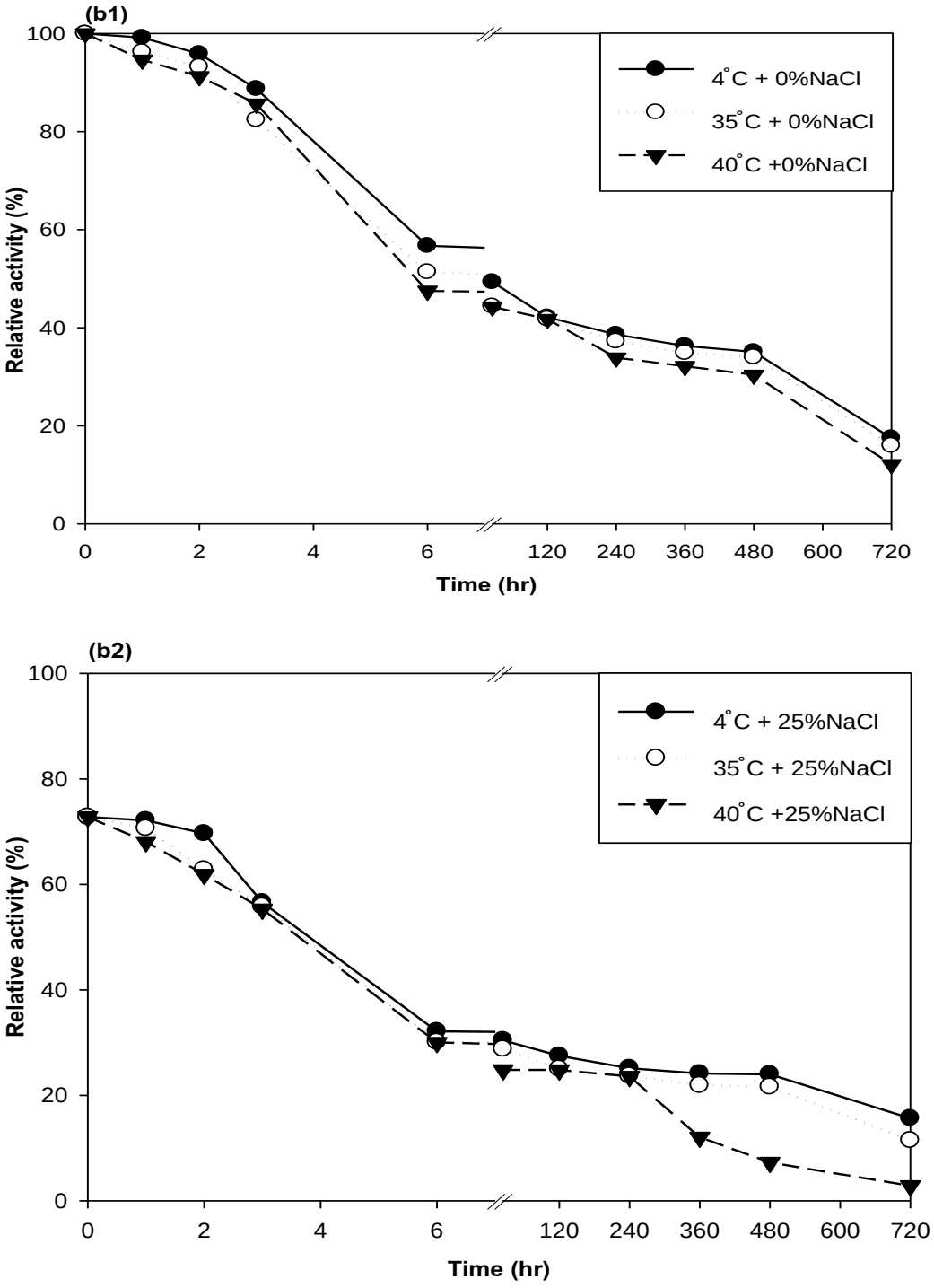
สำหรับ ผลของความเข้มข้นของเกลือต่อความคงทนของเอนไซม์ โปรติเอส เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่มีเกลือและไม่มีเกลือผสมอยู่ไปวางที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 ในสภาวะที่ไม่มีเกลือแกงสูงกว่าสภาวะที่มีเกลือแกงในช่วง 6 ชั่วโมงแรก ทั้งที่อุณหภูมิ 4, 35 และ 40 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด รองลงมาคือ 35 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และตั้งแต่ที่ 24 ชั่วโมง กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสทั้งในสภาวะที่ไม่มีและมีเกลือแกง ลดต่ำลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งชั่วโมงที่ 720 ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ต่ำมาก แต่คงเหลือกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีและไม่มีเกลือแกงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อยู่สูงกว่าที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส อยู่เล็กน้อย ดังรูปที่ 14 (a1) และ (a2)

ส่วนผล ของความเข้มข้นของเกลือต่อความคงทนของเอนไซม์แอมิเลสเมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่ มีเกลือและ ไม่มีเกลือผสมอยู่เมื่อนำไปวางที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกัน พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส คือ กิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสในสภาวะที่ไม่มีเกลือแกงสูงกว่าสภาวะที่มีเกลือแกงอย่างชัดเจนในช่วง 6 ชั่วโมงแรก โดยที่ทั้ง 3 ระดับอุณหภูมิมีกิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสใกล้เคียงกัน ทั้งที่อุณหภูมิ 4 , 35 และ 40 องศา - เซลเซียส และตั้งแต่ที่ 24 ชั่วโมง กิจกรรมเอนไซม์แอมิเลสทั้งในสภาพที่ไม่มีและมีเกลือแกง ลดต่ำลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งชั่วโมงที่ 720 ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสที่ต่ำมาก แต่คงเหลือกิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลสในสภาวะที่ไม่มีเกลือแกงอยู่สูงกว่าสภาวะที่มีเกลือแกงทั้ง 3 ระดับอุณหภูมิ ดังรูปที่ 14 (b1) และ (b2)

ดังนั้นความคงทนต่อเกลือแกงของเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 จึงขึ้นอยู่กับสภา วะความเข้มข้นเกลือ อุณหภูมิ และระยะเวลา โดยเมื่อสภาวะความเข้มข้นเกลือ อุณหภูมิ และระยะเวลา มากขึ้น ความคงทนของเอนไซม์ จะลดลง นอกจากนี้ ยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วย


(a1)
Relative activity (%)
Time (hr)
4°C + 0%NaCl
35°C + 0%NaCl
40°C + 0%NaCl
0
20
40
60
80
100
0
2
4
6
120
240
360
480
600
720


(a2)
Relative activity (%)
Time (hr)
4°C + 25%NaCl
35°C + 25%NaCl
40°C +25%NaCl
0
20
40
60
80
100
0
2
4
6
120
240
360
480
600
720

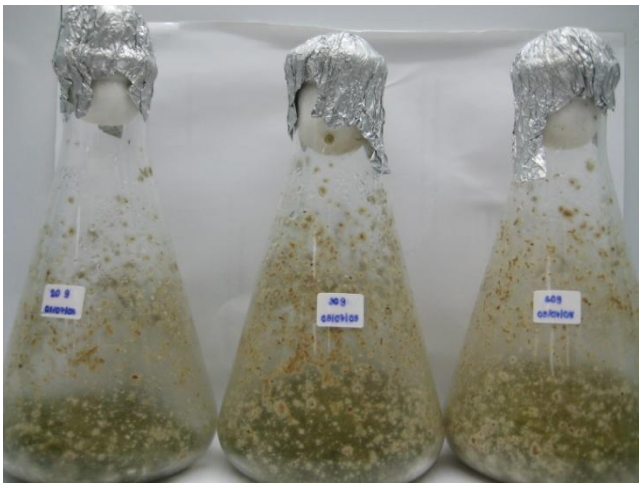


รูปที่ 14 ผลของความเข้มข้นเกลือต่อความคงทนของเอนไซม์โปรติเอส (a1และ a2) และแอมิเลส (b1และ b2) ของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083

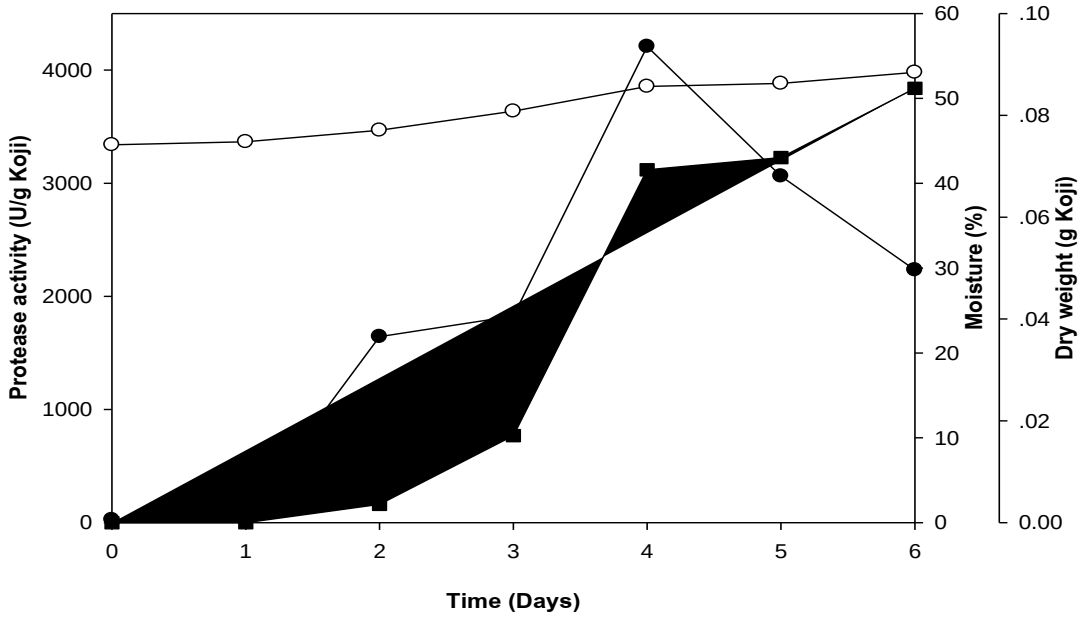
6. การเตรียมโคจิเพื่อใช้ในการผลิตน้ำปลา

หลังจากที่ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์และสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 จะเห็นได้ว่าเชื้อราสายพันธุ์นี้มีระดับความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนเกลือได้ในปริมาณที่สูง ถึงแม้ว่าเชื้อจะมีความสามาถในการผลิตเอนไซม์แอมิเลสทนเกลือต่ำกว่าเชื้อสายพันธุ์อื่นๆที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 10) โดยเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3083 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 4,375.60 U/g dry koji และผลิตเอนไซม์แอมิเลสได้สูงสุด 141.56 U/g dry koji ในเวลา 4 วันสำหรับเอนไซม์โปรติเอส และ 5 วันสำหรับเอนไซม์แอมิเลส ดังนั้นจึงทำการผลิตเอนไซม์ในรูปของโคจิ เป็นเวลา 4 วัน เนื่องจากเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุดสำหรับการเร่งกระบวนการหมักน้ำปลาในการทดลองต่อไป

การผลิตโคจิเพื่อ ใช้ในการหมักน้ำปลา ดังรูปที่ 15 โดยใช้สปอร์เชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 กับอาหารรำข้าวเจ้า ที่มีความชื้นเริ่มต้น 45 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 8.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 30 นาที คลุกเคล้ากับสปอร์จากเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 ในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 600 ml เกลี่ยให้กระจาย โดยให้มีความหนาประมาณ 1 นิ้ว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมโปรติเอส น้ำหนักแห้ง และ ความชื้นทุกวัน ซึ่งผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1 6 พบว่า เชื้อราในโคจิสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุด 4 ,208 U/g dry koji มีความชื้นอยู่ที่ 51.17 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักแห้งของ โคจิอยู่ที่ 0.0693 กรัม ในวันที่ 4 ของการบ่ม



รูปที่ 15 โคจิที่ผลิตได้จากเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3083 เมื่อเลี้ยงบนรำข้าวเจ้าที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 45% พีเอชเริ่มต้น 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 4 วัน



รูปที่ 16 การเจริญ การผลิตเอนไซม์โปรติเอส และการเปลี่ยนแปลงความชื้น ของเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3083 ที่เลี้ยงบนอาหารรำข้าวเจ้า ใน ขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 600 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วันเพื่อนำไปใช้ในการหมักน้ำปลา

7. การหมักน้ำปลาโดยใช้โคจิช่วยเร่งกระบวนการหมัก

จากการทดลองหมักน้ำปลาชุดที่ 1 (รูปที่ 17) โดยใส่โคจิปริมาณต่างๆ กัน คือ 0 , 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ปลากะตักจำนวน 1 ,500 กรัม และเกลือป่นจำนวน 25 กรัม (ตารางที่ 7) และการหมักน้ำปลาในชุดที่ 2 (รูปที่ 18) โดยใส่รำข้าวเจ้าปริมาณต่างๆ กัน คือ 0 , 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ปลากะตักจำนวน 1,500 กรัม และเกลือป่นจำนวน 25 กรัม (ตารางที่ 8) หมักไว้เป็นเวลา 4 เดือน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างน้ำปลาทุกสัปดาห์ มาศึกษาสมบัติของน้ำปลาที่หมักได้

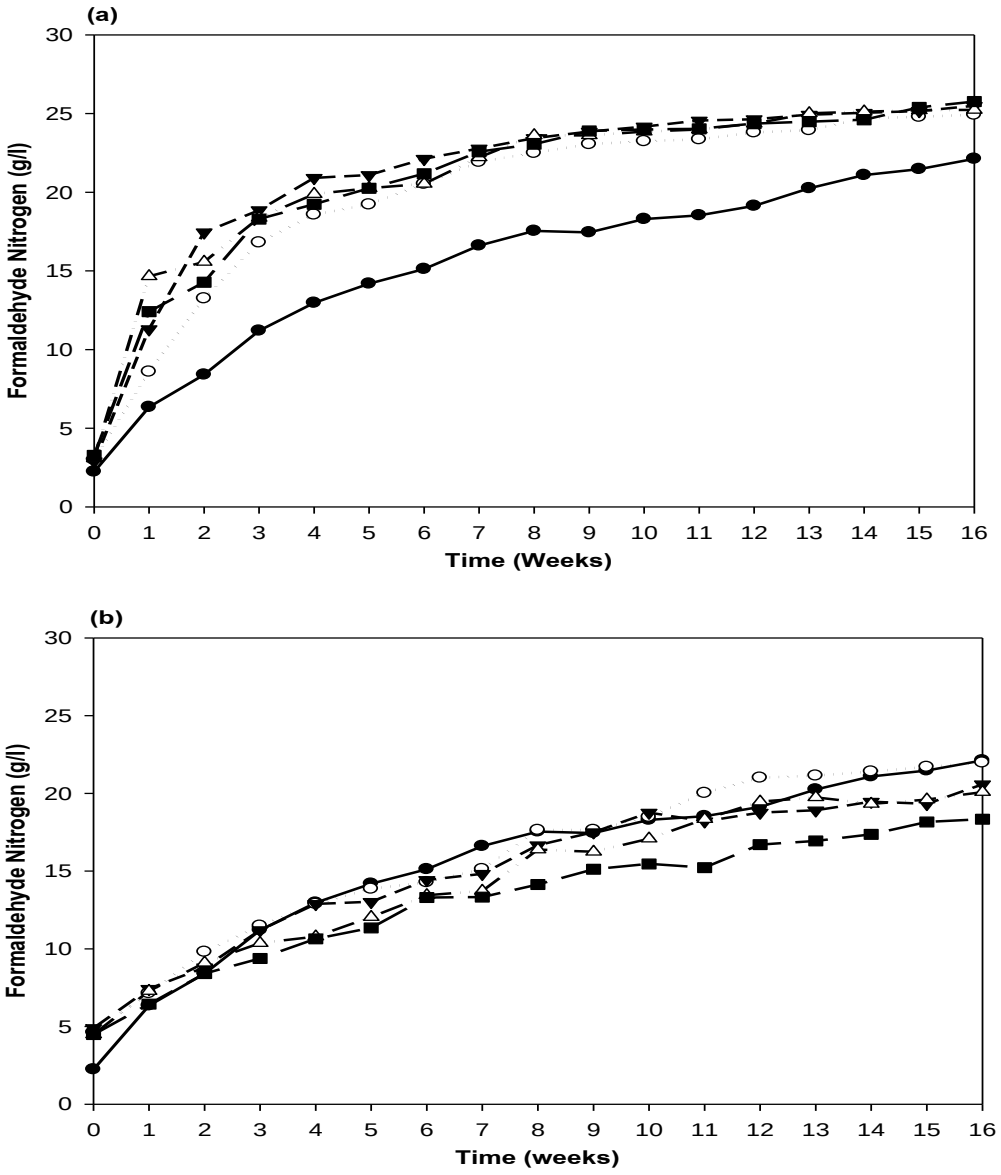
รูปที่ 17 น้ำปลาที่หมักโดยการเติมโคจิปริมาณต่างๆกัน เมื่อหมักเป็นเวลา 2 เดือน

