



บุดูปรุงรสพร้อมบริโภคที่ผลิตจากโปรตีนไฮโดรไลเสทของวัสดุเศษเหลือ
อาหารทะเลแช่เยือกแข็ง

**Ready to Eat Seasoned Budu Produced from Protein Hydrolysate of by-products
of Frozen Seafood**

กาญจนารัตน์ อรุณรัตน์
Kanjanarat Arunrat

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Food Science and Technology
Prince of Songkla University**

2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์	บุญปรุงรสพร้อมบริโภคที่ผลิตจากโปรตีนไฮโดรไลเสทของวัสดุเศษเหลืออาหารทะเลแช่เยือกแข็ง
ผู้เขียน	นางสาวกาญจนารัตน์ อรุณรัตน์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา	2553

บทคัดย่อ

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปอาหารทะเลแช่เยือกแข็งด้วยกระบวนการหมักแบบดั้งเดิม โดยใช้วัสดุหมักที่ประกอบด้วยเศษเหลือของปลาตาโตที่มีหรือไม่มีเครื่องในหมักกระดองหรือหัวกุ้งขาวร่วมหมักด้วยในปริมาณร้อยละ 10 หรือ 20 พบว่าการย่อยโปรตีนกล้ำมเนื่องจากโครงปลาเกิดขึ้นไม่น้อยกว่าร้อยละ 90 เมื่อใช้ระยะเวลาหมัก 6 เดือน การวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสท ประกอบด้วย ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณฟอสฟอรัสในไนโตรเจน ปริมาณแอมโมเนียในไนโตรเจน ปริมาณอะมิโนในไนโตรเจน ปริมาณค่าที่ระเหยได้ทั้งหมด และปริมาณไตรเมทิลลามีนของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากทุกชุดหมักพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณอะมิโนในไนโตรเจน และปริมาณเกลือระหว่าง 15-20 g/L, 10.45-11.69 g/L และ ร้อยละ 26- 29 ตามลำดับ และมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน 1×10^4 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม การประเมินคุณภาพด้านประสาทสัมผัสพบว่าการยอมรับโปรตีนไฮโดรไลเสทจากชุดหมักที่ไม่มีเครื่องในหมักและบุญปรุงรสการคั่วในด้านสี กลิ่น รสชาติ และความชอบรวมไม่แตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) และพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทจากชุดหมักที่เติมหัวกุ้งขาวร้อยละ 20 มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระของ DPPH และ ABTS สูงสุด

การใช้โปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากการหมักเศษเหลือปลาตาโตและหัวกุ้งขาวร้อยละ 20 ผลิตผลิตภัณฑ์บุญปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์พร้อมรับประทานที่ปรุงรสด้วยส้มแขกแห้งหอมแดงสด พริกขี้หนูสด ตะไคร้ และน้ำตาลในปริมาณร้อยละ 18.8, 30, 15.2, 18 และ 18 ตามลำดับ และให้ความร้อนระดับพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิ 28, 35 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าผลิตภัณฑ์ยังคงปลอดภัยจากการใช้บริโภคและได้รับการยอมรับทางประสาทสัมผัสจากผู้ทดสอบชิม โดยอุณหภูมิของการเก็บรักษาไม่มีผลให้การเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์และการยอมรับทางประสาทสัมผัสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) คำสีของส่วนของเหลวของผลิตภัณฑ์

เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร การเก็บรักษามีผลให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในส่วนของเหลวของผลิตภัณฑ์ลดลงตามระยะเวลาเก็บรักษา ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากส่วนของแข็งของผลิตภัณฑ์มีค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 42-66 จากปริมาณเริ่มต้น โดยอุณหภูมิที่เก็บรักษาไม่มีผลให้การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งในส่วนของเหลวและของแข็งของผลิตภัณฑ์ สมบัติการเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (reducing power) และความสามารถจับอนุมูลอิสระของ DPPH ของส่วนที่เป็นของเหลวของผลิตภัณฑ์มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา และมีค่าสูงสุดเมื่อเก็บรักษานาน 8 สัปดาห์ ในขณะที่สมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากของแข็งของบวบปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิต่างๆลดลงอย่างรวดเร็วใน 6 สัปดาห์แรกของการเก็บรักษา จากนั้นมีค่าคงที่จนถึงสัปดาห์ที่ 12

ผลการวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเศษเหลือปลาตาโตและหัวกุ้งขาวสามารถใช้เป็นวัสดุหมักเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยกระบวนการผลิตแบบดั้งเดิม และสามารถไฮโดรไลโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผลิตได้ผลิตผลิตภัณฑ์บวบปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์

Thesis Title Ready to eat seasoned Budu produced from protein hydrolysate of
 by-products of frozen seafood
Author Kanjanarat Arunrat
Major Program Food Science and Technology
Academic Year 2010

ABSTRACT

Protein hydrolysates were produced by traditional fermentation from by-products of frozen seafood processing. The fermented materials composed mainly fish frame (*Priacanthus tayenus*) in combination with 10 or 20 %w/w of cuttlefish viscera and/or white shrimp cephalothorax. At 6th month of the fermentation at least 60% of fish muscle protein attached to the fish bone was hydrolysed. Chemical compositions of the obtained hydrolysates were analysed. It was found that total nitrogen, formaldehyde nitrogen, ammonia nitrogen, amino nitrogen, total volatile base (TVB-N), and trimethylamine (TMA) revealed that there were non significant differences ($p>0.05$). The obtained hydrolysates possessed with total nitrogen, amino nitrogen, and salt in the ranges of 15-20 g/L, 10.45-11.69 g/L, and 26-29% w/v, respectively and total viable count of bacteria less than 1×10^4 CFU/g. Sensory evaluation revealed that acceptance of the hydrolysates obtained from fermented material without squid viscera for color, flavor, taste, and overall product attribute were non significantly differences ($p>0.05$). The hydrolysate prepared by fermentation of fish frame and 20%w/w shrimp cephalothorax exhibited the strongest antioxidative activity as measured by as measured by DPPH and ABTS scavenging activities ($p< 0.05$).