รูปที่ 18 น้ำปลาที่หมักโดยเติมรำข้าวเจ้าปริมาณต่างๆกัน เมื่อหมักเป็นเวลา 2 เดือน

8. ศึกษาสมบัติของน้ำปลาที่หมักได้

8.1 วิเคราะห์หา Formaldehyde Nitrogen ในน้ำปลา

การวิเคราะห์ปริมาณ Formaldehyde Nitrogen เป็นวิธีที่สะดว กที่จะบอกถึงการย่อยโปรตีนในปลา จากการทดลองหมักน้ำปลาร่วมกับโคจิปริมาณต่างๆ กัน (ชุดที่ 1) คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และใส่เกลือป่น 25 เปอร์เซ็นต์ ทำการเก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์จนครบ 4 เดือน เพื่อทำการวิเคราะห์ทางเคมีของน้ำปลา ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ปริมาณ Formaldehyde Nitrogen ดังแสดงในรูปที่ 19 (a) พบว่า น้ำปลาที่หมักโดยไม่เติมโคจิ (0%) จะมีปริมาณ Formaldehyde Nitrogen ต่ำกว่าน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิ อย่างชัดเจน และพบว่าในช่วง 4 สัปดาห์แรกของการหมักน้ำปลา ปริมาณ Formaldehyde Nitrogen เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยที่ปริมาณโคจิที่เติมลงไปในอัตราส่วนต่างๆ มีผลการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลาที่ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ในชุดที่ 2 ดังแสดงในรูปที่ 1 9 (b) พบว่า น้ำปลาที่เติมรำข้าวเจ้าในอัตราส่วนต่างๆ ในชุดที่ 2 นั้น มีระดับการย่อยสลายโปรตีนในน้ำปลาที่ไม่แตกต่างกันกับน้ำปลาที่ไม่เติมโคจิ หรือ น้ำปลาที่ไม่เติมรำข้าวเจ้า แต่มีระดับการย่อยสลายโปรตีนในน้ำปลาที่ต่ำกว่าการหมักน้ำปลาโดยการเติมโคจิ (รูปที่ 1 9 a) ซึ่งเมื่อหมักน้ำปลาครบ 4 เดือน น้ำปลาที่เติมโคจิ 5 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ จะมี Formaldehyde Nitrogen อยู่ที่ประมาณ 24.92 – 25.76 g/l ส่วนน้ำปลาที่หมักโดยการเติมรำข้าวเจ้าเมื่อหมักครบ 4 เดือน จะมี Formaldehyde Nitrogen อยู่ที่ประมาณ 18.34 – 21.98 g/l

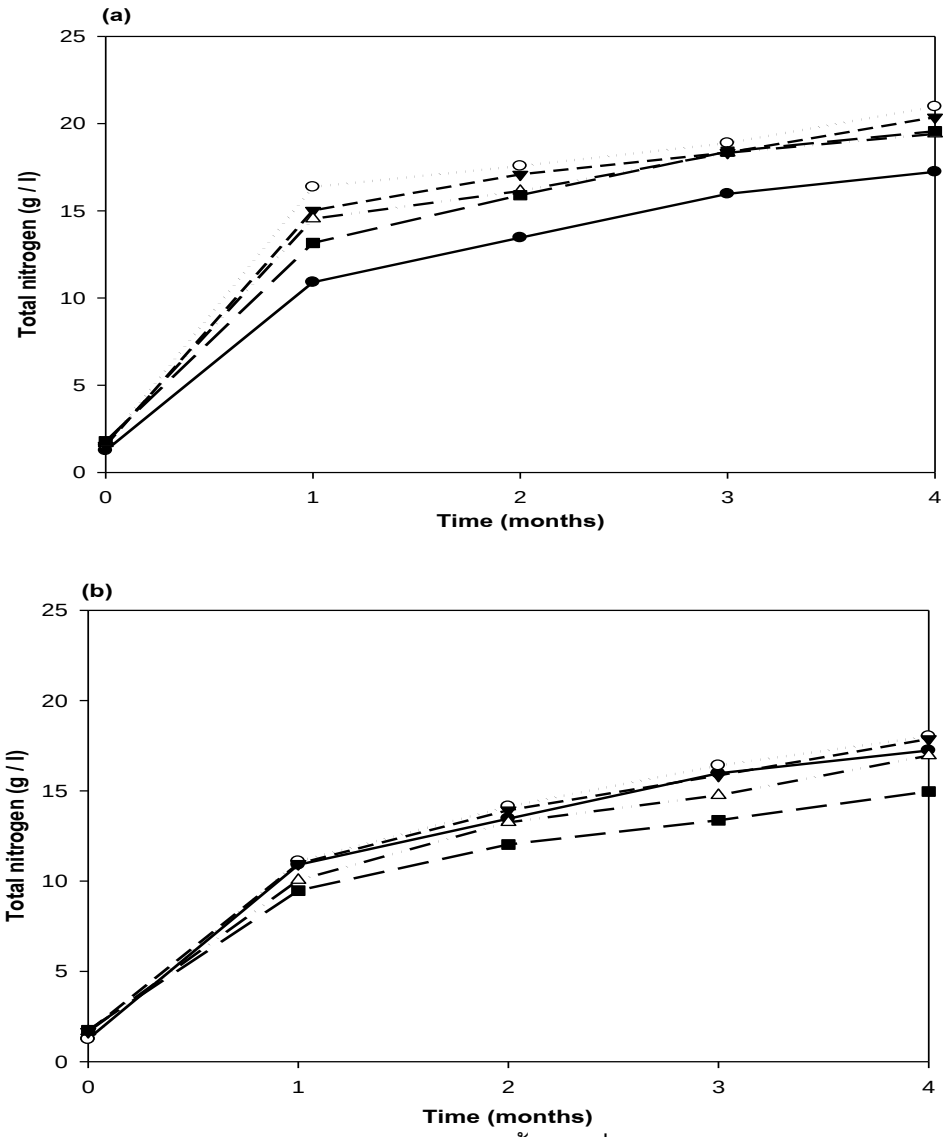


รูปที่ 19 ผลการวิเคราะห์หา Formaldehyde Nitrogen ของน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิ (a) และรำข้าวเจ้า (b) ที่ปริมาณต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 เดือน

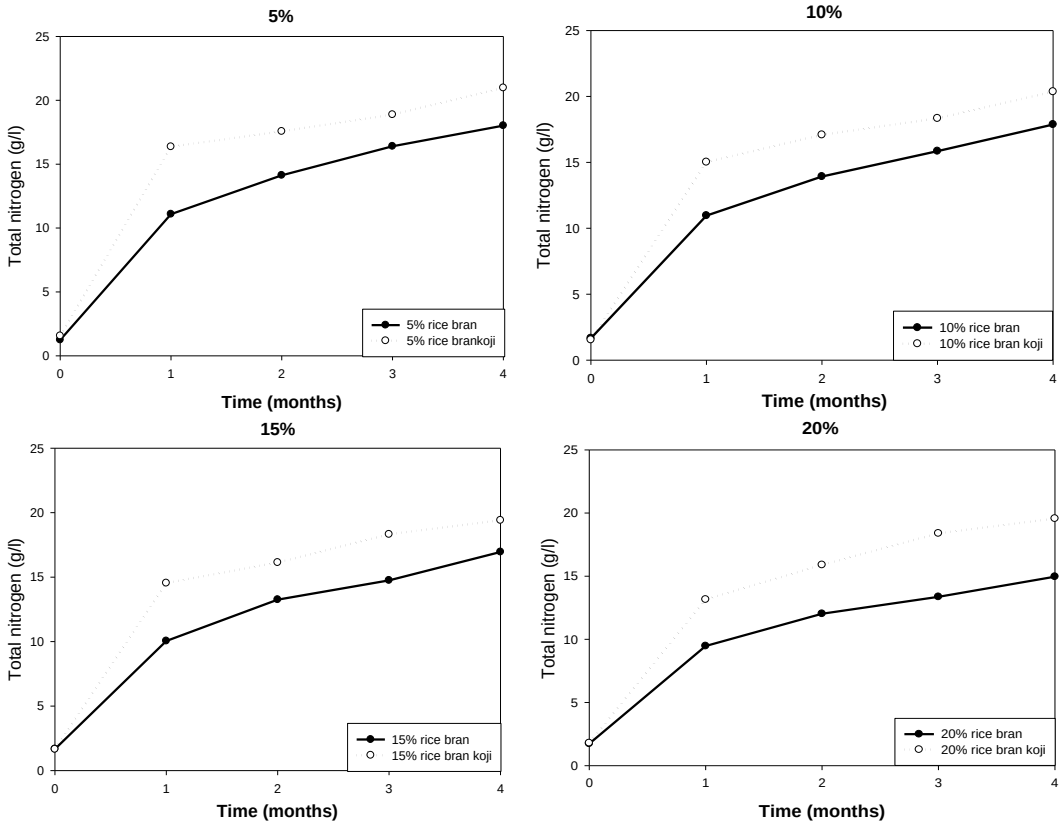
8.2 วิเคราะห์หา Total nitrogen ในน้ำปลา

การวิเคราะห์ปริมาณ Total nitrogen เป็นวิธีที่จะบอกถึงอัตราการย่อยสลายโปรตีนในน้ำปลาทั้งหมด จากการทดลองหมักน้ำปลาร่วมกับโคจิปริมาณต่างๆ กัน (ชุดที่ 1) คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และใส่เกลือป่น 25 เปอร์เซ็นต์ ทำการเก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์จนครบ 4 เดือน เพื่อทำการวิเคราะห์ทางเคมีของน้ำปลา ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ปริมาณ Total nitrogen ดังแสดงในรูปที่ 20 (a) พบว่า น้ำปลาที่หมักโดยไม่เติมโคจิ จะมีปริมาณ total nitrogen ต่ำกว่าน้ำปลาที่หมักโดยเติม โคจิ ในช่วงเริ่มต้นหมักเดือนที่ 0 น้ำปลาที่เติมโคจิและไม่เติมโคจิจะมีปริมาณ total nitrogen ที่ใกล้เคียงกันอยู่ที่ 1.258 – 1.786 กรัมต่อลิตร เมื่อหมักครบ 1 เดือน จะเห็นได้ว่าน้ำปลาที่เติมโคจิ 5% จะมีปริมาณ total nitrogen สูงที่สุด (16.368 กรัมต่อลิตร) รองลงมาคือ 10% (15.020 กรัมต่อลิตร), 15%(14.537 กรัมต่อลิตร), 20% (13.154กรัมต่อลิตร) และ 0% (10.903 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ เมื่อหมักต่อไปจนครบ 4 เดือน จะพบว่า น้ำปลาที่เติม โคจิ 5% จะมีปริมาณ total nitrogen สูงที่สุด(20.972 กรัมต่อลิตร) ซึ่งเป็นปริมาณที่ เทียบเท่ากับหัวน้ำปลาชั้น 1 ของมาตรฐานผลิตภัณฑ์น้ำปลาไทย (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2526) และน้ำปลาที่ไม่เติมโคจิ จะมีปริมาณ total nitrogen ต่ำที่สุดคือ (17.232 กรัมต่อลิตร) ส่วนการทดลองหมักน้ำปลาร่วมกับรำข้าวเจ้าปริมาณต่างๆ กัน คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และใส่เกลือป่น 25 เปอร์เซ็นต์ ทำการเก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์จนครบ 4 เดือน เพื่อทำการวิเคราะห์ทางเคมีของน้ำปลา ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ปริมาณ total nitrogen พบว่า น้ำปลาที่หมักโดยเติมรำข้าวเจ้า 5% จะมีปริมาณ total nitrogen ที่ใกล้เคียงกับน้ำปลาที่หมักโดยไม่เติมรำข้าว ดังรูปที่ 20(b) และจากการทดลองจะเห็นได้ว่าปริมาณรำข้าวที่เติมลงไปมากขึ้น จะมีผลทำให้ปริมาณ total nitrogen ที่ได้ลดลง เมื่อหมักน้ำปลาครบ 4 เดือน น้ำปลาที่เติมรำข้าวเจ้า 20% มีปริมาณ total nitrogen ที่ได้น้อยกว่าน้ำปลาที่ไม่เติมรำข้าวเจ้าเลย คือ 14.962 และ 17.232 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพราะเมื่อเติมรำข้าวเจ้าในเปอร์เซ็นต์ที่มากขึ้นจะทำให้ โอกาสที่ปลาจะได้สัมผัสกับน้ำเกลือก็จะมีน้อยลง ซึ่งตัวรำข้าวเองก็จะเป็นตัวดูดซับน้ำเกลือเอาไว้ ดังนั้นจึงทำให้กระบวนการย่อยสลายเนื้อปลาเป็นไปได้ยากขึ้น แต่เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำปลาที่เติมโคจิ (รูปที่ 20 a) เมื่อหมักครบ 4 เดือน น้ำปลาที่เติมโคจิ 20% จะมีปริมาณ total nitrogen สูงกว่าน้ำปลาที่ไม่เติมโคจิ คือ 19.563 และ 17.232 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งๆ ที่ปลาที่หมักมีโอกา สสัมผัสกับน้ำเกลือได้น้อยเช่นเดียวกัน ดังนั้นปริมาณ total nitrogen ที่เกิดขึ้นจากการหมักน้ำปลาด้วยโคจิคือ การทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 ที่สะสมอยู่ในโคจิ แต่เนื่องจากปริมาณโคจิที่มากเกินไป เมื่อเปรียบ เทียบกับน้ำปลาที่เติมโคจิ 5% ถึงแม้ว่าโคจิ 20% จะมีปริมาณเอนไซม์ที่มากกว่าเมื่อเทียบกันแล้ว แต่ปริมาณ total nitrogen ของน้ำปลาที่เติมโคจิ 5% มีสูงกว่าน้ำปลาที่เติม โคจิ 20% คือ 20.972 และ 19.563 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ก็เนื่องมาจากปริมาณของโคจิที่เติมมากเกินไปจนไปดูดซับน้ำเกลือเอาไว้ทำให้ปลาได้สัมผัสกับน้ำเกลือได้น้อย จึงทำให้

กระบวนการย่อยสลายเป็นไปได้ยากขึ้น แต่เมื่อมีปริมาณ โคจิที่น้อยลง 15, 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปริมาณ total nitrogen ก็จะเพิ่มขึ้นตามลำดับ (รูปที่ 20 a) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบปริมาณ total nitrogen ระหว่างการหมักน้ำปลาร่วมกับโคจิ และการหมักน้ำปลาร่วมกับรำข้าวเจ้า ดังรูปที่ 21 จะเห็นได้ว่า น้ำปลาที่หมักร่วมกับโคจิจะมีปริมาณ total nitrogen สูงกว่าน้ำปลาที่หมักร่วมกับรำข้าวเจ้าในทุกระดับเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกันระหว่าง ปริมาณต่อปริมาณ



รูปที่ 20 ผลการวิเคราะห์หา Total Nitrogen ของน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิ (a) และรำข้าวเจ้า (b) ที่ปริมาณต่างๆ กัน คือ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 เดือน

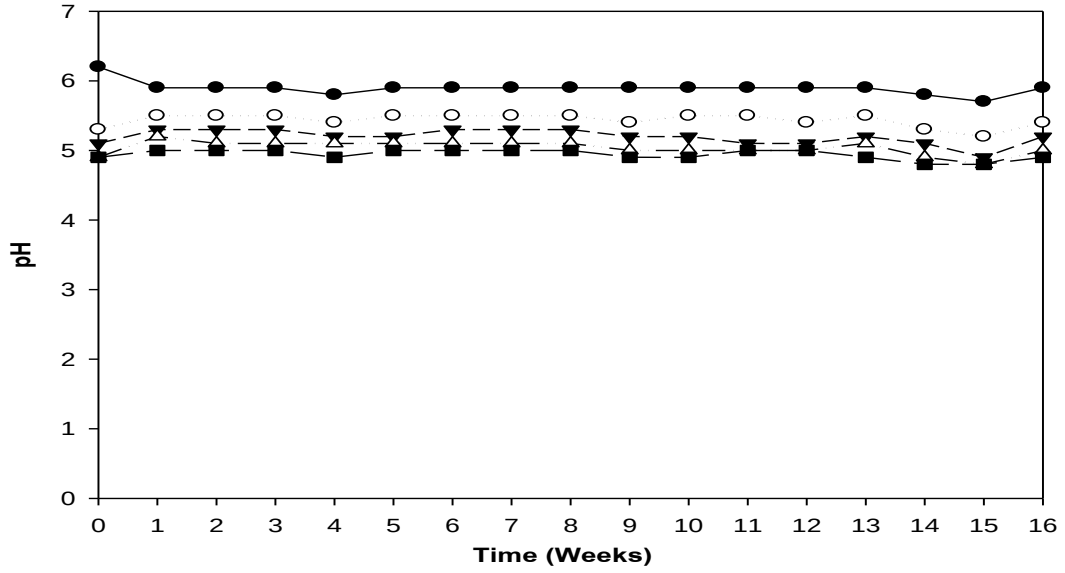


รูปที่ 21 เปรียบเทียบปริมาณ Total Nitrogen ของน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิ และ รำข้าเจ้าในปริมาณต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 เดือน