The hydrolysate derived from fermentation of fish frame and shrimp cephalothorax (20% w/w) was used to produce the pasteurized ready-to-eat seasoned budu. The hydrolysate was seasoned with ingredients including dried garcena (18% w/w), shallot (30% w/w), chili (15.2% w/w), lemon grass (18% w/w), and sugar (18% w/w). The seasoned hydrolysate was pasteurized at 90°C for 10 min. The pasteurized products stored at 25, 35 and 45°C for 3 months were considered as safe for consumption and accepted by panelists. Moreover,

the storage temperatures showed non significant effect on microbial and sensory qualities of the product ($p>0.05$).

Color intensity of liquid fraction of the stored products was increased corresponding to development of its absorbance at OD 420 nm. Increase of storage time led to reduction in soluble phenolic compound in liquid fraction. Incontrast, extractable phenolic compound in solid fraction of the stored products was increased by 42-66% from the initial value. The storage temperatures showed non significant effect ($p>0.05$) on alteration of phenolic content of both fractions. Reducing power and DPPH radical scavenging activity of the liquid fraction were increased with increasing of storage time reaching the highest value by the 8th week of the storage. Whereas, DPPH radical scavenging activity of the extracts of solid fraction was decreased significantly upon extension of the storage reaching the lowest value by the 6th and maintaining throughout the rest of the storage.

The studies confirm that by-products from frozen seafood processing, fish frame and shrimp cephalothorax, can be used to produce protein hydrolysate by using the traditional fermentation and the obtained hydrolysate can be produced into the ready-to-eat pasteurize-seasoned budu.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีต้องขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จักรี ทองเรือง ประธานกรรมการที่ปรึกษา ดร.สุนิสา ศิริพงษ์วุฒิกร กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำในเรื่องต่างๆตลอดระยะเวลาที่ศึกษา ทำงานวิจัยและตรวจทานแก้ไขรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ดร.วรพงษ์ อัสวเกษตรนิ ประธานกรรมการจากภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรรพลีสิทธิ์ กล่อมเกล้า ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ กรรมการจากบัณฑิตวิทยาลัย คณะกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติและคณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนในการวิจัย ขอขอบพระคุณบริษัทเอสเอสไฟรอสเช่นฟูลส์จำกัดที่ให้ความอนุเคราะห์วัสดุคิบเพื่อใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณครู อาจารย์และผู้ให้ความรู้ทุกท่านที่กรุณาอบรมสั่งสอนเป็นห่วงเป็นใยตลอดมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากรของคณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆและทดสอบชิมผลิตภัณฑ์

ขอขอบพระคุณคุณแม่ และพี่ชายที่สนับสนุนในด้านการศึกษาและคอยเป็นกำลังใจ ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่คอยให้คำแนะนำ ช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในการศึกษาและทำการวิจัย รวมทั้งทุกท่านที่มีได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

กาญจนารัตน์ อรุณรัตน์

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ.....	(8)
LIST OF TABLES.....	(9)
LIST OF FIGURES.....	(10)
บทที่.....	
1 บทนำ.....	
บทนำต้นเรื่อง.....	1
การตรวจเอกสาร.....	2
วัตถุประสงค์.....	19
2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ.....	
วัสดุอุปกรณ์.....	20
วิธีการ.....	22
3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	28
4 บทสรุป.....	68
เอกสารอ้างอิง.....	70
ภาคผนวก.....	80
ประวัติผู้เขียน.....	102

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Speies of fish and production conditions of fermented fish hydrolysates in some countries.....	6
2.	Chemical composition of fish species used in budu and fish production	8
3.	Chemical characteristics of fish sauces from seven countries of Southest and East Asia.....	12
4.	Creatine and creatinine contents in fish sauces (mg/100 ml).....	12
5.	Chemical and reagents used for the experiments	21
6.	Instruments used for the experiment	22
7.	Proximate composition and initial quality of fish by-product, shrimp cephalothorax, and squid viscera.....	28
8.	Amino nitrogen content changer during fish protein hydrolysate fermentation with various ratio fish fillets by-products, shrimp cephalothrax and squid viscera.	35
9.	pH value of protein hydrolysates (of mixture of seafood by-products) during fermentation	42
10.	Sensory test of fish protein hydrolysate fermented with various ratio fish fillets by-products, shrimp cephalothrax and squid viscera and commercial budu.....	48
11.	Antioxidative activities of fish protein hydrolysate fermented with various ratio fish fillets by-products, shrimp cephalothrax and squid viscera and commercial budu	50
12.	pH value of pasteurized seasoning SPH during storage at 28, 35, and 45 °C.....	53
13.	Total viable counts, <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>E. coli</i> of pasteurized seasoning SPH during storage at 28, 35, and 45 °C.....	67

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Total nitrogen content of protein hydrolysates during fermentation of mixture of seafood by-products.....	30
2. Formal nitrogen content of protein hydrolysates during fermentation of mixture of seafood by-products.....	32
3. Ammoniacal nitrogen content of protein hydrolysates during fermentation of mixture of seafood by-products.....	33
4. Total volatile bases nitrogen (TVBN) content of protein hydrolysates during fermentation of mixture of seafood by-products.....	37
5. Trimethylamine (TMA) content of protein hydrolysates during fermentation of mixture of seafood by-products.....	39
6. Salt content of protein hydrolysates during fermentation of mixture of seafood by-products.....	40
7. L*, a* and b* values of protein hydrolysates during fermentation of mixture of seafood by-products	43
8. Total viable counts (log CFU/ml) of protein hydrolysates during fermentation of mixture of seafood by-products	45
9. Halophilic bacteria of protein hydrolysates during fermentation of mixture of seafood by-products	46
10. Browning intensity of pasteurized seasoning SPH during storage at 28, 35, and 45 °C	52
11. L*, a* and b* values of pasteurized seasoning SPH during storage at 28, 35, and 45 °C	54
12. Figure 12. Total phenolic content (mg of gallic acid) in liquid phase (a), solid phase (b) of pasteurized seasoning SPH during storage at 28, 35, and 45 °C.....	57