8.3 พีเอชในน้ำปลา

โดยทั่วไปการเติมและไม่เติมเอนไซม์ในรูปของโคจิในการหมักน้ำปลาที่สภาวะต่างๆ ไม่ค่อยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของพีเอชมากนัก การหมักน้ำปลาที่มีการเติมและไม่เติมเอนไซม์โปรติเอสที่หมักโดยใช้ปลากะตักตลอดระยะเวลาของการหมัก พบว่า พีเอชของน้ำปลาที่ได้มีค่าคงที่อยู่ระหว่าง 4.8 ถึง 6.2 โดยที่ค่าพีเอชของน้ำปลาที่หมักโดยการเติมโคจิจะมีค่าต่ำกว่าน้ำปลาที่หมักโดยไม่เติมโคจิ ดังรูปที่ 22

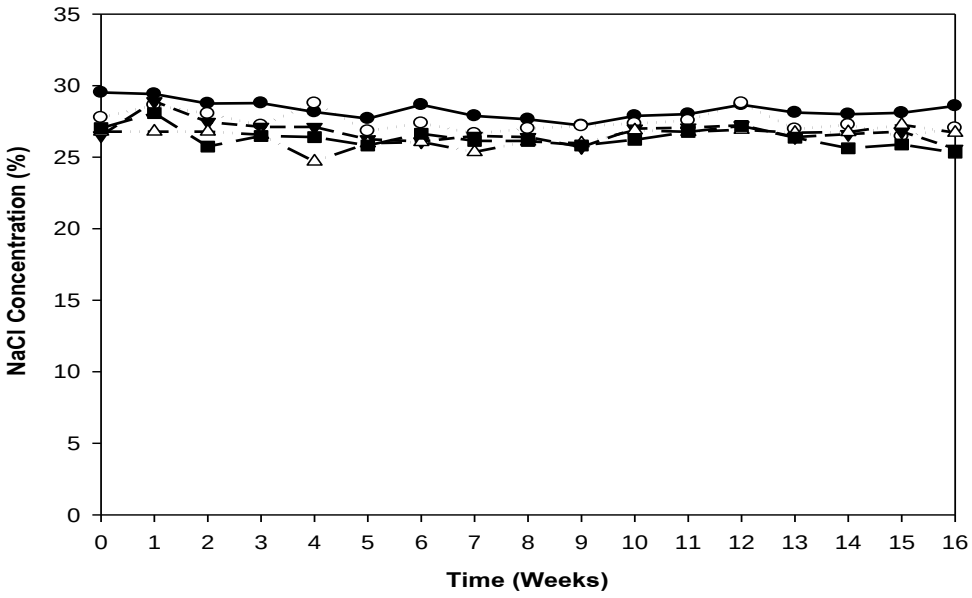
เมื่อพิจารณาพีเอชของน้ำปลาในการทดลองซึ่งใส่โคจิปริมาณต่างๆ กันและใส่เกลือป่นระดับเดียวกัน ในระยะเวลาการหมัก 4 เดือน พบว่าการทดลองที่ใส่โคจิปริมาณมากจะมีค่าเฉลี่ยของพีเอชในน้ำปลาต่ำลง โดยในการทดลองที่ใส่โคจิ 20 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าพีเอชต่ำสุด คือ 4.8 – 5.0 ส่วนในการทดลองที่ไม่ใส่โคจิมีค่าพีเอชสูงสุด คือ 5.7 – 6.2 ทั้งนี้เพราะในการหมักน้ำปลาที่ใส่โคจิมากจะมีการสะสมของกรดต่างๆ ที่ได้ในระหว่างการย่อยสลายโปรตีนสูงขึ้น และมีแนวโน้มเป็นกรดเร็วกว่าการหมักที่ไม่ใส่โคจิ ซึ่ง คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของน้ำปลาตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรมฉบับที่ 678 พ.ศ.2526 กล่าวไว้ว่าน้ำปลาแท้ชั้น 1 ต้องมีพีเอชอยู่ในช่วง 5.0 – 6.0



รูปที่ 22 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของน้ำปลาที่หมักได้ โดยการเติมโคจิ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน

8.4 วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์เกลือในน้ำปลา

จากการทดลองหมักน้ำปลาร่วมกับโคจิปริมาณต่างๆ กัน คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และใส่เกลือป่น 25 เปอร์เซ็นต์ ทำการเก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์จนครบ 4 เดือน เพื่อทำการวิเคราะห์ทางเคมีของน้ำปลา ซึ่งผลจากการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์เกลือของน้ำปลาที่หมัก พบว่า ทั้งน้ำปลาที่หมักโดย เติมโคจิและ ไม่เติมโคจิ จะมีเปอร์เซ็นต์เกลือ อยู่ระหว่าง 25.70 – 29.52 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 23 ซึ่งปริมาณเกลือในแต่ละชุดการทดลองจะมีค่าที่ไม่แตกต่างกันมากตลอดระยะเวลาของการหมัก โดยที่จากการทดลอง น้ำปลาที่ไม่เติมโคจิจะมีปริมาณเกลือสูงกว่าน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิปริมาณต่างๆ เล็กน้อย



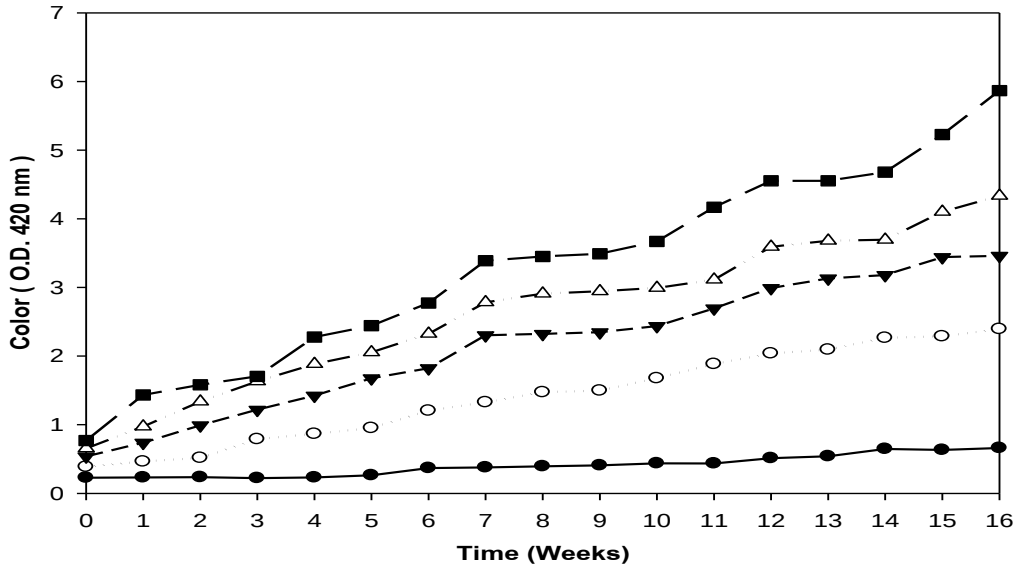
รูปที่ 23 การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์เกลือของน้ำปลาที่หมักได้ โดยการเติมโคจิ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน

8.5 สีของน้ำปลา

น้ำปลาคุณภาพดีจะมีกลิ่นหอม รสกลมกล่อม และมีสีน้ำตาลแดง เมื่อพิจารณาระดับความเข้มของสีน้ำปลาตลอดระยะเวลาการหมัก 4 เดือน ในทุกการทดลอง รวมทั้งการทดลองที่ไม่ใส่โคจิ พบว่า ระดับความเข้มของสีน้ำปลาจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาหมักเพิ่ม ระดับความเข้มสีในน้ำปลาซึ่งหมักโดยใส่โคจิปริมาณต่างกันที่เติมเกลือป่นปริมาณเท่ากัน ในระยะเวลาหมัก 4 เดือน พบว่าความเข้มสีของน้ำปลาเป็นปฏิภาคโดยตรงกับปริมาณโคจิ กล่าวคือ การหมักที่ใส่โคจิ 20 , 15, 10, 5 และ 0 เปอร์เซ็นต์ มีความเข้มสีสูงสุดถึงต่ำสุดตามลำดับ (รูปที่ 2 4) โดยมีความเข้มสีของน้ำปลาในช่วง 0.770 – 5.867, 0.654 – 4.333, 0.539 – 3.460, 0.387 – 2.394 และ 0.229 – 0.660 ตามลำดับ (รูปที่ 25) ซึ่งในกรณีของระดับความเข้มสีน้ำปลากับปริมาณโคจิที่ใส่ในการหมักน้ำปลานั้น คงเป็นผลเนื่องจากมีปริมาณของสารประกอบอะมิโนและสารประกอบคาร์บอนิลสูงขึ้นในน้ำปลาซึ่งหมักโดยใส่โคจิปริมาณมาก ซึ่งสารดังกล่าวอาจเกิดจากเอนไซม์จากโคจิเชื้อรามีผลเร่งกระบวนการย่อยสลายในการหมักน้ำปลา หรือจากองค์ประกอบของรำข้าวเจ้าซึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตโคจิก็ได้ อย่างไรก็ดี ผลของการเพิ่มปริมาณสารประกอบดังกล่าวจะส่งเสริมอัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีที่เรียกว่า Maillard reaction ดังนั้น น้ำปลาที่ได้จากการทดลองซึ่งเติมโคจิร่วมในกระบวนการหมักจึงมีระดับความเข้มสีสูงขึ้น

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระดับของโคจิที่เหมาะสมในการเร่งกระบวนการหมักน้ำปลา คือ 5 เปอร์เซ็นต์ และเกลือ 25 เปอร์เซ็นต์ หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน น้ำปลาที่กรองได้จะมีกลิ่นหอมและรสกลมกล่อม เช่นเดียวกับน้ำปลาคุณภาพชั้น 1 ซึ่งวางขายในท้องตลาด ซึ่งน้ำปลาที่หมักได้ มีลักษณะเป็นของเหลวใสสีน้ำตาลอมแดง มีค่าความเข้มสีโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เท่ากับ 2.39 พีเอชเท่ากับ 5.4 มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ 27.03 เปอร์เซ็นต์ โดยลักษณะดังกล่าวมาทั้งหมดสอดคล้องกับคุณลักษณะของน้ำปลาตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 678 (2526) ซึ่งระบุมาตรฐานของน้ำปลาว่าเป็นของเหลวใส สีน้ำตาลอมแดง มีพีเอช 5.0 ถึง 6.0 มีโซเดียมคลอไรด์ไม่น้อยกว่า 230 กรัมต่อลูกบาศเดซิเมตร เหรือเท่ากับ 23 เปอร์เซ็นต์ และสำหรับคุณภาพทางโปรตีนกำหนดว่ามีไนโตรเจนทั้งหมดและไนโตรเจนจากกรดอะมิโนไม่น้อยกว่า 20 และ 10 กรัมต่อลูกบาศก์เดซิเมตร ตามลำดับ โดยที่ให้มีอัตราส่วนของกรดกลูตามิกต่อไนโตรเจนทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.4 ถึง 0.6 เท่านั้น ซึ่งเป็นการป้องกันการใส่ผงชูรส (โมโนโซเดียมกลูตาเมต) เพื่อเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนและไนโตรเจน

รูปที่ 24 สีของน้ำปลาที่หมักจากปลากะตักที่ไม่เติมโคจิและเติมโคจิ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน



รูปที่ 25 การเปลี่ยนแปลงสีของน้ำปลาที่หมักจากปลากะตักที่ไม่เติมโคจิและเติมโคจิ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน

8.6 กรดอะมิโนอิสระ

การวิเคราะห์กรดอะมิโนอิสระในตัวอย่างน้ำปลาโดยวิธี HPLC ซึ่งตรวจสอบโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และแทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เป็นตัวแทนของกรดอะมิโนอิสระในน้ำปลา ทุกการทดลองพบว่า เมื่อหมักน้ำปลาครบ 4 เดือน ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิปริมาณต่างๆ สูงกว่าน้ำปลาที่หมักโดยไม่เติมโคจิ โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิ 15 เปอร์เซ็นต์ จะมีปริมาณโคจิสูงที่สุด รองลงมาคือ 10, 5, 20 และ 0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยมีกรดอะมิโนอิสระเป็น 8,913.96, 8,893.28, 8,530.70, 8,523.56 และ 8,283.94 มิลลิกรัม/100มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดอะมิโนดังกล่าวมีปริมาณสูงกว่าน้ำปลาชั้น 1 ที่วางขายตามท้องตลาด 6,732มิลลิกรัม/100มิลลิลิตร (ตารางที่ 11)

8.7 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

จากการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของน้ำปลาที่หมักในสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน พบว่าปริมาณ formal nitrogen และ total nitrogen ในตัวอย่างน้ำปลาที่มีการเติมเอนไซม์ในรูปของโคจิจะมีค่าที่สูงกว่าน้ำปลาที่หมักโดยไม่เติมโคจิในทุกสภาวะ ส่วนพีเอช และความเข้มข้นของเกลือในน้ำปลาไม่แตกต่างกันในแต่ละสภาวะการทดลอง แต่การเกิดสีน้ำตาลในน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิ 20 เปอร์เซ็นต์ จะมีสีเข้มที่สุด รองลงมาคือ 15, 10, 5 และ 0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อนำตัวอย่างน้ำปลาไปวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระพบว่า น้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิ 15 เปอร์เซ็นต์ จะมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือ 10, 5, 20 และ 0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

การประเมินทางประสาทสัมผัสของน้ำปลาที่หมักในสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน จากผู้ประเมินทั้งหมด 30 คน โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA post-hoc comparison of means (Duncan's multiple range test) แสดงในตารางที่ 12 พบว่า น้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิ 5 เปอร์เซ็นต์ จะมีคะแนนของรสชาติ กลิ่น สี และความชอบรวมสูงที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) รองลงมาคือ น้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิ 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับน้ำปลาที่หมักโดยไม่เติมโคจิจะมีคะแนนของรสชาติ กลิ่น สี และความชอบรวมต่ำที่สุด

จากการทดลองหมักน้ำปลาร่วมกับโคจิในปริมาณต่างๆ กันพบว่า คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำปลาที่หมักได้ มีค่าที่ใกล้เคียงกัน ทั้งปริมาณของ Formaldehyde Nitrogen Total Nitrogen ค่าพีเอช ปริมาณความเข้มข้นเกลือของน้ำปลา และปริมาณกรดอะมิโนอิสระ แต่จะมีสีที่แตกต่างกันโดยน้ำปลาที่เติม โคจิ 20 เปอร์เซ็นต์จะให้สีเข้มที่สุด รองลงมาคือ 15, 10, 5 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำปลาที่หมักโดยเติม โคจิ กับน้ำปลาที่หมักโดยไม่เติมโคจิ เมื่อหมักโดยใช้เวลาเท่ากัน ผลปรากฏว่า น้ำปลาที่หมักโดยเติม โคจิ จะมีปริมาณของ formaldehyde nitrogen total nitrogen และปริมาณกรดอะมิโนอิสระ สูงกว่าน้ำปลาที่หมักโดยไม่เติมโคจิอย่างชัดเจน

ดังนั้นจึงพอสรุปได้ว่า การใส่โคจิร่วมในการหมักน้ำปลามีผลเร่งกระบวนการหมักน้ำปลาโดยลดระยะเวลาในการย่อยสลาย การเกิดสี การเกิดกลิ่นและรสชาติของน้ำปลาไปพร้อมๆ กัน จึงมีความเป็นไปได้สูงในการใช้โคจิเพื่อลดระยะเวลาการหมักน้ำปลา โดยใช้โคจิ 5 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาในการหมักเป็นเวลา 4 เดือน

ตารางที่ 11 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในน้ำปลาที่หมักจากปลากะตักที่เติมโคจิปริมาณต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน และน้ำปลาที่หมักตามธรรมชาติ

Amino acid	Fish sauce added with Koji (%)					Fish sauce
(mg/100ml)	0	5	10	15	20	(Reference*)
Aspartic acid	727.17	917.37	1000.37	1003.02	995.82	583
Threomine	405.97	502.65	524.56	519.08	493.38	384
Serine	393.75	452.52	469.27	453.92	427.03	233
Glutamic acid	1199.01	1397.24	1389.41	1369.56	1288.10	1489
Proline	187.24	278.54	308.49	316.88	312.53	135
glycine	224.28	208.24	212.58	219.83	224.69	367
Alanine	680.90	668.18	671.00	673.55	683.69	574
Cystine	ND	ND	ND	ND	ND	17
Valine	473.22	543.40	562.80	556.76	533.00	478
Methionine	279.61	270.46	283.68	291.43	279.15	222
Isoleucine	407.15	388.67	396.98	418.28	346.05	334
Leucine	956.53	440.87	475.92	546.94	592.92	439
Tyrosine	191.90	70.73	115.50	133.63	128.46	91
Phenylalainie	280.75	343.43	420.68	474.57	491.14	323
Histidine	199.15	283.63	300.82	304.80	279.38	275
Lysine	1063.94	1130.13	1145.77	1094.55	1005.28	767
Arginine	613.37	634.64	615.45	537.16	442.94	3
Total	8283.94	8530.70	8893.28	8913.96	8523.56	6732

* Park และคณะ, 2001

ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ยของผลการประเมินทางประสาทสัมผัสของน้ำปลาแต่ละชนิด

ชนิดน้ำปลา (Type of Fish sauce)	สี (Color)	กลิ่น (Aroma)	รสชาติ (Flavor)	ความชอบรวม (Overall acceptance)
น้ำปลาที่เติมโคจิ 0 %	5.667 [b]	5.633 [c]	5.333 [b]	5.600 [b]
น้ำปลาที่เติมโคจิ 5 %	7.267 [a]	7.233 [a]	7.067 [a]	7.333 [a]
น้ำปลาที่เติมโคจิ 10 %	7.233 [a]	7.067 [ab]	6.800 [a]	7.133 [a]
น้ำปลาที่เติมโคจิ 15 %	6.867 [a]	7.033 [ab]	6.700 [a]	7.067 [a]
น้ำปลาที่เติมโคจิ 20 %	6.967 [a]	6.833 [b]	6.733 [a]	7.100 [a]

*อักษร a,b และ c หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมัน 95% ภายในคอลัมน์

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองผลิตโคจิเพื่อใช้ในการหมักน้ำปลาครั้งนี้ ได้คัดเลือกเชื้อ *Aspergillus oryzae* มาใช้ในการผลิตเอนไซม์ เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีรายงานว่าสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้สูง (Sandhya และคณะ, 2004; Chutmanop และคณะ, 2008; Wang และคณะ, 2005) ในการทดลองใช้เชื้อ *Aspergillus oryzae* จำนวน 10 สายพันธุ์ ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสทนเกลือได้ดีที่สุด จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *A. oryzae* TISTR 3083 และ *A. oryzae* MI PSU1 นำมาผลิตเอนไซม์ในรูปของโคจิ ด้วยการหมักแบบ solid-state fermentation โดยใช้วัสดุหมักที่แตกต่างกัน 5 ชนิด ซึ่งผลจากการทดลอง พบว่า เชื้อ *A. oryzae* TISTR 3083 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดเมื่อใช้ รำข้าวเจ้าเป็นวัสดุหมัก (3,267.60 U/g dry koji) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chutmanop และคณะ ในปี 2008 ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* (Ozykat-1) ด้วยวิธีการหมักแบบแห้งโดยเปรียบเทียบการใช้รำข้าวเจ้า และรำข้าวสาลีเป็นวัสดุหมัก ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่า เมื่อผลิตเอนไซม์โดยใช้รำข้าวเจ้าเป็นวัสดุหมักสามารถช่วยกระตุ้นการ ผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่าการหมักด้วยรำข้าวสาลีที่สภาวะการหมักเดียวกัน

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ โดยมีการศึกษาถึง ความชื้นเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม พีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่า เชื้อ *A. oryzae* TISTR 3083 จะสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเมื่อ เลี้ยงบนอาหารรำข้าวเจ้าที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 45 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชของอาหารเป็น 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน (รูปที่ 6, 7 และ 8) ซึ่ง Negi และ Banerjee ในปี 2006 รายงานไว้ว่า ที่ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมัก 40 – 50 เปอร์เซ็นต์ จะมีผลกระตุ้นกิจกรรมโปรติเอสและแอมิเลสของเชื้อรา *Aspergillus awamori*: Nakazawa MTCC 6652 ในส่วนของพีเอชของวัสดุหมักในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Sandhya ในปี 2004 ซึ่งกล่าวว่า พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของ อาหารรำข้าวเจ้า จากการทดลองเมื่อปรับพีเอชเป็น 7.0 จะมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* สูงสุด สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3083 คือ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเคยมีรายงานไว้ว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมทั้งต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* อยู่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Sandhya, 2004; Chutmanop, 2008) และ Chutmanop (2008) ยังกล่าวว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีผลกระตุ้นการผลิตเอนไซม์แอมิเลสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae*(Ozykat-1) ได้สูงสุดเช่นเดียวกับเอนไซม์โปรติเอส

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมโปรติเอสและแอมิเลส ในการทดลองนี้เป็นการศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสทั้งหมด (total protease) และเอนไซม์แอมิเลสทั้งหมด (total amylase) ในสภาพที่มี พีเอช อุณหภูมิ และความเข้มข้นของเกลือแกงต่างๆ ทั้งนี้โดยพิจารณาจากสภาวะการนำเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสในรูปของโคจิมาใช้ในการเร่งกระบวนการหมักน้ำปลา ซึ่งผลการย่อยสลายโปรตีนเป็นผลร่วมของกิจกรรมโปรติเอสทั้ง 3 ชนิดประกอบกัน (acid protease, neutral protease และ alkaline protease) โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นกับสภาพพีเอชในการหมัก มิได้เป็นผลจากเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งโดยสิ้นเชิง (Chaveesuk และคณะ, 1993) จากการศึกษานี้พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ระดับพีเอชต่างๆ กันอย่างชัดเจน คือ ที่พีเอช 4.0 ถึง 5.0 ช่วงนี้ตรวจวิเคราะห์กิจกรรมโปรติเอสได้เพียงเล็กน้อย ซึ่ง Fujii และคณะ (1992) รายงานว่า ที่พีเอชประมาณ 3.0 ถึง 5.0 เป็นระดับพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ acid protease ดังนั้นกิจกรรมเอนไซม์ที่วิเคราะห์ได้ในช่วงแรกจึงน่าจะเป็นผลของเอนไซม์ acid protease เป็นส่วนใหญ่ ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสช่วงพีเอช 6.0 ถึง 8.0 ซึ่งที่พีเอช 8.0 จะมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3083 สูงสุด ซึ่ง Sandhya และคณะในปี 2004 กล่าวว่า ที่พีเอช 6.0 ถึง 8.0 เป็นระดับพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ neutral protease สำหรับที่พีเอชช่วง 8.0 ถึง 10.0 คาดว่าเป็นผลจากกิจกรรมของเอนไซม์ alkaline protease เป็นส่วนใหญ่ ซึ่ง Fujii และคณะ (1992) รายงานว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ alkaline protease อยู่ที่ 9.5 และเมื่อพีเอชเพิ่มสูงขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอช 12.0 ทั้งนี้เป็นเพราะว่าความสามารถของเอนไซม์ในการจับกับสับสเตรทอาจขึ้นอยู่กับประจุของเอนไซม์หรือสับสเตรทที่พีเอชสูงหรือต่ำเกินไป มักทำให้ประจุเปลี่ยนแปลงไปจนไม่เหมาะสมที่จะทำปฏิกิริยากัน นอกจากนี้ที่พีเอชสูงหรือต่ำมากอาจมีผลทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งเสียสภาพธรรมชาติ (denature) ไปด้วย เนื่องจากมีผลโดยตรงต่อ secondary tertiary และ quaternary structure ของโปรตีนหรือเอนไซม์ ในส่วนของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ จากการศึกษาพบว่า เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3083 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์โปรติเอส และ 45 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์แอมิเลส ทั้งนี้ Negi และ Banerjee (2009) กล่าวว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและ แอมิเลสของเชื้อ *Aspergillus awamori:* Nakazawa MTCC6652 อยู่ในช่วงระหว่าง 40 – 55 และ 60 – 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่จะเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 และ 70 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลส ตามลำดับ สำหรับการศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือ(NaCl) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลส ที่ความเข้มข้นเกลือระดับต่างๆ พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้นมีผลให้กิจกรรมของเอไนซม์ลดลงตามลำดับ (รูปที่ 11) โดยในสารละลายปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นของ

เกลือแกง 30 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสลดลงจากสภาวะที่ไม่มีเกลือแกงอยู่เลยถึง 91.05 และ 80.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่ง Sinsuwan และคณะ (2008) รายงานไว้ว่า ปริมาณความเข้มข้นของเกลือแกงที่สูงขึ้น (0 – 25 เปอร์เซ็นต์) มีผลในการลดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส จากเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK33 โดยที่ปริมาณเกลือ 25 เปอร์เซ็นต์ จะลดกิจกรรมของเอนไซม์ลงจนเกือบหมด ในวันที่ 5 ของการทดลอง

การศึกษาถึงผลของพีเอช อุณหภูมิ และความเข้มข้นของเกลือต่อความคงทนของเอนไซม์เนื่องจากในกระบวนการหมักน้ำปลาหรือสภาวะการนำเอนไซม์ไปใช้งานต่างๆ ระดับพีเอช อุณหภูมิ และความเข้มข้นของเกลืออาจแตกต่างจากสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ดังนั้น จึงศึกษาความคงทนของเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่า เอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์แอมิเลสมีความคงทนที่ระดับพีเอช 6.0 – 7.0 และ 7.0 – 9.0 ตามลำดับ ซึ่ง Vishwanatha และคณะ ในปี 2009 กล่าวว่า เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ที่แตกต่างกันจะมีความคงทนต่อพีเอชในช่วงที่แตกต่างกัน (Malathi และ Chakraborty, 1991) ซึ่งเอนไซม์โปรติเอสและ แอมิเลสจากเชื้อ *Aspergillus awamori*: Nakazawa MTCC 6652 จะมีความคงทนของเอนไซม์ต่อพีเอชที่ 5 และ 4 ตามลำดับ (Negi และ Banerjee, 2009) และเชื้อ *A. oryzae* MTCC 5341 ซึ่งสร้างเอนไซม์ acid protease มีความคงทนต่อพีเอชที่ช่วง 3 – 4 ในส่วนของความคงทนต่ออุณหภูมิ พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 มีความคงทนในช่วงอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์โปรติเอส และ 30 - 55 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์แอมิเลส ในสภาพที่มีเกลือแกง 25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Vishwanatha และคณะ ในปี 2009 รายงานไว้ว่า อุณหภูมิมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์เป็นอย่างมาก ซึ่งความ เร็วในการทำงานของเอนไซม์จะแปรผันไปตามอุณหภูมิ เอนไซม์ทุกชนิดมีอัตราการทำงานสูงสุดที่อุณหภูมิหนึ่งเท่านั้น Sandhya และคณะในปี 2004 ยังกล่าวอีกว่า ความคงทนของเอนไซม์โปรติเอสขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างคือ ชนิดของเอนไซม์ เชื้อจุลินทรีย์ พีเอช รวมทั้งระดับของอุณหภูมิด้วย ในส่วนของความเข้มข้นเกลือที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส จากการศึกษาผลของเกลือแกงต่อเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK33 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความคงทนต่อเกลือแกง 25 เปอร์เซ็นต์ ได้นานถึง 36 ชั่วโมง (Sinsuwan และคณะ, 2008)

การหมักน้ำปลาร่วมกับโคจิจากเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 ทำการเก็บตัวอย่างน้ำปลาทุกๆ สัปดาห์ จนครบ 4 เดือน มาวิเคราะห์ Formaldehyde Nitrogen Total Nitrogen เปอร์เซ็นต์เกลือ(NaCl) พีเอช ความเข้มของสี เมื่อหมักครบ 4 เดือน นำตัวอย่างน้ำปลามาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน และทดสอบความพึงพอใจของผู้บริโภคที่มีต่อน้ำปลาที่หมักได้ ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ปริมาณ Formaldehyde Nitrogen ดังแสดงในรูปที่ 1 9 (a) พบว่า น้ำปลาที่หมักโดยไม่เติมโคจิ (0%) จะมีปริมาณ Formaldehyde Nitrogen ต่ำกว่าน้ำปลา

ที่หมักโดยเติมโคจิ อย่างชัดเจน และพบว่าในช่วง 4 สัปดาห์แรกของการหมักน้ำปลา ปริมาณ Formaldehyde Nitrogen เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Bovornrengroj (2005) เมื่อหมักน้ำปลาครบ 4 เดือน น้ำปลาที่เติมโคจิ 5 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ จะมี Formaldehyde Nitrogen อยู่ที่ประมาณ 24.92 – 25.76 g/l

การวิเคราะห์ปริมาณ Total nitrogen เป็นวิธีที่จะบอกถึงอัตราการย่อยสลายโปรตีนในน้ำปลาทั้งหมด ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ปริมาณ Total nitrogen ดังแสดงในรูปที่ 20 (a) เมื่อหมักน้ำปลาจนครบ 4 เดือน จะพบว่า น้ำปลาที่เติม โคจิ 5% จะมีปริมาณ total nitrogen สูงที่สุด (20.972 กรัมต่อลิตร) ซึ่งเป็นปริมาณที่ เทียบเท่ากับหัวน้ำปลาชั้น 1 ของมาตรฐานผลิตภัณฑ์น้ำปลาไทย (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม , 2526) และน้ำปลาที่ไม่เติมโคจิ จะมีปริมาณ total nitrogen ต่ำที่สุดคือ (17.232 กรัมต่อลิตร)

การวัดค่าพีเอชในน้ำปลาที่หมักได้ โดยทั่วไปการเติมและไม่เติมเอนไซม์ในรูปของโคจิในการหมักน้ำปลาที่สภาวะต่างๆ ไม่ค่อยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของพีเอชมากนัก โดยน้ำปลาที่หมักด้วยการเติมและไม่เติมโคจิพีเอชของน้ำปลาที่ได้มีค่าคงที่อยู่ระหว่าง 4.8 ถึง 6.2 ดังรูปที่ 22 ในกระบวนการหมักน้ำปลานั้นความแตกต่างของพีเอชเป็นไปได้ว่าอาจมาจากไฮโดรเจนไอออนอิสระ, กรดอะมิโน และกรดอะมิโนของ oligopeptides นอกจากนี้ในกระบวนการหมักน้ำปลายังมีกรดไขมันระเหยได้ เช่น กรดอะซิติก และกรดแลคติก ซึ่งทำให้พีเอชในน้ำปลามีแนวโน้มลดลง (Funatsu และคณะ, 2000) ซึ่งกลิ่นของน้ำปลาส่วนใหญ่จะเกิดจากกรดไขมันที่ระเหยได้ในน้ำปลา

การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์เกลือใน น้ำปลาที่หมัก พบว่า ทั้งน้ำปลาที่หมักโดย เติมโคจิและไม่เติมโคจิ จะมีเปอร์เซ็นต์เกลือ อยู่ระหว่าง 25.70 – 29.52 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 23 ซึ่งปริมาณเกลือในแต่ละชุดการทดลองจะมีค่าที่ไม่แตกต่างกันมากตลอดระยะเวลาของการหมัก จากรายงานของ Dissaraphong and Benjakul (2006) รายงานว่า ปริมาณเกลือจะเพิ่มขึ้นในระยะแรกของการหมัก (0.25 – 2 เดือน) และค่าค่อนข้างคงที่ที่ 28 – 30 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปจนถึง 12 เดือนของการหมัก และ Bovornreungroj (2005) ยังรายงานว่าเปอร์เซ็นต์เกลือในน้ำปลาแบบไม่เติมและเติมเอนไซม์มีค่าสูงในสัปดาห์แรกของการหมัก ค่าคงที่ประมาณ 28.06 – 30.39 เปอร์เซ็นต์ และค่าจะไม่แตกต่างกันมากนัก เกลือที่พบในน้ำปลาส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) มีประมาณ 27 – 31 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของเกลือจะช่วยป้องกันและรักษาคุณภาพของน้ำปลาไม่ให้เกิดการเน่าเสีย เมื่อมีการทิ้งไว้เป็นระยะเวลานานๆ โดยที่จากการทดลอง น้ำปลาที่ไม่เติมโคจิจะมีปริมาณเกลือสูงกว่าน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิ ปริมาณต่างๆ เล็กน้อย