LIST OF FIGURES (CONTINUES)

Figure		Page
13.	Reducing power in liquid phase (a) and solid phase (b) of pasteurized seasoning SPH during storage at 28, 35, and 45 °C.....	60
14.	DPPH radical scavenging activity in liquid phase (a) and solid phase (b) of pasteurized seasoning SPH during storage at 28, 35, and 45 °C.....	61
15.	Sensory scores of pasteurized seasoning SPH during storage at 28, 35, and 45 °C	63

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

อาหารทะเลแช่เยือกแข็งเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศไทย แต่ในกระบวนการผลิตก่อให้เกิดวัสดุเศษเหลือทิ้งที่เป็นของเหลว และของแข็ง มากถึงร้อยละ 50 ของน้ำหนักปลาเริ่มต้น (Wang and Hwang, 2001) ซึ่งวัสดุเศษเหลือเหล่านี้จะก่อให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมหากไม่มีการบำบัดที่ถูกต้อง ในขณะที่การบำบัดเศษเหลือทิ้งดังกล่าวมีค่าใช้จ่ายที่นำไปสู่การเพิ่มต้นทุนการผลิต เนื่องจากวัสดุเศษเหลือดังกล่าวประกอบด้วยโปรตีน และสารอาหารอื่นๆที่มีศักยภาพในการใช้ประโยชน์ ดังนั้นการนำวัสดุเศษเหลือมาใช้ให้เกิดประโยชน์จึงเป็นแนวความคิดที่หลายหน่วยงานให้ความสนใจ เพราะนอกจากจะช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อม แล้วยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบ และลดต้นทุนการผลิตลง

บวคเป็นอาหารที่คนไทยรู้จักกันดี และยังแพร่หลายในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในปัจจุบันมีการพัฒนากระบวนการผลิต และผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องปรุงรสชนิดหนึ่งซึ่งมีจำหน่ายทั้งในประเทศและต่างประเทศ แม้ว่าจะยังไม่มีกรจำแนกตัวเลขการส่งออกผลิตภัณฑ์เครื่องปรุงรสที่ได้จากบวค แต่จากแนวโน้มการส่งออกเครื่องปรุงรสโดยรวมพบว่าปริมาณการส่งออกเครื่องปรุงรสในปี พ.ศ. 2551 เท่ากับ 177,128.14 ตัน คิดเป็นมูลค่า 9,846.76 ล้านบาท ซึ่งขยายตัวจากปี พ.ศ. 2550 เพิ่มขึ้นร้อยละ 21.62 ประกอบกับมีแนวโน้มการขยายตัวเพิ่มขึ้นทุกปีจนถึงปัจจุบัน (กรมโรงงาน, 2551)

ดังนั้นจึงมีแนวความคิดที่จะนำวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปอาหารทะเลแช่เยือกแข็งมาแปรรูปโปรตีนไฮโดรไลเสทและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บวคปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์พร้อมบริโภค เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเศษเหลือ อีกทั้งเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบใหม่

การตรวจเอกสาร

1. วัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ

ผลจากการสำรวจวัสดุเศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล โดย Prasertsan และคณะ (1988) พบว่าวัสดุเศษเหลือสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ

1.1 วัสดุเศษเหลือที่เป็นของแข็ง

วัสดุเศษเหลือที่เป็นของแข็ง ได้แก่ เศษกระดูก หัว และหนังปลา มีปริมาณร้อยละ 25-30 ของวัตถุดิบ ดังนั้นโรงงานที่มีกำลังการผลิต 35-40 ตันต่อวัน จะมีวัสดุเศษเหลือประเภทนี้ประมาณ 12 ตัน ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้ประโยชน์โดยนำไปขายรวมกันให้กับโรงงานปลาป่น

1.2 วัสดุเศษเหลือที่เป็นของเหลว

วัสดุเศษเหลือที่เป็นของเหลว เช่น น้ำเลือดปลา กิดเป็นปริมาณร้อยละ 7 หรือน้ำนึ่งปลาทูล่าปริมาณร้อยละ 10-14 ของน้ำหนักรวมวัตถุดิบ ซึ่งพบว่าประกอบด้วยสารประกอบอินทรีย์ที่สำคัญ เช่น โปรตีน ไขมัน เอนไซม์ และวิตามินหลายชนิด

2. การผลิตภัณฑ์โปรตีนจากปลาและวัสดุเศษเหลือจากปลา

สำหรับวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำสามารถใช้แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.1 ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก มีลักษณะเป็นของเหลวที่ได้จากการหมักปลาหรือวัสดุเศษเหลือจากปลา ด้วยเอนไซม์ตามธรรมชาติภายใต้สภาวะที่เป็นกรด อาจเติมกรดฟอร์มิกหรือกรดโปโรปีโอนิกลงไปโดยตรง หรือการหมักโดยใช้แบคทีเรียแลคติกทำให้ได้กรดแลคติกที่สามารถหลีกเลี่ยงการเน่าเสียจากจุลินทรีย์ได้ (Hall and Ahmad, 1992) การหมักปลามีกระบวนการผลิตคล้ายกับการผลิตน้ำปลาแต่ในกระบวนการผลิตปลาหมักจะไม่มีกรดเติมเกลือ ในกระบวนการย่อยสลายตัวเองของการผลิตปลาหมักจะเกิดขึ้นเร็วกว่าการผลิตน้ำปลาซึ่งของเหลวที่ได้จากหมักปลาจะมีรสขมจึงไม่เหมาะสำหรับการนำไปให้มนุษย์บริโภค (Gildberg, 1993)

2.2 โปรตีนปลาเข้มข้น

โปรตีนปลาเข้มข้น เป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับการบริโภคผลิตโดยการสกัดโปรตีนออกจากตัวปลาแล้วกำจัดไขมัน และสารที่ละลายได้ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น

แอลกอฮอล์ เฮกเซน หรือไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ ที่อุณหภูมิ 50-75 องศาเซลเซียส 2-3 ครั้ง ก่อนนำไปประเหยเอาส่วนน้ำและสารละลายสกัดที่ตกค้างออกทำให้ได้โปรตีนที่เข้มข้น นำไปทำให้แห้งแล้วบดเป็นผงละเอียดทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง (Gildberg and Thongthai, 2001)

2.3 โปรตีนไฮโดรไลเสท

โปรตีนไฮโดรไลเสท ได้จากย่อยโปรตีนโดยใช้กรด ค่าง หรือเอนไซม์ ซึ่งน้ำปลาเป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสทชนิดหนึ่งที่เตรียมได้จากการหมักปลากับเกลือ การย่อยโปรตีนในตู้ปลาในระหว่างการหมักเป็นผลจากกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนส และเอนไซม์จากแบคทีเรียกลุ่มที่ชอบเกลือ (halophilic bacteria) (Gildberg and Thongthai, 2001)

3. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทโดยทั่วไปมี 3 วิธี ได้แก่

3.1 การย่อยตามธรรมชาติ เป็นกระบวนการย่อยตัวเอง (autolysis) ของเอนไซม์ที่อยู่ในลำไส้ปลา และเอนไซม์ในกล้ามเนื้อปลา (พูนสุข ประเสริฐสรรพ, 2542) รวมทั้งเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่ติดมากับวัตถุดิบ

3.2 การย่อยด้วยสารเคมี เป็นการย่อยด้วยกรดและค่าง (Jaswal, 1990) ที่มีข้อจำกัดสำคัญคือไม่สามารถกำหนดอัตราการย่อยหรือการสลายพันธะได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ค่างหรือกรดอาจทำลายกรดอะมิโนที่จำเป็นบางชนิด เช่น ทริปโตเฟน ซีสเทอีน ซีสตีลีน ซีรีน และทรีโอนีน รวมทั้งมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาเรซิไมเซชัน (racemization) ที่เปลี่ยนกรดอะมิโนจาก L-form เป็น D-form ซึ่งร่างกายมนุษย์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ที่เป็นสาเหตุให้คุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนลดลง (Hall and Ahmad, 1992)

3.3 การย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสทางการค้า ซึ่งการใช้เอนไซม์ในการย่อยโปรตีนในกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทมีความจำเพาะสูงและเกิดปฏิกิริยาไม่รุนแรง รวมทั้งสามารถทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิและพีเอชปานกลาง ทำให้สามารถกำหนดระดับการย่อยและขนาดของเปปไทด์ที่เกิดขึ้นได้ ดังนั้นการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยวิธีนี้จึงได้รับความนิยมมากกว่าการย่อยด้วยสารเคมี โดยวัตถุดิบที่ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทมีทั้งจากพืชและสัตว์ แต่นิยมใช้วัตถุดิบจากสัตว์มากกว่าเนื่องจากมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายครบถ้วนและปริมาณมาก สำหรับสัตว์น้ำที่ใช้เป็นวัตถุดิบมีทั้งสัตว์น้ำทั้งตัว และวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิต เช่น

หัวปลา เครื่องในปลา น้ำเลือด น้ำนึ่งปลา กระดูกปลา หนังปลา และหัวกุ้ง เป็นต้น (Adler-Nessen, 1986)

Shin และคณะ (2003) ระบุว่า การนำวัสดุเศษเหลือของปลาโอ มาผลิตน้ำปลาทำให้ได้น้ำปลาที่มีโปรตีน 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนน้ำปลาที่ได้จากการหมักปลาทั้งตัวมีโปรตีน 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่น้ำปลาทั้งสองแบบมีชนิดของกรดอะมิโนที่จำเป็นเหมือนกัน และ Chaiyanan และคณะ (1988) รายงานการผลิตน้ำปลาจากหัวและไส้ของปลาทูน่าโดยเติมเชื้อ *P. halophilus*, *Micrococcus* sp. และแบคทีเรียกลุ่ม *Coryneform* ร้อยละ 10 ในการหมักร่วมกับการใช้ระบบหมุนเวียนน้ำหมักที่ได้กลับไปในถังหมัก เป็นเวลา 45 วัน ได้น้ำปลาที่มีสีน้ำตาลแดง มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 22.15 กรัมต่อลิตร และปริมาณไนโตรเจนจากกรดอะมิโน 13.83 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การหมักแบบธรรมดาโดยไม่เติมเชื้อมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 10.17 กรัมต่อลิตร และปริมาณไนโตรเจนจากกรดอะมิโน 4.05 กรัมต่อลิตร

จริยา ภูเจริญ (2542) หมักน้ำปลาจากวัสดุเศษเหลือปลาสีกุนทองตาโตที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส อัตราส่วนปลาต่อเกลือ 4 ต่อ 1 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) และเปลือกสับประคร้อยละ 10 เป็นเวลา 21 วัน พบว่าได้น้ำปลาที่มีค่าฟอรั่มลดีไฮด์ไต่เตรชั่น ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และปริมาณไนโตรเจนจากกรดอะมิโนเท่ากับ 8.02, 18.02, และ 6.97 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

4. ผลผลิตขั้นมูลและน้ำปลา

4.1 มูล

มูล หมายถึงผลผลิตขั้นที่ได้จากการหมักปลาทะเลกับเกลือในสัดส่วนที่เหมาะสมเป็นเวลา 3-12 เดือน กระทั่งได้ของเหลวข้นสีเทา (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, 2526) มูลเป็นที่รู้จักกันดี และนิยมใช้เป็นเครื่องปรุงรสเช่นเดียวกับน้ำปลา แต่มูลมีลักษณะขุ่นกว่าน้ำปลา เพราะจะมีส่วนของเนื้อปลาที่ยังย่อยไม่หมดผสมอยู่ด้วย อีกทั้งสีของน้ำมูลก็ต่างกับน้ำปลาที่มีสีน้ำตาลเข้ม มูลเป็นที่รู้จักและบริโภคกันมากโดยเฉพาะทางภาคใต้ของประเทศไทย และประเทศมาเลเซีย การบริโภคนิยมนำน้ำมูลมาผสมกับน้ำ ก่อนปรุงรสด้วยเครื่องปรุงรส เช่น น้ำตาลทราย น้ำตาลปีบ มะขามเปียก เติมเครื่องเทศและสมุนไพร เช่น กระเทียม ตะไคร้ ข่า ใบมะกรูด หอมแดง และส้มแขก นำไปเคี่ยวจนข้นเหนียว แล้วกรองเอากากออกเรียกว่า มูลปรุงรส