ระดับความเข้มของสีน้ำปลาตลอดระยะเวลาการหมัก 4 เดือน ในทุกการทดลอง พบว่าระดับความเข้มของสีน้ำปลาจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาหมักเพิ่ม โดย สีน้ำตาลของน้ำปลาเกิดจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างสารประกอบที่มี

อนุมูลอะมิโน (- NH_2) กับสารประกอบที่มีอนุมูลคาร์บอนิล (-C=O) (ประเสริฐ , 2537) การเกิดปฏิกิริยามี 3 ขั้นตอน คือ ระยะแรกจะเกิดสารประกอบไกลโคซิลเอมีน (glycosylamine) จากนั้นสารชนิดนี้จะจัดตัวกันใหม่เกิดเป็นสารประกอบ 1-amino-1-deoxy-2-ketose (Amadori compound) ซึ่งภายหลังจะเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบที่มีสีน้ำตาล (melanoidin) (Ijong และ Ohta, 1995) สีของน้ำปลาที่ได้จะอยู่ระหว่างสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาลเข้ม ความเข้มของสีน้ำปลาจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับอุณหภูมิและปริมาณออกซิเจนที่เพิ่มขึ้น รวมทั้งชนิดของเกลือ เช่น K_2HPO_4 ส่งเสริมให้เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด ส่วน Ca^{2+}, Fe^{2+} และMg^{2+} ในปริมาณ 0.1-1.0 ppm จะกระตุ้นการเกิดสีน้ำตาลได้

การวิเคราะห์กรดอะมิโนอิสระในตัวอย่างน้ำปลา เมื่อหมักน้ำปลาครบ 4 เดือน ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิปริมาณต่างๆ สูงกว่าน้ำปลาที่หมักโดยไม่เติมโคจิ โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิ 15 เปอร์เซ็นต์ จะมีปริมาณโคจิสูงที่สุด รองลงมาคือ 10, 5, 20 และ 0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยมีกรดอะมิโนอิสระเป็น 8,913.96 8,893.28 8,530.70 8,523.56 และ 8,283.94 มิลลิกรัม/100มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดอะมิโนดังกล่าวมีปริมาณสูงกว่าน้ำปลาชั้น 1 ที่วางขายตามท้องตลาด 6,732 มิลลิกรัม/100มิลลิลิตร (ตารางที่ 11) ทั้งนี้ Park และคณะ ในปี 2001 กล่าวว่า ในระยะแรกของการหมักน้ำปลาตามธรรมชาติระหว่าง 1 – 8 วันแรกของการหมัก จะมีกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แสดงให้เห็นว่า กระบวนการย่อยสลายโปรตีนเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรกของการหมักน้ำปลา เมื่อหมักต่อไปจนครบ 3 เดือน พบว่า จะมีกรดอะมิโนจำนวนมากสุด คือ 20 – 22 ชนิด แต่หลังจากนั้นจำนวนกรดอะมิโนอิสระที่พบในระหว่างการหมักเริ่มลดลง จนกระทั้งเมื่อหมักครบ 1 ปีแล้ว เหลือกรดอะมิโนเพียง 13 ชนิดเท่านั้น เนื่องจากกรดอะมิโนบางส่วนจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการทางเคมีที่เรียกว่า Maillard's reaction ซึ่งเป็นปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างสารประกอบที่มีอนุมูลอะมิโน (- NH_2) กับสารประกอบที่มีอนุมูลคาร์บอนิล (-C=O) (ประเสริฐ , 2537) การเกิดปฏิกิริยามี 3 ขั้นตอน คือ ระยะแรกจะเกิดสารประกอบไกลโคซิลเอมีน (glycosylamine) จากนั้นสารชนิดนี้จะจัดตัวกันใหม่เกิดเป็นสารประกอบ 1-amino-1-deoxy-2-ketose (Amadori compound) ซึ่งภายหลังจะเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบที่มีสีน้ำตาล (melanoidin) (Ijong และ Ohta, 1995) จากสาเหตุดังกล่าวจึงเป็นผลให้กรดอะมิโนอิสระลดลงหลังจากการหมักเนื่องจากถูกเปลี่ยนสภาพไป ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Miyazawa และคณะ ในปี 1979 ซึ่งได้ทดลองหมักน้ำปลาโดยเติมโคจิ 35 % และใช้เกลือ 20 % พบว่า การเติมโคจิในการหมักน้ำปลามีผลให้เกิดการย่อยสลายโปรตีน และสร้างกรดอะมิโนอิสระได้สูงกว่าการหมัก แบบดั้งเดิม เมื่อบ่มที่ 30 °C แต่ในการทดลองที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 50 °C ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่เป็นเบส เช่น lysine, histidine และ arginine ลดลงอย่างเห็นได้ชัด และน้ำปลาที่ได้มีสีน้ำตาลดำ ทั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่เป็นเบสซึ่งลดลงนี้อาจถูกใช้ในการเกิด Maillard's reaction กับ

คาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่ในโคจิ สำหรับกลิ่นรสของน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจินี้ แตกต่างจากน้ำปลาที่หมักตามธรรมชาติอย่างชัดเจน โดยมีกลิ่นรสคล้ายกับซีอิ๊วมากกว่า

การประเมินทางประสาทสัมผัสของน้ำปลาที่หมักในสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน จากผู้ประเมินทั้งหมด 30 คน โดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA post-hoc comparison of means (Duncan's multiple range test) แสดงในตารางที่ 12 พบว่า น้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิ 5 เปอร์เซ็นต์ จะมีคะแนนของรสชาติ กลิ่น สี และความชอบรวมสูงที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) รองลงมาคือ น้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิ 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับน้ำปลาที่หมักโดยไม่เติมโคจิจะมีคะแนนของรสชาติ กลิ่น สี และความชอบรวมต่ำที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากน้ำปลาที่หมักโดยไม่เติมโคจิกระบวนการหมักยังเกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ เพราะการหมักน้ำปลาแบบดั้งเดิมต้องใช้ระยะเวลาในการหมักนาน 8-12 เดือน (Lopetcharat และ Park, 2002) แต่น้ำปลาที่หมักโดยการเติมโคจิจะช่วยให้การหมักน้ำปลาเกิดได้เร็วขึ้น โดยใช้เวลาในการหมักเพียง 4 เดือน และยังช่วยส่งเสริมให้น้ำปลามีกลิ่นและรสชาติที่ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักน้ำปลาโดยไม่เติมโคจิ ซึ่งน้ำปลาที่หมักโดยการเติมโคจิจะมีองค์ประกอบทางเคมีของน้ำปลาที่สำคัญๆ สูงกว่าน้ำปลาที่ไม่เติมโคจิ เช่น สารประกอบอินทรีย์ ปริมาณไนโตรเจน กรดอินทรีย์ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งคือ มีชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่สูงกว่า (Uchida, 2005)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ปัจจุบันการหมักน้ำปลาต้องใช้เวลานาน 8 – 12 เดือน จึงเป็นปัญหาสำคัญของอุตสาหกรรมการผลิตน้ำปลา ทำให้ไม่สามารถเพิ่มผลผลิตได้ตามต้องการ วิธีการหนึ่งที่จะลดระยะเวลาการหมักให้สั้นลง ก็คือ การใช้โคจิที่มีเอนไซม์โปรติเอสสูงเพื่อใช้เร่งกระบวนการย่อยสลายโปรตีน แต่การผลิตโคจินั้นจำเป็นต้องใช้เชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และต้องศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ ตลอดจนสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์นี้ จึงจะสามารถผลิต โคจิที่มีกิจกรรมโปรติเอสสูง ซึ่งจะส่งผลให้การหมักน้ำปลาโดยใช้โคจิช่วยเร่งกระบวนการหมักได้ผลดี

การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการ ผลิตเอนไซม์โปรติเอส ตลอดจนเอนไซม์แอมิเลสที่ทนเกลือได้สูง จากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* จำนวน 10 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากโคจิซีอิ๊วของโรงงานซีอิ๊วในจังหวัดสงขลาจำนวน 2 สายพันธุ์ เชื้อจากภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จำนวน 3 สายพันธุ์ และเชื้อจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จำนวน 5 สายพันธุ์ พบว่ามีเชื้อรา 2 สายพันธุ์ ที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสทนเกลือได้สูง คือ *A. oryzae* MI PSU1 และ *A. oryzae* TISTR 3083 เมื่อนำเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มาเลี้ยงบนอาหารรำข้าวเจ้า ข้าวเจ้า ข้าว - สาลี ถั่วเหลือง และกากถั่วเหลือง ด้วยการหมักแบบโคจิ พบว่า เชื้อรา *A. oryzae* สายพันธุ์ TISTR 3083 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส ได้สูงกว่า สายพันธุ์ MI PSU1 บนอาหารรำข้าวเจ้า (3,267.60 U/g dry koji และ 1,810.40 U/g dry koji ตามลำดับ) แต่เชื้อราสายพันธุ์ MI PSU1 สามารถผลิตเอนไซม์แอมิเลสได้สูงกว่าสายพันธุ์ TISTR 3083 บนอาหารรำข้าวเจ้าเช่นเดียวกัน (247.96 U/g dry koji และ 226.38 U/g dry koji ตามลำดับ) ส่วนอาหารที่ไม่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ในรูปของโคจิที่นำมาศึกษาคือ ข้าวสาลี ซึ่งสามารถ ผลิตเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสจากเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ต่ำที่สุด ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้นี้ สามารถคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ *A. oryzae* TISTR 3083 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุด ถึงแม้ว่าเชื้อสายพันธุ์นี้จะมีความสามารถในการ ผลิตเอนไซม์แอมิเลสได้ต่ำกว่าสายพันธุ์ MI PSU1 แต่เอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักน้ำปลาคือเอนไซม์โปรติเอส ดังนั้นจึงเลือกเชื้อราสายพันธุ์ดังกล่าวไว้ศึกษาต่อไป และสับสเตรทที่ดีที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์คือ รำข้าวเจ้า

สภาวะที่เหมาะสมในการ ผลิตเอนไซม์โปรติเอส และแอมิเลสของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 เมื่อเลี้ยงบนอาหารรำข้าวเจ้าที่มีความชื้นเริ่มต้น 45 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 7.0

ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 วัน สำหรับเอนไซม์โปรติเอส และ 5 วัน สำหรับเอนไซม์แอมิเลส พบว่าเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 ผลิตเอนไซม์โปรติเอส และ แอมิเลสได้ 4,375.60 U/g dry koji และ 141.56 U/g dry koji ตามลำดับ

เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและแอมิเลสจากเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3083 พบว่าเชื้อมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมโปรติเอสและแอมิเลส เป็น 8.0 โดยมีสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมโปรติเอสและแอมิเลสทั้งหมด คือ พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์โปรติเอส และ 45 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์แอมิเลส และสภาวะที่มีเกลือแกงความเข้มข้นสูงขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงตามลำดับ เอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์แอมิเลสมีความคงทนที่ระดับพีเอช 6.0 – 7.0 และ 7.0 – 9.0 ตามลำดับ และมีความคงทนในช่วงอุณหภูมิ 30 องศา -เซลเซียส สำหรับเอนไซม์โปรติเอส และ 30 - 55 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์แอมิเลส ในสภาพที่มีเกลือแกง 25 เปอร์เซ็นต์

ในการเตรียมเอนไซม์ในรูปของโคจิเพื่อใช้ในการทดลองหมักน้ำปลา ด้วยเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 โดยใส่ปอร์ของเชื้อราลงในอาหารรำข้าวเจ้าที่มีความชื้นเริ่มต้น 45 เปอร์เซ็นต์ และมีพีเอชเริ่มต้น 7.0 ในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 600 ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้โคจิที่มีผลผลิตโปรติเอส 4 ,208 U/g dry koji ในเวลา 4 วัน ซึ่งผลการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวอยู่ในระดับพอที่จะนำไปใช้ในการหมักน้ำปลาต่อไป

การหมักน้ำปลาโดยใช้โคจิเร่งกระบวนการหมัก ใช้โคจิของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 ปริมาณต่างๆ คือ 20 , 15, 10, 5 และ 0 เปอร์เซ็นต์ และใส่เกลือป่น 25 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน พบว่า ในการทดลองที่หมักโดยเติมโคจิ 5 เปอร์เซ็นต์ ได้น้ำปลาที่มีคุณภาพดีในเวลาหมักเพียง 4 เดือน โดยน้ำปลาที่หมักได้มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระสูงถึง 8,530.70 มิลลิกรัม/100มิลลิลิตร พีเอช 5.4 มีสีน้ำตาลอมแดง ความเข้มสีโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เท่ากับ 2.39 มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 27.03 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสมบัติที่ได้มาตรฐานของน้ำปลา โดยเฉพาะปริมาณกรดอะมิโนอิสระของน้ำปลาที่ได้จากการหมักนี้มีปริมาณมากกว่าน้ำปลาที่หมักโดยไม่เติมโคจิ รวมทั้งมากกว่าน้ำปลาคุณภาพชั้น 1 ที่วางขายในท้องตลาดของประเทศไทย จากการทดลองชิมและดมกลิ่นพอจะบอกได้ว่า น้ำปลาที่หมักด้วยการเติมโคจิ 5 เปอร์เซ็นต์ ได้รับการยอมรับทั้งทางด้าน กลิ่น สี รสชาติ และความชอบโดยรวมมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) รองลงมาคือน้ำปลาที่เติมโคจิ 10 เปอร์เซ็นต์

จึงสรุปได้ว่า การใส่โคจิร่วมในการหมักน้ำปลามีผลเร่งกระบวนการหมักน้ำปลาโดยลดระยะเวลาในการย่อยสลาย การเกิดสี การเกิดกลิ่นและรสชาติของน้ำปลาไปพร้อมๆ กัน ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงในการใช้โคจิเพื่อลดระยะเวลาการหมักน้ำปลา โดยถ้าใช้โคจิ 5 เปอร์เซ็นต์ จะใช้เวลาในการหมัก 4 เดือน

เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์. 2515. การศึกษาคุณภาพน้ำปลาพื้นเมือง. รายงานกิจกรรมกรมวิทยาศาสตร์. 31: 55-56.

กรมศุลกากร. 2540. *ข้อมูลสถิติการค้าระหว่างประเทศของประเทศไทย*. กระทรวงการคลัง. 758น.

กฤษดา สมิตะสิริ. 2529. แบคทีเรียชอบเกลือในการหมักน้ำปลา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

กองโภชนาการ. 2526. ตารางแสดงชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในอาหารไทย. กรมอานามัย, กระทรวงสาธารณสุข, กรุงเทพฯ. 15 น.

นงนุช รักสกุลไทย. 2538. กรรมวิธีแปรรูปสัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. หน้า 135.

บุญศรี จงเสรีจิตต์. 2533. การผลิตโคจิเพื่อใช้ในการหมักน้ำปลา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข(ฉบับที่ 203). 2543. น้ำปลา. ราชกิจจานุเบกษาฉบับประกาศทั่วไป. หน้า 118.

ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 678. 2526. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำปลาพื้นเมือง.

ประเสริฐ สายสิทธ์. 2537. น้ำปลา. ใน กรรมวิธีอุตสาหกรรมประมง. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 112-124.

ปรียานุช บวรเรืองโรจน์. 2548. การคัดเลือกแบคทีเรียชอบเกลือสูง ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสชอบเกลือ เพื่อใช้ในการหมักน้ำปลา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักข่าวไทย, 29.07.2548. http//:www.msnth.com/msn/new/economicchighlights/articll.asp.

อรพิน ภูมิภมร. 2526. น้ำปลาและผลิตภัณฑ์ปลาหมัก. ใน จุลินทรีย์ในเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์และอาหารหมักพื้นเมือง. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 71-84.

Anson, M.L. 1983. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol. 22: 79-89.

Barzana, E. and Garcia-Garibay, M. 1994. Production of fish Protein Concentrates *In* Fisheries Processing Biotechnological Applications. (A.M. Martin, ed.). 206-222.

Beddows, C.G. and A.G. Ardeshir. 1979. The production of soluble fish protein solution for use in fish sauce manufacture. The use of added enzymes. J. Food Technol. 14: 603-612.

Beddows, C.G., Ardeshir, A.G. and Daud, W.J. 1980. Development and origin of the volatile fatty acids in Budu. J. Food Technol. 31: 86-92.