4.2 น้ำปลา

น้ำปลา หมายถึงผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวรสเค็ม ใช้ปรุงแต่งกลิ่นรสของอาหาร แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ดังนี้ (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 203), 2543)

4.2.1 น้ำปลาแท้ หมายถึง น้ำปลาที่ได้จากการหมัก หรือย่อยปลา ส่วนของปลา หรือกากของปลาที่เหลือจากการหมักน้ำปลา

4.2.2 น้ำปลาที่ทำจากสัตว์อื่น หมายถึง น้ำปลาที่ได้จากการหมักสัตว์อื่นที่ไม่ใช่ปลา และรวมถึงน้ำปลาที่ทำจากสัตว์อื่นที่มีน้ำปลาแท้ผสมอยู่ด้วย โดยเรียกว่า “น้ำปลาจาก” (ข้อความที่เว้นไว้ให้ระบุชนิดของสัตว์อื่นที่ทำน้ำปลา) หรือ “น้ำปลาจาก% ผสมกับน้ำปลาแท้.....%”

4.2.3 น้ำปลาผสม หมายถึง น้ำปลาตามข้อ (1) หรือ (2) โดยมีสิ่งอื่นที่ไม่เป็นอันตรายแก่ผู้บริโภคผสม หรือเจือปน หรือเพื่อปรุงแต่งกลิ่นรส

น้ำปลาเป็นเครื่องปรุงรสซึ่งได้รับความนิยมบริโภคกันแพร่หลายทั้งในประเทศไทย และประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น จีน มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ และ เวียดนาม เป็นต้น โดยมีชื่อเรียกต่างกันไป เช่น budu (มาเลเซีย), patis (ฟิลิปปินส์), nouc-mam (เวียดนาม), Shottsuru Uwo-shoyu และ Ika-shoyu (ญี่ปุ่น), Ketjap-ikan (อินโดนีเซีย), Jeot-kal (เกาหลี) และ Ngapi (พม่า) การผลิตบูดูและ/หรือ น้ำปลา หรือผลิตภัณฑ์ปลาหมักของประเทศต่างๆมีความแตกต่างกันดังแสดงใน Table 1

Table 1. Species of fish and production conditions of fermented fish hydrolysates in some countries

Country and name	Species	Conditions and time of fermentation
Japan		
Shottsuru	<i>Astrocopus japonicus</i> (sandfish)	5:1 (fish:salt) + malted rice
Uwo-shoyu	<i>Clupea pilchardus</i> (sardine)	and koji (3:1) (6 months)
Ika-shoyu	<i>Omnastrephis sloani</i> (squid) <i>Omnastrephis paeificus</i>	
Korea		
Jeot-kal	Various	4:1 (fish:salt) (6 months)
Vietnam		
Nuoc-mam	<i>Stolephorus</i> spp., <i>Ristrelliger</i> spp. <i>Engraulis</i> spp., <i>Decapterus</i> spp. <i>Dorosoma</i> spp., <i>Clupea</i> spp.	3:1-3:2 (fish:salt) (4-12 months)
Nuoc-mam-gau-ca	<i>Clarius</i> spp., <i>Ophicephalus</i> spp.	10:1 (Liver only:salt) (8 days then boiled)
Thailand		
Nampla	<i>Stolephorus</i> spp., <i>Ristrelliger</i> spp. <i>Cirrhinus</i> spp.	5:1 (fish:salt) (5-12 months)
Malaysia		
Budu	<i>Stolephorus</i> spp.	5:1-3:1 (fish:salt) +plam sugar +tamarind (3-12 months)
Bakasang	<i>Stolephorus</i> spp., <i>Sadinella</i> spp.	5:2 (fish:salt) (3-12 months)
Burma		
Ngapi	Various	5:1(fish:salt) (3-6 weeks)
Philippines		
Patis	<i>Stolephorus</i> spp., <i>Clupea</i> spp. <i>Decapterus</i> spp., <i>Leionathus</i> spp.	3:1-4:1 fish:salt (3-12 months)

Table 1. Species of fish and production conditions of fermented fish hydrolysates in some countries
(continued)

Country and name	Species	Conditions and time of fermentation
Indonesia		
Ketjap-ikan	<i>Stolephorus</i> spp., <i>Clupea</i> spp.	5:1 (fish:salt) (6 months)
	<i>Leionathus</i> spp., <i>Osteochilus</i> spp.	
	<i>Puntius</i> spp., <i>Ctenops</i> spp.	
India/Pakistan		
Colombo-cure	<i>Ristrelliger</i> spp., <i>Clupea</i> spp.	6:1 (Gutted fish:salt)
	<i>Cybium</i> spp.	+tamarind (12 months)
Hong Kong		
-	<i>Sardinella</i> spp., <i>Jelio</i> spp.	4:1 (fish:salt) (3-12 months)
	<i>Carangidae</i> spp., <i>Engraulis</i> spp.	
	<i>Teuthis</i> spp.	
Greece		
Garos	<i>Scomber colias</i>	9:1(Liver only:salt) (8 days)
France		
Pissala	<i>Aphys pellucida</i> , <i>Gobius</i> spp.	4:1 (fish:salt) (2-8 weeks)
	<i>Engraulis</i> spp., <i>Atherina</i> spp.	
	<i>Meletta</i> spp.	
Anchovy	<i>Engraulis encrasicolus</i>	2:1 (Beheaded/gutted:salt) (6-7 months)

ที่มา : Beddows (1998)

5. วัตถุดิบที่ใช้ผลิตบุดูและ/หรือน้ำปลา

5.1 ปลา

ปลา ปลาที่นิยมนำมาใช้เป็นวัตถุดิบที่สำคัญ คือ anchovy (*Stolephorus* spp), mackerel (*Ristrelliger* spp), และ herring (*Clupea* spp) ตามรายงานของ Wilaipan (1990) รายงานว่า ปลาที่นิยมใช้ทำบุดูหรือน้ำปลาของประเทศไทย แบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ ปลาน้ำจืด และปลาทะเล โดยปลาทะเลที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ ปลาไส้ตัน และปลากะตัก ซึ่งเป็นปลานขนาดเล็ก และปลาหลังเขียว ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า ส่วนปลาอื่นๆ เช่น ปลาทุ หรือปลาอินทรีย์ แม้สามารถนำมาทำน้ำปลาได้ แต่ไม่นิยมเนื่องจากมีราคาแพง และมีกลิ่นรสไม่ดี สำหรับปลาสร้อย และปลาชิว เป็นปลาน้ำจืดที่นิยมใช้ในการผลิตน้ำปลา โดยปลาแต่ละชนิดที่นำมาหมักบุดูและ/หรือน้ำปลาจะมีองค์ประกอบของโปรตีน แร่ธาตุ และวิตามินที่ต่างกันดัง Table 2 ซึ่งอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่มีคุณภาพต่างกัน

Table 2. Chemical composition of fish species used in budu and fish production

Chemical elements	Anchovy (<i>Stolephorus</i> spp.)	Mackerel (<i>Ristrelliger</i> spp.)	Herring (<i>Clupea</i> spp.)
Protein (g/100g)	18.0	20.0	20.2
Lipid (g/100g)	0.3	6.7	4.3
Moisture (g/100g)	80.5	72.0	74.4
Calcuim (mg/100g)	65.5	170	124
Potassium (mg/100g)	154	60	63
Fe (mg/100g)	1.7	11.9	2.0
Vitamine A (IU /100g)	139	138	195
Vitamine B ₁ (mg/100g)	0.02	0.03	0.12
Vitamine B ₂ (mg/100g)	0.04	0.62	0.05
Niacin (mg/100g)	0.6	9.2	3.00

ที่มา : ดัดแปลงจาก Wilaipan (1990); Tahvonon และคณะ (2000)

5.2 เกลื้อ

เกลื้อที่ผลิตในประเทศไทย แบ่งได้เป็น 2 ชนิด เกลื้อสมุทรหรือเกลื้อทะเล และเกลื้อดินเขาวัวโดยเกลื้อที่นิยมใช้หมักบวบ และน้ำปลา คือเกลื้อทะเล ซึ่งเกลื้อทะเลของไทยมีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 88.26 ± 2.79 ส่วนเกลื้อของประเทศอื่นๆมีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 97 (Wilaipan, 1990) ประเสริฐ สายสิทธิ์ (2524 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545) รายงานว่าลักษณะของเกลื้อที่ใช้มีความสำคัญต่อการหมักปลา ถ้าใช้เกลื้อที่มีเม็ดขนาดใหญ่เกินไปการละลายจะช้า ทำให้เกลื้อแพร่เข้าสู่ตัวปลาช้าซึ่งอาจทำให้ปลาน่าเสียได้ ในขณะที่เกลื้อเม็ดเล็กแม้จะละลายและแพร่เข้าสู่ตัวปลาได้เร็วตั้งแต่ในระยะแรกของการหมัก แต่อาจทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติและจับกันแน่นกระทั่งทำให้เกลื้อที่เหลือไม่สามารถแพร่เข้าสู่เนื้อปลาได้ต่อไป มัทนา แสงจินดาวงษ์ (2545) พบว่าเกลื้อมีสิ่งอื่นเป็นองค์ประกอบด้วยนอกเหนือจากโซเดียมคลอไรด์ เช่น ดิน ฟูนละออง ทราย และเกลื้อของสารประกอบอื่นๆ เช่น ซัลเฟตคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และคาร์บอนเนตคลอไรด์ เป็นต้น สารประกอบเหล่านี้ทำให้คุณภาพการหมักลดลง โดยแคลเซียม และแมกนีเซียมคลอไรด์ในเกลื้อจะดูดความชื้นได้ง่ายทำให้ความเข้มข้นของเกลื้อไม่พอเพียงต่อการป้องกันการเน่าเสียของวัตถุดิบ ทำให้เกิดออกซิเดชันของไขมันเนื่องจากมีโลหะหนักเจือปนอยู่ และทำให้เกิดกลิ่น หรือรสชาติที่ไม่พึงประสงค์

การเกิดกลิ่นรสต่างๆของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ยังเป็นผลจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่อยู่ในเกลื้อ (ดวงทิพย์ อรุณไพโรจน์ และ ไพโรจน์ หลวงพิทักษ์, 2539) จุลินทรีย์ที่พบในเกลื้อสมุทรส่วนใหญ่จะเป็นสกุล *Bacillus* ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* นอกนั้นเป็น *Micrococcus* sp., *Sarcina* sp. และ *Halobacterium* sp. ส่วนในเกลื้อดินเขาวัวพบจุลินทรีย์ *Micrococcus* sp., *Corynebacterium* และสกุล *Bacillus* ในปริมาณร้อยละ 70, 20 และ 4 ตามลำดับ (Bain et al., 1957) Suntainalerts (1979) ศึกษาชนิดแบคทีเรียจากเกลื้อสมุทรและเกลื้อดินเขาวัวจากแหล่งต่างๆในประเทศไทย พบว่าในเกลื้อสมุทรพบเชื้อแบคทีเรียกลุ่มของ *Halobacterium*, *Halococcus*, *Bacillus* และ *Coryneform* แต่ที่พบมากได้แก่ *Halobacterium* และ *Halococcus* บางแหล่งอาจพบเชื้อ *Micrococcus* และ *Staphylococcus* ส่วนในเกลื้อดินเขาวัวพบเชื้อ *Micrococcus*, *Bacillus* และ *Coryneform* โดย Amano (1962) รายงานว่าแบคทีเรียที่มีบทบาทในการผลิตผลิตภัณฑ์ปลาหมักส่วนใหญ่คือแบคทีเรียที่ติดมากับเกลื้อ เพราะส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ทนเกลือ หรือชอบเกลือ