Beddows, C.G., M. Ismail and K.H. Steinkraus. 1976. The use of bromelain in the hydrolysis of mackerel and the investigation of fermented fish aroma. J. Food Technol. 1 : 379-388.

Bovornreungroj, P. 2005. Selection of extremely halophilic Bacteria Producing Halophilic Proteolytic Enzyme for Fish Sauce Production, pp. 72-80. In Proceedings of 41th Kasetsart University Annual Conference. Bangkok, Thailand.

Brillants, S., Paknoi, S., Totakien, A., 2002. Histamine formation in fish sauce production. J. Food Sci. 67, 2090-2094.

Cannel, E. and M. Moo-Young. 1980. Solid state fermentation. Proc. Biochem. 15: 2-7.

Chaiyanan, S., Sarayanit, S., Chamaoot, M. and Kesornmala, C. 1988. Fish Sauce Fermentation by Using Microbial Inoculation and Recycling System. *In* Food Science and Technology in Industrial Development Vol. I. Proceedings of the food conference, 88 Bangkok, Thailand, 24-26 October 1988. 320-325.

Chaveesuk, R., Smith, P. and Simpson, K. 1993. Production of fish sauce products and manufacturing: a review. Food Reviews International. 17: 65-68.

Chutmanop, J., Chuichulcherm, S., Chisti, Y. and Srinophakun, P. 2008. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. J. Chem Technol Biotechnol. 83:1012–1018.

Dissaraphong, S., Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2006. The influence of storage conditions of tuna viscera before fermentation in the chemical, physical and microbiological changes in fish sauce during fermentation. Bioresource Technology. 97: 2032–2040.

Dougan, J. and G.E. Howard. 1975. Some flavoring constituents of fermented fish sauce. J. Sci. Food Agric. 26: 887-894.

Fujii, T., Nikkuni, S. and Iida, H. 1992. Chemical composition and putrescible potential of commercial “Shottsuru”, Japanese fish sauce, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 39: 95-100.

Fuke, S. 1994. Taste-Active Components of Seafoods with Special Reference to Umami Substances. *In* Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality. (F. Shahidi and J. R. Botta, eds.). 115-139.

Funatsu, Y., Sunago, R., Konagaya, S., Imai, T., Kawasaki, K. and Takeshima, F. 2000. A comparison of extractive components of a fish sauce prepared from frigate mackerel using soy sauce koji with those of Japanese-made fish sauce and soy sauce. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 66: 1036-1045.

Fuwan, P. 1938. Enzyme of starch degradation and synthesis. Adv. In Enzymol. 12: 380-424.

Gildberg, A. and Thongthai, C. 2001. The effect of reduced salt content and addication of halophilic lactic bacteria on quality and composition of fish sauce made from sprat. J. Aquat. Food Product Technol. 10: 77-88.

Gildberg, A. 1982. Autolysis of fish tissue-general aspects. Ph.D. thesis, University of Troms, Troms, Norway.

Greig, R.W. and Estrella, D.C. 1988. A study of the Acceleration of Fish sauce Production Using Enzyme. In Food Science and Technology in Industrial Development Vol. I. Proceeding of the food conference, 88 Bangkok, Thailand.

Ijong, F.G. and Ohta, Y. 1995. Microflora and chemical assessment of an Indonesian traditional fermented fish sauce “Bakasang”. J. Fac. Appl. Biol. Sci. Hiroshima Univ. 34: 95-100.

Indoh, K., Nagata, S., Kanzaki, K., Shiiba, K. and Nishimura, T. 2006. Comparison of Characteristics of Fermented Salmon Fish Sauce Using Wheat Gluten *Koji* with those Using Soy Sauce *Koji*. Food Sci. Technol. Res., 12(3): 206-212.

Kumalaningsib, S. 1986. Study of Proteolytic Enzyme by Bacteria Isolated During Lemura Fish Fermentation, 1st Asean Work Shorp on Fish and Fish wast, Japan. pp. 136-149.

Kunimoto, M., Terao, K. and Kaneniwa, M. 1992. Consumption of trimethylamine and trimethylamine N-oxide by *Aspergillus oryzae*. Nippon Suisan Gakkaishi. 58: 1471-1476.

Lee, E.H., Lee, T.H., Kim, J.S. and Ahn, C.B. 1989. Processing and taste compound of fish sauce from skipjack scrap. *Bull. Korean Fish*. Soc. 22: 25-35.

Lopetcharat, K., Choi, Y.J., Park, J.W. and Daeschel, M.A. 2001. Fish sauce products and manufacturing: a review. Food Reviews International. 17: 65-68.

Lopetcharat, K. and J.W. Park. 2002. Characteristics of fish sauce made from Pacific whiting and surimi byproducts during fermentation stage. J. Food Sci. 67(2): 511-516.

Malathi, S., Chakraborty, R. 1991. Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-state fermentation conditions for use as a depilation agent. Appl Environ Microbiol. 57: 712–6.

Miyazawa, K., Van Le Chuong. K., Ito and F. Matsumoto. 1979. Studies on fish sauce. J. Fac. Appl. Biol. Sci., Hiroshima Univ. 18: 55-63.

Negi, S. and Banerjee, R. 2006. Optimization of amylase and protease production from *Aspergillus awamori* in single bioreactor through EVOP factorial design technique. Food Technol. Biotechnol. 44(2): 257–261.

Negi, S. and Banerjee, R. 2009. Characterization of Amylase and Protease Produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. Food Research International. doi: 10.1016.

Park, J.M., Fukumoto, Y., Fujita, E., Tanaka, T., Washio, T., Otsuka, S., Shimizu, T., Watanabe, K. and Abe H. 2001. Chemical Composition of Fish Sauces Produced in Southeast and East Asian Countries. J. Food Technol. 14: 113-125.

Raksakulthai, N. 1986. Role of Protein Degradation in Fermentation of Fish Sauce. Ph.D. Philosophy, Memorial University of Newfoundland. Canada.

Saisithi, P. 1967. Studies on the origins and development of the typical flavor and aroma of Thai fish sauce. Ph.D. thesis, University of Washington, Washington, D.C.

Saisithi, P., B. Kasemsarn, J. Liston and A.M. Doller. 1966. Microbiology and chemistry of fermented fish. J. Food Sci. 31: 105-110.

Saisithi, P. 1994. Traditional fermented fish: fish sauce production. pp. 111-131. *In.* A.M. Martin, (ed.). Fisheries processing: Biotechnology Application Chapman and Hall, London.

Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G. and Pandey, A. 2004. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Process Biochemistry. 40: 2689–2694.

Sikorski, Z.E., A. Gildberg and A. Ruiter. 1995. Fish products pp. 315-346. *In* A. Ruiter, (ed.). Fish and Fishery Products: Composition, Nutritive Properties and Srability. CAB International. Wallingford, UK.

Sinsuwan, S., Rodtong, S. and Yongsawatdigul, J. 2008. Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. Process Biochemistry. 43: 185–192

Suba Rao, G.N. 1961. Fisheries Products Manual. Fao Regional Office for Asia and the Far East, Bangkok.

Thongthai, C. and H. Okada. 1980. Change of nitrogenous compounds during Numpla fermentation. pp. 101-107. *In* Microbial Utilization of Renewable Resources. Vol. 1. JSPS-NRST Seminar on Agro-Industry Including Microbial Technology, Osaka, Japan.

Uchida, M., Ou, J., Chen, B.W., Yuan, C.H., Zhang, X.H., Chen, S.S., Funatsu, Y., Kawasaki, K.I., Satomi, M. and Fukuda, Y. 2005. Effects of soy sauce *koji* and lactic acid bacteria on the fermentation of fish sauce from freahwater silver carp *Hypophthalmichthys molitrix.* Fisheries Science. 71: 422-430.

Vishwanatha, K.S., Appu Rao, A.G. and Singh, S.A. 2009. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. J. Food Chem. 114: 402–407.

Voskresensky, N.A. 1967. “Salting of Herring”, In Fish as Food, Vol. 3, Edited by Borgstrom, G., New York, Academic Press. 107-131.

Wang, R., Law, R.C.S. and Webb, C. 2005. Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. *Process Biochem.* 40:217–227.

Yamamoto, K. 1957. Koji : Effects of cultural temperature on the production of mold protease. Bull. Agr. Chem. Soc. Jap. 21(5): 319-324.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. PDA (Potato Dextrose Agar)

Potato starch	4.0 กรัม
Dextrose	20.0 กรัม
Distilled water	1,000.0 มิลลิลิตร
- Agar	15.0 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปตั้งไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121^{0}C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Casein (sodium caseinate) agar

- sodium caseinate	2%
- K_2HPO_4	0.2 กรัม
- $MgSO_4$	0.2 กรัม
- $FeSO_4$	trace
- Agar	15.0 กรัม
- น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปตั้งไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121^{0}C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Czapek solution agar

- Starch	30.0 กรัม
- $NaNO_3$	2.0 กรัม
- K_2HPO_4	1.0 กรัม
- $MgSO_4$	0.5 กรัม
- KCl	0.5 กรัม
- $FeSO_4$	0.01 กรัม
- Agar	15.0 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และนำไปตั้งไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121^{0}C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Iodine solution (Hesseltine และคณะ 1963)

Iodine	0.66	กรัม
Potassium iodine	6.6	กรัม
Distilled water	165.0	มิลลิลิตร

ใช้น้ำละลายไอโอดีน และ potassium iodine จนหมดจึงเติมน้ำที่เหลือลงไป

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารและวิธีการวิเคราะห์

1. การหากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (ดัดแปลงจากวิธีของ Anson, 1938)

1.1 การเตรียมสารเคมี

1.1.1 สารละลายเคซีนเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลายเคซีน 1.5 กรัมใน 0.1 N NaOH 20 มิลลิลิตร ต้มและคนจนละลายแล้วปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ด้วย 0.1 N HCl จากนั้นปรับปริมาตรของสารละลายเป็น 100 มิลลิลิตร โดยเติม 0.05 M phosphate buffer พีเอช 7.0 ส่วนในกรณีที่หากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่พีเอช 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ให้ปรับพีเอชด้วย 0.1 N HCl ให้ได้พีเอชตามต้องการ จากนั้นปรับปริมาตรของสารละลายเป็น 100 มิลลิลิตร โดยเติม 0.05 M Na-acetate-Acetic acid buffer สำหรับพีเอชในช่วง 4.0-5.0 เติม 0.05 M Phosphate buffer สำหรับพีเอชในช่วง 6.0-8.0 และเติม 0.05 M Glycine-NaOH buffer สำหรับพีเอชในช่วง 9.0-10.0

1.1.2 0.4 M trichloroacetic acid solution (TCA) เป็นสารละลายที่ใช้ตกตะกอนโปรตีน ชั่ง trichloroacetic acid 65.356 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 ,000 มิลลิลิตร

1.1.3 0.4 M Na_2CO_3 ชั่ง Na_2CO_3 42.396 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรทั้งหมดเป็น 1,000 มิลลิลิตร

1.1.4 1 N folin-ciocalteu reagent นำมผสมน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:1 ก่อนใช้

1.2 วิธีการวิเคราะห์

1.2.1 ใส่สารละลายเคซีน 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 5 นาที

1.2.2 เติมสารละลายเอนไซม์ตัวอย่างที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชตามต้องการให้มีความเข้มข้นที่เหมาสมแล้วลงไป 1 มิลลิลิตร จับเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

1.2.3 หยุดปฏิกิริยาโดยเติมารละลาย TCA 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.2.4 กรองส่วนผสมโดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

1.2.5 นำส่วนใสที่กรองได้ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ และเติม 0.4 M Na_2CO_3 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

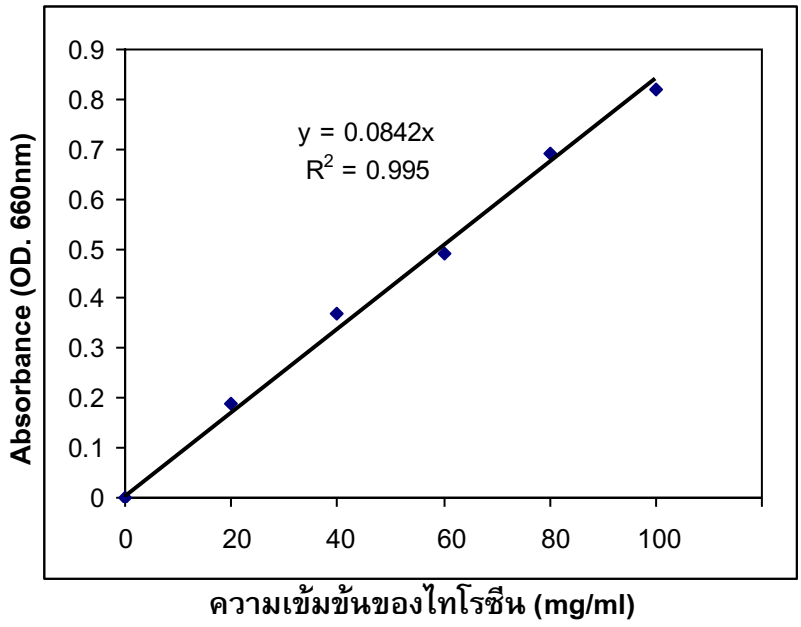
1.2.6 เติม 1 N folin-ciocalteu reagent 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เกิดสีชัดเจน

1.2.7 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (Absorbance, A_{660}) ด้วยเครื่อง UV-Vis recording spectrophotometer UV-240 ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีน

1.2.8 blank ใช้ 0.05 M phosphate buffer แทนสารละลายเอนไซม์ และดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1.2.1 – 1.2.7 แต่เติมสารละลาย TCA ก่อนเติมสารละลายเคซีน

1.3 การทำกราฟมาตรฐานของไทโรซีน

เตรียมสารละลายมาตรฐานไทโรซีนความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งไทโรซีนด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียดให้ได้ปริมาณ 100 มิลลิกรัม แล้วจึงนำสารละลายนี้มาเจือจางให้มีความเข้มข้นของไทโรซีนเท่ากับ 0 , 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำสารละลายต่างๆ เหล่านี้มา 0 .5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1.2.5 และ 1.2.7 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับไมโครกรัมของไทโรซีน



รูปที่ 26. กราฟมาตรฐานของไทโรซีน

1.4 คำนวนปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นหน่วยของเอนไซม์

1 หน่วยของโปรติเอส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยเคซีนให้ได้ไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ในสภาวะของการวิเคราะห์

$$\text{หน่วยของเอนไซม์โปรติเอสต่อมิลลิลิตร} = \frac{(E - E_o) \times b \times c}{E_s \times a \times t}$$

กำหนดให้ E = A_{660} ที่วัดได้เมื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นเคซีน เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 (หรือตามแต่สภาพการวิเคราะห์)

E_o = A_{660} ที่วัดได้เมื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ก่อนจึงเติมสารตั้งต้นเคซีน (control)

E_s = ค่าคงที่ที่ได้จากค่าความชัน (slope) ของกราฟมาตรฐานไทโรซีน (ไมโครกรัมไทโรซีนต่อมิลลิลิตร)

a = ปริมาณสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร) ที่ใช้ในการตรวจสอบปฏิกิริยาการทำงาน ซึ่งในที่นี้มักใช้ครั้งละ 1.0 มิลลิลิตร

b = ปริมาตรของสารละลายทั้งหมด (มิลลิลิตร) ก่อนนำไปทำปฏิกิริยาให้เกิดสี คือ ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ สารละลายเคซีน และสารละลายที่ใช้ตกตะกอนโปรตีน (TCA) รวมกัน ในที่นี้ใช้ปริมาตรรวมเท่ากับ 4 มิลลิลิตร

c = จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น

t = เวลาที่เอนไซม์ทำการย่อยเคซีน ในที่นี้ใช้ 10 นาที

2. การหากิจกรรมเอนไซม์แอมิเลส (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Fuwan, 1938)

2.1 สารเคมี

2.1.1 สารละลาย McIlvaine buffer พีเอช 4.0

2.1.2 สับสเตรท สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์น้ำแป้งต้มสุก (gelatinized soluble starch) : ชั่งแป้ง 1 กรัม ละลายใน McIlvaine buffer นำไปต้มจนสารละลายใส พอสารละลายเย็นลง จึงปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2.1.3 สารละลายไอโอดีนเข้มข้น (iodine stock solution) : ละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) 5 กรัม ในน้ำ 3 – 5 มิลลิลิตร เติมผลึกไอโอดีน (iodine crystal) 1.269 กรัม ลงไปแล้วค่อยๆ คนพร้อมกับเติมน้ำทีละน้อยจนผลึกไอโอดีนละลายหมด ปรับปริมาตรให้เป็น 300