5.2.1 บทบาทของเกลื้อที่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรีย

Frazier (1958 อ้างโดย อนันต์ บุญปาน, 2550) ได้สรุปบทบาทของเกลื้อที่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งทางตรงและทางอ้อมไว้ดังนี้

5.2.1.1 กลือทำให้เกิดแรงดันออสโมซิส (osmotic pressure) เป็นผลให้โปรโตพลาสซึมของเซลล์แบคทีเรียหดตัวจากการสูญเสียน้ำ (plasmolysis) ทำให้เซลล์แบคทีเรียได้รับอันตรายถึงตายหรืออาจทำให้การเจริญหยุดชะงักลง

5.2.1.2 กลือจะเป็นตัวดึงความชื้นออกจากอาหาร เป็นการควบคุมปริมาณน้ำอิสระ (available water, a_w) ทำให้เกิดสภาวะที่จำกัดการเจริญ และส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด

5.2.1.3 เมื่อกลือเกิดการแตกตัวจะเกิดเป็นไอออนของ Na^+ และ Cl^- ซึ่งจะเป็นอันตรายต่อเชื้อแบคทีเรียที่อ่อนไหว (sensitive) ต่อไอออนชนิดนั้นๆ โดย Na^+ จะทำปฏิกิริยากับ protoplasmic anion ของเซลล์ทำให้เชื้อแบคทีเรียตายได้ ส่วน Cl^- จะไปรวมตัวกับสารที่มีหมู่ sulhydryl (-SH) ทำให้สารนั้นไม่สามารถเคลื่อนย้ายหมู่ acyl ได้

5.2.1.4 กลือจะขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่จะมาย่อยโปรตีนและทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง

5.2.1.5 กลือมีผลทำให้เซลล์อ่อนไหว (sensitive) ต่อคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์

5.2.1.6 กลือจะทำให้การละลายของออกซิเจนในอาหารลดลง ทำให้เกิดสภาพที่ค่อนข้างจะเป็น anaerobe นอกจากนี้กลือยังทำให้การเจริญและรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียพวกชอบเกลือ (halophile) เปลี่ยนไป

6. กรรมวิธีการผลิตบูดู

การผลิตบูดูมี 3 วิธี แต่ละวิธีแม้จะมีความแตกต่างกันเล็กน้อยแต่ทำให้ได้บูดูที่แตกต่างกันในด้านกลิ่น รส แม้จะใช้ปลาชนิดเดียวกัน (Cole, 1963; Rao, 1967)

วิธีที่ 1 ล้างปลาให้สะอาดคลุกเคล้ากับเกลือในอัตราส่วนปลาต่อเกลือเท่ากับ 5 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก ให้เข้ากันดี นำไปบรรจุในโถงดินที่มีเนื้อมะขามบดละเอียดที่ละลายด้วยน้ำเล็กน้อยอยู่ก่อนแล้ว แต่ Rao (1967) รายงานว่า การผลิตบูดูของมาเลเซียไม่มีการเติมเนื้อมะขาม แต่ใช้วิธีอัดปลาให้แน่นเพื่อไล่อากาศออกแล้วราดด้วยน้ำตาลปีบ แล้วปิดฝาโถงให้แน่นเพื่อไม่ให้อากาศเข้าไป เก็บโถงไว้ในที่เย็นประมาณ 6 สัปดาห์ ก็สามารถนำมาบริโภคได้ ผลิตรักษ์ที่ได้จากการหมักมีลักษณะเป็นของเหลวข้น มีสีน้ำตาล กลิ่นหอม หวานและเค็ม นำบูดูชนิดนี้สามารถเก็บไว้บริโภคได้นาน 2 ปี

วิธีที่ 2 เป็นวิธีที่นิยม โดยใช้ปลาที่ล้างสะอาดแล้วผสมกับเกลือในอัตราส่วนปลาต่อเกลือเท่ากับ 3 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก บรรจุส่วนผสมนี้ลงไปในโถงดิน อัดปลาให้แน่นเพื่อไล่อากาศออก

แล้วหมักไว้ในที่ร่มนานประมาณ 40 วัน ทำให้ได้มูลที่มีลักษณะคล้ายน้ำมูลชนิดแรกแต่รสชาติดีน้อยกว่า ถ้าปิดฝาโถ่งให้แน่นสามารถเก็บไว้บริโภคได้นาน 1 ปี

วิธีที่ 3 ใช้วิธีการทำแบบเดียวกับวิธีที่ 2 แต่วางโถ่งไว้กลางแจ้งหรือใช้ไม้กวนทุกวัน หมักทิ้งไว้จนกระทั่งเนื้อปลาเปลี่ยนเป็นของเหลวข้น น้ำมูลชนิดนี้มีกลิ่นรสคล้ายน้ำปลามาก

สำหรับกระบวนการหมักมูลในประเทศไทยนั้น มาลี อมรทิพย์รัตน์ (2522) กล่าวว่า เริ่มจากนำปลาทั้งตัวมาล้างน้ำโดยไม่ต้องควักเครื่องในออก คลุกเคล้ากับเกลือสมุทรเม็ดใหญ่ให้อัตราส่วนระหว่างปลาและเกลือเท่ากับ 3 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก โดยแบ่งเกลือส่วนหนึ่งประมาณ 1 ใน 10 ส่วนเพื่อนำมาคลุกผิวหน้าปลาหลังจากคลุกกับเกลือแล้ว อัดปลาให้แน่นเพื่อให้อากาศออก ปริมาณบรรจุเพียง 8 ใน 10 ส่วนของโถ่งที่ใช้หมัก แล้วใช้ไม้ไผ่สานกดทับด้านบนหรือคลุมด้วยพลาสติกป้องกันไม่ให้ปลาลอยเหนือน้ำหมักปลา อาจตากแดดหรือไว้ในที่ร่มประมาณ 3 – 12 เดือน จะได้น้ำมูล เป็นของเหลวข้นสีเทา กลิ่นหอมคาวปลา น้ำหมักปลาด้านบนจะเป็นสีน้ำตาลใส