มิลลิลิตร ถ้ามีตะกอนให้กรองออกโดยใช้กระดาษกรอง Whatman no.1 เก็บสารละลายไอโอดีนไว้ในขวดสีชา

2.1.4 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

2.2 วิธีการวิเคราะห์

2.2.1 นำสับสเตรท 3.0 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร ไปบ่มในอ่างน้ำ (water bath) ควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 10 นาที

2.2.2 เตรียมสารละลายไอโอดีน 0.167 มิลลิโมลาร์ โดยดูดสารละลายไอโอดีนเข้มข้นปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 60 มิลลิลิตร (เตรียมแล้วใช้ทันที) ดูดใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืด

2.2.3 เติมสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นเหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร ลงไปในสับสเตรทบ่มต่อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที โดยใช้นาฬิกาจับเวลา ชุดควบคุมทำเช่นเดียวกัน แต่ใช้น้ำกลั่น 0.1 มิลลิลิตรแทนสารละลายเอนไซม์

2.2.4 เมื่อครบ 10 นาทีดูดสารละลายผสมของสับสเตรทกับเอนไซม์ 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในกสรละลายไอโอดีน

2.2.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบล็งค์ (blank)

2.3 การคำนวน

กิจกรรมของเอนไซม์แอมิเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร) $= \frac{(B - A) \times 5 \times 10}{B}$

หมายเหตุ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายเอนไซม์

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือปริมาณค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไป 1 หน่วย ในเวลา 10 นาที ที่สภาวะการทดลองเทียบกับชุดควบคุม

3. การหาน้ำหนักแห้ง

3.1 นำขวดหาน้ำหนักแห้ง (weight bottle) อบที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง

3.2 ใส่ตัวอย่างลงในขวดหาน้ำหนัก ชั่งหาน้ำหนักทั้งหมด (น้ำหนักตัวอย่าง = น้ำหนักทั้งหมด – น้ำหนักขวด)

3.3 นำไปอบในเตาอบแห้งที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส ตลอดคืน เอาออกทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น

3.4 นำไปชั่งหาน้ำหนัก แล้วหักค่าน้ำหนักของขวดหาน้ำหนักแห้งออก ผลที่ได้จะเป็นน้ำหนักแห้งของน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ (ข้อ 5.2)

4. การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก

ปฏิบัติเช่นเดียวกับการหาน้ำหนักแห้ง น้ำหนักที่หายไปคือค่าของความชื้น คำนวนเป็นเปอร์เซ็นต์ความชื้น ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่าง} - \text{น้ำหนักแห้ง}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

5. การวัดความเป็นกรดด่าง (pH) ของวัสดุหมัก

นำตัวอย่างที่ต้องการวัดพีเอช เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 คนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง คนให้เข้ากันอีกครั้งก่อนนำไปวัดพีเอช

6. การนับจำนวนสปอร์โดยใช้ Haemacytometer

6.1 เช็ดสไลด์และ cover glass ของ haemacytometer ให้สะอาด วาง cover glass ให้อยู่ตรงกลางสไลด์ ปิเปตสารละลายสปอร์มาแตะที่ของ cover glass ให้สารละลายสปอร์แทรกเข้าไประหว่าง cover glass และสไลด์จนเต็มพอดี

6.2 นำไปนับจำนวนสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 400 x โดยนับสปอร์ที่อยู่ในแต่ละช่องเล็ก และที่อยู่ระหว่างเส้นทางด้านล่างและด้านขวาตามแนวทแยงมุมซ้ายและขวา รวม 9 ช่อง

6.3 คำนวนจำนวนสปอร์

ขนาดความลึกของ haemacytometer ที่ใช้ = 0.1 มิลลิลิตร

ขนาดพื้นที่ของแต่ละช่องเล็ก = 0.0025 ตารางมิลลิเมตร

เพราะฉะนั้น ปริมาตรของแต่ละช่องเล็ก = 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

$$\text{จำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร} = \frac{\text{จำนวนสปอร์ที่นับได้} \times 10^3 \text{ สปอร์}}{\text{จำนวนช่องที่นับได้} \times 0.00025}$$

7. การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์เกลือ

7.1 การเตรียมสารเคมี

7.1.1 สารละลาย ferric alum อิ่มตัว ละลาย ammonium ferric sulfate ($FeNH_4(SO_4)_2$) 40 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วหยด 2 N HNO_3 ลงไป 2 – 3 หยด

7.1.2 สารละลาย silver nitrate ($AgNO_3$) เข้มข้น 0.1 N อบ $AgNO_3$ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 – 2 ชั่วโมง เอาออกทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่ง $AgNO_3$ หนัก 16.9870 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

7.1.3 สารละลาย potassium thiocyanate (KSCN) มาตรฐาน ชั่ง KSCN 9.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปเทียบมาตรฐานกับ $AgNO_3$ 0.1 N เพื่อหาความเข้มข้นมาตรฐานของ KSCN เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

7.1.4 สารละลาย HNO_3 เข้มข้น 6 N ใส่ conc HNO_3 380 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ซึ่งมีน้ำกลั่นอยู่จำนวนหนึ่ง ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

7.2 วิธีการวิเคราะห์

7.2.1 ใส่ตัวอย่างน้ำปลาที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์

7.2.2 เติม 0.1 N $AgNO_3$ ลงไป 10 มิลลิลิตร (ให้มีปริมาตรเกินพอในการทำปฏิกิริยากับ NaCl เกิดเป็นตะกอน AgCl ได้หมด) เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม 6 N HNO_3 ลงไป 30 มิลลิลิตร เพื่อป้องกัน $AgNO_3$ ไปทำปฏิกิริยากับ anion ชนิดอื่นที่อาจมีอยู่ในน้ำปลา

7.2.3 นำไปตั้งไฟอ่อนๆ จนเดือดนานประมาณ 15 นาที เพื่อให้ตะกอนที่ไม่ใช่ AgCl ละลายหมด ทิ้งไว้ให้เย็น

7.2.4 ใส่สารละลาย ferric alum ลงไป 2 – 3 มิลลิลิตร เพื่อเป็นดัชนี แล้วไตเตรทด้วย 0.1 N KSCN ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ $AgNO_3$ ส่วนที่เหลือ เมื่อถึงจุดยุติจะมีสีแดงอิฐเกิดขึ้น บันทึกปริมาตร KSCN ที่ใช้

7.3 การคำนวนเปอร์เซ็นต์เกลือ

$$\text{เปอร์เซ็นต์เกลือ} = \frac{0.0058443\ (y - x) \times 100}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}}$$

y = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของ 0.1 N $AgNO_3$ ที่ใช้

x = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของ 0.1 N KSCN ที่ใช้

8. การวิเคราะห์หาปริมาณ Formaldehyde nitrogen

8.1 สารเคมี

8.1.1 Formaldehyde pH 9.0

ปรับ pH ของ Formaldehyde ให้ได้ pH 9.0 ด้วย 0.1 N NaOH

8.1.2 0.1 N NaOH

ชั่ง NaOH 4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร (volumetrid flask) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

8.2 วิธีการวิเคราะห์

8.2.1 ปิเปตตัวอย่างน้ำปลา 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 19 มิลลิลิตร ทำการปรับ pH ให้ได้ pH 7.0 ด้วย 0.1 N NaOH

8.2.2 เติม Formaldehyde pH 9.0 จำนวน 10 มิลลิลิตร

8.2.3 ไทเตรตด้วย 0.1 N NaOH จนได้ pH 9.0 บันทึกปริมาตรของ 0.1 N NaOH ที่ใช้

8.2.4 คำนวณหาปริมาณ Formaldehyde nitrogen จากสูตร

Formaldehyde nitrogen = YN x 28

Y = ปริมาตรของ 0.1 N NaOH ที่ใช้ในการไตเตรต

N = ความเข้มข้นเป็น Normal ของ NaOH

9. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนวิธีเจลดาล์ว (Kjeldahl method)

9.1 สารเคมี

9.1.1 กรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4)

9.1.2 สารเร่งปฏิกิริยา ประกอบด้วย โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) และคอปเปอร์ซัลเฟต ($Cu_2SO_4.5H_2O$) ในอัตรส่วน 9 : 1

9.1.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์

9.1.4 สารละลายกรดบอริก (H_3BO_3) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์

9.1.5 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

9.1.6 อินดิเคเตอร์: เตรียมเมธิลเรด (methyl red) และโบรโมครีซอลกรีน (bromocresol green) ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในเอทานอล แล้วจึงนำมาผสมกันในอัตราส่วน (1 : 5)

9.1.7 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

9.2 วิธีการวิเคราะห์

9.2.1 ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม (หรือ 5 – 6 กรัม ในกรณีของอาหารที่มีความชื้นสูง เช่น นม) ใส่ลงในหลอดย่อย จดน้ำหนักที่แน่นอน

9.2.2 เติมตัวเร่งปฏิกิริยาประมาณ 5 กรัม

9.2.3 เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 15 มิลลิลิตร

9.2.4 นำไปให้ความร้อนบนเตาย่อย อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส จนได้สารละลายใส (ประมาณ 1 ชั่วโมง) ในตู้ดูดควัน

9.2.5 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เจือจางด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

9.2.6 นำหลอดย่อยเข้าเครื่องกลั่น ปลายสายของเครื่องสายหนึ่งจุ่มถังน้ำกลั่นอีกสายหนึ่งจุ่มถังโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยา

9.2.7 วางขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีสารละลายกรดบอริก 25 มิลลิลิตร และอินดิเคเตอร์ ไว้ตรงปลายสายของส่วนควบแน่น (condenser) โดยให้ปลายท่อจุ่มลงในสารละลายเพื่อเก็บก๊าซแอมโมเนีย ใช้เวลากลั่น 4 นาที

9.2.8 นำขวดรูปชมพู่ไปไตรเตรตกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรที่ใช้

9.3 การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของกรดไฮโดรคลอริก

9.3.1 ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 0.1300 กรัม (w_1) ใส่ในขวดรูปชมพู่ จดน้ำหนักที่แน่นอน เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ละลายให้เท่ากัน

9.3.2 หยดอินดิเคเตอร์ลงไป 5 หยด ไตเตรทด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนสารละลายเปลี่ยนสี บันทึกปริมาตรที่ใช้ (A_1)

9.3.3 นำไปต้มให้เดือดประมาณ 2 – 3 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง สารละลายจะกลับเป็นสีเดิม

9.3.4 ไตเตรตด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกอีกครั้ง จนสารละลายเปลี่ยนสี บันทึกปริมาตรที่ใช้ (A_2)

$$\text{ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอล)} = \frac{2{,}000 \times W_1}{(A1 + A2) \times 106}$$

9.4 การคำนวน

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{1.401 \times N \times V}{W}$$

หมายเหตุ N คือ ความเข้มข้นที่แน่นอนของกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอล)

V คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริก (มิลลิลิตร)

W คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

ปริมาณโปรตีน (เปอร์เซ็นต์) = ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด x factor

หมายเหตุ ค่า factor ที่ใช้ผลิตภัณฑ์ต่างๆ แสดงดังตารางผนวกที่ 11

ภาคผนวก ค

ตารางและข้อมูลการทดลอง

ตารางผนวกที่ 1 การผลิตเอนไซม์โปรติเอส (U/g dry Koji) ของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 (a) และ *A. oryzae* MI PSU1 (b) เมื่อเลี้ยงบนสับสเตรท 5 ชนิด คือ กากถั่วเหลือง ถั่วเหลือง รำข้าวเจ้า ข้าวสาลีและข้าวเจ้า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

(a)

เวลา	Protease activity (U/g dry Koji)				
(วัน)	กากถั่วเหลือง	ถั่วเหลือง	รำข้าวเจ้า	ข้าวสาลี	ข้าวเจ้า
0	8.00	21.04	16.84	3.58	9.24
1	8.84	58.12	79.90	12.56	20.20
2	204.00	505.20	1202.00	15.98	612.60
3	358.90	602.00	1688.40	64.42	2208.40
4	2037.60	1265.20	3267.60	183.36	2968.40
5	705.20	905.20	1882.00	168.40	1734.60
6	382.80	536.80	1785.20	28.40	1306.20

(b)

เวลา	Protease activity (U/g dry Koji)				
(วัน)	กากถั่วเหลือง	ถั่วเหลือง	รำข้าวเจ้า	ข้าวสาลี	ข้าวเจ้า
0	9.24	7.74	34.52	11.14	1.68
1	30.80	21.92	48.40	14.72	220.64
2	209.40	265.20	212.60	30.10	668.40
3	437.80	438.90	1221.00	221.00	962.00
4	1174.40	1425.20	1810.40	359.16	1633.40
5	1067.20	1155.70	1705.20	23.10	1275.60
6	162.10	438.90	1266.20	8.84	1075.90

ตารางผนวกที่ 2 การผลิตเอนไซม์แอมิเลส (U/g dry Koji) ของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3083 (a) และ *A. oryzae* MI PSU1 (b) เมื่อเลี้ยงบนสับสเตรท 5 ชนิด คือ กากถั่วเหลือง ถั่วเหลือง รำข้าวเจ้า ข้าวสาลีและข้าวเจ้า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

(a)

เวลา	Amylase activity (U/g dry Koji)				
(วัน)	กากถั่วเหลือง	ถั่วเหลือง	รำข้าวเจ้า	ข้าวสาลี	ข้าวเจ้า
0	21.54	2.55	24.09	7.94	0.00
1	16.10	14.77	71.08	5.19	3.46
2	123.54	65.96	190.35	18.13	76.43
3	123.13	165.98	226.38	41.51	219.15
4	155.23	218.17	148.30	42.73	209.59
5	189.53	218.18	146.41	8.29	80.20
6	96.69	135.46	113.06	23.28	86.67

(b)

เวลา	Amylase activity (U/g dry Koji)				
(วัน)	กากถั่วเหลือง	ถั่วเหลือง	รำข้าวเจ้า	ข้าวสาลี	ข้าวเจ้า
0	0.00	4.25	35.01	8.79	3.97
1	7.45	11.58	64.03	3.32	10.01
2	118.79	69.37	129.38	12.41	50.02
3	129.54	209.82	214.04	117.29	191.39
4	135.75	188.81	247.96	81.39	170.78
5	80.97	190.59	204.46	25.48	157.91
6	19.75	104.21	102.29	13.27	64.03

ตารางผนวกที่ 3 ผลของความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 เมื่อเลี้ยงบนรำข้าวเจ้าที่ปรับความชื้นเป็น 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 % ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

(a)

เวลา	Protease activity (U/g dry Koji) ที่มีความชื้นเริ่มต้นต่างๆ (%)						
(วัน)	40	45	50	55	60	65	70
0	0.00	14.32	0.00	0.40	21.44	8.40	0.00
1	0.00	63.20	0.00	8.40	35.80	23.20	0.00
2	560.00	326.30	132.60	134.70	122.00	44.20	27.40
3	1233.60	640.00	347.40	336.80	385.20	90.96	121.80
4	2686.40	3199.80	1915.60	2429.60	964.20	888.40	812.60
5	2176.40	2926.40	1570.60	743.00	210.00	370.60	324.20
6	1540.80	1200.00	909.60	632.00	164.00	223.20	138.80

(b)

เวลา	Amylase activity (U/g dry Koji) ที่มีความชื้นเริ่มต้นต่างๆ (%)						
(วัน)	40	45	50	55	60	65	70
0	0.00	1.08	0.00	0.72	0.00	0.44	0.72
1	0.00	0.00	0.00	0.00	3.31	0.00	2.57
2	112.15	0.35	55.43	51.94	19.45	0.00	1.83
3	110.96	93.93	70.54	83.83	47.13	6.17	14.84
4	147.03	128.66	69.83	66.11	47.77	15.01	25.56
5	239.48	222.86	86.39	139.83	47.85	43.54	51.55
6	184.01	153.73	82.26	30.53	62.31	60.71	0.93

ตารางผนวกที่ 4 ผลของพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 เมื่อเลี้ยงบนรำข้าวเจ้าที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 45 % และปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0 , 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

(a)

เวลา	Protease activity (U/g dry Koji) ที่ pH ต่างๆ				
(วัน)	4	5	6	7	8
0	8.00	18.90	14.32	3.36	12.20
1	10.50	66.48	14.80	11.60	46.30
2	27.40	75.60	989.40	2530.40	2147.40
3	34.96	324.00	1263.20	3138.80	2341.00
4	294.80	650.40	1668.60	4151.20	3726.00
5	136.80	580.80	1574.40	2631.20	980.80
6	38.00	370.40	732.60	2467.20	570.40

(b)

เวลา	Amylase activity (U/g dry Koji) ที่ pH ต่างๆ				
(วัน)	4	5	6	7	8
0	0.00	3.00	5.14	0.00	5.14
1	5.35	5.99	16.69	16.26	14.55
2	5.91	7.18	35.68	37.48	43.38
3	9.02	11.40	43.81	45.96	63.34
4	11.98	25.98	48.98	80.23	67.77
5	12.15	58.85	69.08	114.69	78.17
6	0.00	0.82	16.06	73.47	11.73

ตารางผนวกที่ 5 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (a) และแอมิเลส (b) ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3083 เมื่อเลี้ยงบนรำข้าวเจ้าที่ปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 45 % และปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40 และ 45 °C ตามลำดับ เป็นเวลา 7 วัน

(a)

เวลา	Protease activity (U/g dry Koji) ที่อุณหภูมิต่างๆ (C°)				
(วัน)	25	30	35	40	45
0	0.00	26.12	0.00	11.58	0.00
1	25.68	50.40	224.10	29.50	0.00
2	368.40	1869.40	379.00	105.20	16.80
3	748.80	1940.80	1410.60	180.80	29.60
4	3355.80	4375.60	1987.20	1263.20	340.80
5	3292.40	3063.20	1932.60	1263.20	59.00
6	2307.40	2233.60	1633.60	1025.20	42.80

(b)

เวลา	Amylase activity (U/g dry Koji) ที่อุณหภูมิต่างๆ (C°)				
(วัน)	25	30	35	40	45
0	14.52	11.27	11.52	13.52	10.43
1	23.05	18.28	21.79	26.05	11.29
2	70.67	43.49	65.14	29.80	12.98
3	98.93	82.21	83.25	42.49	19.38
4	115.56	105.36	94.93	71.63	23.04
5	141.56	134.61	141.35	118.42	32.06
6	90.95	110.57	70.85	85.98	30.87

ตารางผนวกที่ 6 ผลของการวิเคราะห์หา Formaldehyde Nitrogen ของน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิรำข้าวเจ้าปริมาณต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน

เวลา (สัปดาห์)	Formaldehyde Nitrogen (g/l) ของน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิรำข้าวปริมาณต่างๆ (%)				
	0	5	10	15	20
0	2.24	2.99	2.89	3.08	3.27
1	6.35	8.59	11.29	14.65	12.41
2	8.40	13.25	17.45	15.57	14.28
3	11.20	16.80	18.85	18.37	18.29
4	12.97	18.57	20.91	19.88	19.23
5	14.19	19.22	21.09	20.25	20.25
6	15.12	20.53	22.12	20.53	21.17
7	16.61	21.93	22.77	22.21	22.57
8	17.54	22.49	23.43	23.61	23.05
9	17.45	23.05	23.85	23.61	23.89
10	18.29	23.24	24.17	23.85	23.98
11	18.53	23.36	24.55	23.98	24.03
12	19.13	23.80	24.64	24.36	24.36
13	20.25	23.94	24.92	25.01	24.48
14	21.09	24.69	25.04	25.12	24.60
15	21.47	24.79	25.16	25.20	25.39
16	22.12	24.92	25.48	25.23	25.76

ตารางผนวกที่ 7 ผลของการวิเคราะห์หา Formaldehyde Nitrogen ของน้ำปลาที่หมักโดยเติมรำข้าวเจ้าปริมาณต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน

เวลา	Formaldehyde Nitrogen (g/l) ของน้ำปลาที่หมักโดยเติมรำข้าวปริมาณต่างๆ (%)				
(สัปดาห์)	0	5	10	15	20
0	2.24	4.62	4.90	4.48	4.48
1	6.35	7.14	7.42	7.28	6.44
2	8.40	9.80	8.80	9.10	8.40
3	11.20	11.48	11.20	10.36	9.38
4	12.97	12.88	12.88	10.78	10.64
5	14.19	13.86	13.02	12.04	11.34
6	15.12	14.28	14.42	13.44	13.30
7	16.61	15.12	14.82	13.72	13.32
8	17.54	17.64	16.66	16.38	14.14
9	17.45	17.64	17.50	16.24	15.12
10	18.29	18.48	18.76	17.08	15.46
11	18.53	20.02	18.20	18.34	15.22
12	19.13	21.00	18.76	19.46	16.70
13	20.25	21.14	18.90	19.74	16.94
14	21.09	21.40	19.46	19.32	17.36
15	21.47	21.70	19.32	19.60	18.16
16	22.12	21.98	20.58	20.08	18.34

ตารางผนวกที่ 8 ผลการวิเคราะห์หา Total Nitrogen ของน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิรำข้าวเจ้าปริมาณต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 เดือน

เวลา (เดือน)	Total Nitrogen (g/l) ของน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิรำข้าวปริมาณต่างๆ (%)				
	0	5	10	15	20
0	1.258	1.564	1.545	1.655	1.786
1	10.903	16.368	15.020	14.537	13.154
2	13.457	17.566	17.087	16.136	15.894
3	15.973	18.880	18.336	18.319	18.393
4	17.232	20.972	20.361	19.405	19.563

ตารางผนวกที่ 9 ผลการวิเคราะห์หา Total Nitrogen ของน้ำปลาที่หมักโดยเติมรำข้าวเจ้าปริมาณต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน

เวลา (เดือน)	Total Nitrogen (g/l) ของน้ำปลาที่หมักโดยเติมรำข้าวปริมาณต่างๆ (%)				
	0	5	10	15	20
0	1.258	1.242	1.659	1.667	1.741
1	10.903	11.088	10.959	10.055	9.472
2	13.457	14.132	13.927	13.255	12.029
3	15.973	16.401	15.854	14.749	13.366
4	17.232	18.020	17.871	16.951	14.962

ตารางผนวกที่ 10 ผลการวิเคราะห์ค่าพีเอชของน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิรำข้าวปริมาณต่างคือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน

เวลา (สัปดาห์)	pH ของน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิรำข้าวปริมาณต่างๆ (%)				
	0	5	10	15	20
0	6.20	5.30	5.10	4.90	4.90
1	5.90	5.50	5.30	5.20	5.00
2	5.90	5.50	5.30	5.10	5.00
3	5.90	5.50	5.30	5.10	5.00
4	5.80	5.40	5.20	5.10	4.90
5	5.90	5.50	5.20	5.10	5.00
6	5.90	5.50	5.30	5.10	5.00
7	5.90	5.50	5.30	5.10	5.00
8	5.90	5.50	5.30	5.10	5.00
9	5.90	5.40	5.20	5.00	4.90
10	5.90	5.50	5.20	5.00	4.90
11	5.90	5.50	5.10	5.00	5.00
12	5.90	5.40	5.10	5.00	5.00
13	5.90	5.50	5.20	5.10	4.90
14	5.80	5.30	5.10	4.90	4.80
15	5.70	5.20	4.90	4.80	4.80
16	5.90	5.40	5.20	5.00	4.90

ตารางผนวกที่ 11 ผลการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์เกลือของน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิรำข้าวปริมาณต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน

เวลา	NaCl (%) ของน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิรำข้าวปริมาณต่างๆ (%)				
(สัปดาห์)	0	5	10	15	20
0	29.52	27.76	26.52	26.79	27.03
1	29.41	28.63	28.90	26.79	28.08
2	28.75	28.04	27.46	26.79	25.74
3	28.78	27.22	27.11	26.56	26.48
4	28.16	28.77	27.10	24.69	26.40
5	27.69	26.83	26.24	25.97	25.82
6	28.66	27.38	26.09	26.05	26.64
7	27.88	26.64	26.48	25.35	26.13
8	27.65	26.99	26.40	26.09	26.13
9	27.22	27.18	25.70	25.97	25.82
10	27.88	27.34	26.99	26.87	26.21
11	28.01	27.56	27.06	26.77	26.77
12	28.66	28.78	27.22	26.91	27.18
13	28.12	26.95	26.40	26.71	26.36
14	28.00	27.26	26.61	26.75	25.62
15	28.10	26.44	26.79	27.26	25.89
16	28.58	27.03	25.58	26.71	25.31

ตารางผนวกที่ 12 ผลการวิเคราะห์สีของน้ำปลาที่หมักได้ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm โดยเติมโคจิรำข้าวเจ้าปริมาณต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน

เวลา	สีของน้ำปลาที่หมักโดยเติมโคจิรำข้าวปริมาณต่างๆ (%)				
(สัปดาห์)	0	5	10	15	20
0	0.229	0.387	0.539	0.654	0.770
1	0.233	0.463	0.737	0.974	1.434
2	0.236	0.517	0.991	1.337	1.582
3	0.223	0.789	1.218	1.630	1.705
4	0.232	0.867	1.423	1.883	2.278
5	0.263	0.952	1.677	2.053	2.443
6	0.368	1.205	1.822	2.325	2.773
7	0.378	1.326	2.303	2.783	3.390
8	0.395	1.473	2.323	2.910	3.450
9	0.408	1.497	2.347	2.943	3.490
10	0.437	1.677	2.437	2.993	3.670
11	0.436	1.883	2.693	3.112	4.167
12	0.513	2.037	2.990	3.590	4.553
13	0.540	2.093	3.130	3.680	4.553
14	0.648	2.265	3.180	3.694	4.680
15	0.633	2.287	3.440	4.100	5.227
16	0.660	2.394	3.460	4.333	5.867

ตารางผนวกที่ 13 ค่า factor ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ต่างๆ

ผลิตภัณฑ์	Conversion factor
นมและผลิตภัณฑ์นม	6.38
แป้ง	5.70
ไข่	6.68
เจลาติน	5.55
ถั่ว	5.71
ข้าว	5.95
ข้าวโพด	6.25
เนื้อสัตว์	6.25
ผลิตภัณฑ์อื่นๆ	6.25

ที่มา : James (1995)

ตารางผนวกที่ 14 ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA post-hoc comparison of means (Duncan's multiple range test) ของสีน้ำปลา

Descriptives

color

source	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
ex1	30	5.6667	.75810	.13841	5.3836	5.9497
ex2	30	7.2667	.73968	.13505	6.9905	7.5429
ex3	30	7.2333	.62606	.11430	6.9996	7.4671
ex4	30	6.8667	1.00801	.18404	6.4903	7.2431
ex5	30	6.9667	.92786	.16940	6.6202	7.3131
Total	150	6.8000	1.00335	.08192	6.6381	6.9619

Test of Homogeneity of Variances

color

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.628	4	145	.644

ANOVA

color

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	51.667	4	12.917	19.047	.000
Within Groups	98.333	145	.678		
Total	150.000	149			

Homogeneous Subsets

color

Duncan

ex	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
ex1	30	5.6667	
ex4	30		6.8667
ex5	30		6.9667
ex3	30		7.2333
ex2	30		7.2667
Sig.		1.000	.088

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ตารางผนวกที่ 15 ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA post-hoc comparison of means (Duncan's multiple range test) ของกลิ่นน้ำปลา

Descriptives

aroma

source	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
ex1	30	5.6333	.85029	.15524	5.3158	5.9508
ex2	30	7.2333	.50401	.09202	7.0451	7.4215
ex3	30	7.0667	.52083	.09509	6.8722	7.2611
ex4	30	7.0333	.88992	.16248	6.7010	7.3656
ex5	30	6.8333	.69893	.12761	6.5723	7.0943
Total	150	6.7600	.90990	.07429	6.6132	6.9068

Test of Homogeneity of Variances

aroma

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.869	4	145	.005

ANOVA

aroma

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	50.027	4	12.507	24.729	.000
Within Groups	73.333	145	.506		
Total	123.360	149			

Homogeneous Subsets

aroma

Duncan

ex	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
ex1	30	5.6333		
ex5	30		6.8333	
ex4	30		7.0333	7.0333
ex3	30		7.0667	7.0667
ex2	30			7.2333
Sig.		1.000	.234	.309

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ตารางผนวกที่ 16 ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA post-hoc comparison of means (Duncan's multiple range test) ของรสชาติน้ำปลา

Descriptives

flavor

source	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
ex1	30	5.3333	.75810	.13841	5.0503	5.6164
ex2	30	7.0667	.69149	.12625	6.8085	7.3249
ex3	30	6.8000	.92476	.16884	6.4547	7.1453
ex4	30	6.7000	1.17884	.21523	6.2598	7.1402
ex5	30	6.7333	1.04826	.19139	6.3419	7.1248
Total	150	6.5267	1.10943	.09058	6.3477	6.7057

Test of Homogeneity of Variances

flavor

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.038	4	145	.092

ANOVA

flavor

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	55.893	4	13.973	15.891	.000
Within Groups	127.500	145	.879		
Total	183.393	149			

Homogeneous Subsets

flavor

Duncan

ex	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
ex1	30	5.3333	
ex4	30		6.7000
ex5	30		6.7333
ex3	30		6.8000
ex2	30		7.0667
Sig.		1.000	.172

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ตารางผนวกที่ 17 ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีทางสถิติ One-Way ANOVA post-hoc comparison of means (Duncan's multiple range test) ของความชอบรวมของน้ำปลา

Descriptives

like

source	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
ex1	30	5.6000	.56324	.10283	5.3897	5.8103
ex2	30	7.3333	.60648	.11073	7.1069	7.5598
ex3	30	7.1333	.89955	.16424	6.7974	7.4692
ex4	30	7.0667	.78492	.14331	6.7736	7.3598
ex5	30	7.1000	.71197	.12999	6.8341	7.3659
Total	150	6.8467	.95353	.07786	6.6928	7.0005

Test of Homogeneity of Variances

like

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.128	4	145	.345

ANOVA

like

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	59.573	4	14.893	28.452	.000
Within Groups	75.900	145	.523		
Total	135.473	149			

Homogeneous Subsets

like

Duncan

ex	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
ex1	30	5.6000	
ex4	30		7.0667
ex5	30		7.1000
ex3	30		7.1333
ex2	30		7.3333
Sig.		1.000	.198

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

*** ตารางที่ผนวกที่ 14 ถึง 17 กำหนดให้**

ex1 คือ น้ำปลาที่เติมโคจิ 0 เปอร์เซ็นต์
ex2 คือ น้ำปลาที่เติมโคจิ 5 เปอร์เซ็นต์
ex3 คือ น้ำปลาที่เติมโคจิ 10 เปอร์เซ็นต์
ex4 คือ น้ำปลาที่เติมโคจิ 15 เปอร์เซ็นต์
ex5 คือ น้ำปลาที่เติมโคจิ 20 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 18 ผลการวิเคราะห์ Proximate Analysis ของปลากะตักที่ใช้ในการหมักน้ำปลา

ชื่อ/รหัสตัวอย่าง	รายการทดสอบ	วิธีทดสอบ	ผลทอสอบ (หน่วย)
1.ปลากะตักบด	Protein	AOAC (Kjeldahl Method)	17.09 %
	Crude Fat	AOAC (Soxhlet Extraction Method)	0.47 %
	Moisture	AOAC (Loss on Drying at 95-100^{o}C)	78.63 %
	Ash	AOAC	3.15 %
	Carbohydrate	Calculation	0.66 %
	Energy	Calculation	75.23 kcal

หมายเหตุ : Protein conversion factors = 6.25

ภาคผนวก ง

แบบสอบถามการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค

วันที่.....ผลิตภัณฑ์.....ผู้ทดสอบ.....

<u>คำแนะนำ</u> กรุณาชิมตัวอย่างน้ำปลาตามลำดับที่เสนอ และให้คะแนนตามระดับความชอบที่มีต่อผลิตภัณฑ์ กรุณาบ้วนปากก่อนชิมตัวอย่างต่อไปทุกครั้ง

ความชอบ	ระดับคะแนน
ชอบมากที่สุด	9
ชอบมาก	8
ชอบปานกลาง	7
ชอบเล็กน้อย	6
บอกไม่ได้ว่าชอบหรือไม่ชอบ	5
ไม่ชอบเล็กน้อย	4
ไม่ชอบปานกลาง	3
ไม่ชอบมาก	2
ไม่ชอบที่สุด	1

คุณลักษณะ	รหัสตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง .....
สี					
กลิ่น					
รสชาติ					
ความชอบรวม					

ข้อเสนอแนะ..... .....

.....

.....

.....

ขอบคุณที่ให้ความร่วมมือในการตอบแบบสอบถาม

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายอาคม หวานนุ่น

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4910220101

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2548

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ผู้ช่วยวิจัย ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปี 2550

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Wannun, A., Suntinanalert, P. and Borvornreugroj, P. 2008. Selection of *Aspergillus oryzae* producing salt-tolerrant protease for fish sauce fermentation. The 9th National Grad-Research Conference. 14-15 March 2008. Burapa University, Bangsaen, Chonburi, Thailand.