7. องค์ประกอบทางเคมีของมูล

คณั ลิมปคณั (2511 อ้างโดย นางลักษณะ เกียรติตันสกุล, 2541) รายงานว่าคุณค่าทางโภชนาการของน้ำมูล 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วยโปรตีน 9.17-11.01 กรัม ปริมาณค่าที่ระเหยได้ 121.87-197.37 มิลลิกรัม ปริมาณกรดที่ระเหยได้ 176.7-191.3 มิลลิกรัม และมีความเข้มข้นของเกลือในช่วงร้อยละ 18.88-26.84 ในขณะที่ กองโภชนาการ กรมอนามัย (2530) รายงานว่าน้ำมูล 100 มิลลิลิตร มีปริมาณความชื้น 71.1 กรัม ปริมาณไขมัน 0.4 กรัม คาร์โบไฮเดรต 0.5 กรัม ปริมาณโปรตีน 4.6 กรัม แคลเซียม 42 มิลลิกรัม โปแตสเซียม 31 มิลลิกรัม เหล็ก 4.3 มิลลิกรัม วิตามินบีหนึ่งเล็กน้อย วิตามินบีสอง 0.17 มิลลิกรัม และได้พลังงานจากการบริโภค 24 แคลลอรี่ต่อ 100 กรัม ส่วน Park และคณะ (2001) รายงานว่าองค์ประกอบเคมีและคุณลักษณะของน้ำปลาที่ผลิตจากประเทศต่างๆแตกต่างกัน (Table 3 และ 4) โดยหากใช้ปริมาณ creatine และ creatinine ซึ่งเป็นพลังงานหลักของกล้ามเนื้อในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังกำหนดคุณภาพสามารถจำแนกน้ำปลาออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีคุณภาพสูง ได้แก่ น้ำปลาจากประเทศไทย เวียดนาม และญี่ปุ่น กลุ่มคุณภาพเป็นที่สอง ได้แก่ น้ำปลาจากประเทศจีน และเกาหลีใต้ และกลุ่มที่มีคุณภาพต่ำ ได้แก่ น้ำปลาจากประเทศพม่า และลาว

Table 3. Chemical characteristics of fish sauces from seven countries of Southeast and East Asia

	High Quality			Middle quality		Low quality		Mean±S.D (n = 61)
	Thailand	Vietnam	Japan	China	South Korea	Myanmar	Laos	
	(n = 10)	(n = 20)	(n = 11)	(n = 2)	(n = 9)	(n = 7)	(n = 2)	
pH	5.63 ± 0.17	5.75±0.26	5.54 ± 0.42	6.15 ± 0.38	5.49 ± 0.45	6.23 ± 0.91	4.90 ± 0.11	5.70 ± 0.50
NaCl ¹	21.4 ± 1.2	20.2 ± 1.1	18.0 ± 4.5	22.0 ± 1.1	22.2 ± 1.5	22.7 ± 1.9	15.7 ± 1.9	20.5 ± 2.8
Moisture ¹	63.7 ± 1.9	61.4 ± 2.8	69.2 ± 5.3	66.0 ± 4.1	67.4 ± 1.9	70.0 ± 4.0	79.2 ± 0.4	65.8 ± 5.3
Total nitrogen ¹	1.68 ± 0.24	2.59±0.51	1.80 ± 0.31	1.49±0.44	1.27 ± 0.20	0.97 ± 0.75	0.35 ± 0.08	1.79 ± 0.77
Nitrogen recovery (%)	64.3 ± 5.5	61.6±13.2	70.4 ± 9.9	57.8±17.7	68.2 ± 5.0	45.6 ± 9.8	42.5 ± 6.6	61.8 ± 12.8

¹Values are expressed in g/100 mL for NaCl, moisture, and Total nitrogen contents.

ที่มา : คัดแปลงจาก Park และคณะ (2001)

Table 4. Creatine and creatinine contents in fish sauces (mg/100ml)

	High Quality			Middle quality		Low quality		Mean±S.D. (n = 61)
	Thailand	Vietnam	Japan	China	South Korea	Myanmar	Laos	
	(n = 10)	(n = 20)	(n = 11)	(n = 2)	(n = 9)	(n = 7)	(n = 2)	
Creatine	147±35	181±58	164±49	67±41	79±26	13±7	13±3	127±74
Creatinine	85±18	94±35	88±34	40±27	57±19	19±9	22±18	73±38
Total	230±52	275±87	251±77	107±69	136±44	32±15	35±16	199±108

ที่มา : คัดแปลงจาก Park และคณะ (2001)

8. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพระหว่างกระบวนการผลิตบุงูและ/หรือน้ำปลา

8.1 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

ในระยะ 7 วันแรกของการหมัก เนื้อปลาจะแข็งและเหนียวขึ้น เนื่องจากของเหลวที่มีอยู่ในตัวปลาประมาณร้อยละ 80 จะค่อยๆ แพร่ออกมาข้างนอกเนื่องจากกระบวนการออสโมซิส ขณะเดียวกันเกลือจะแพร่เข้าไปในตัวปลา ส่งผลให้นอกจากเนื้อปลาจะหดตัว แข็งและมีความเค็ม สีของปลาซีดลง มีกลิ่นคาวปลามาก โดยกลิ่นคาวนี้อาจเกิดจากจุลินทรีย์ที่ติดมากับเกลือที่ใช้หมัก น้ำปลานั้นคือ *Sarcina littoralis* และ *Pseudomonas* จะสร้างเอนไซม์ Cystein desulphhydrase ที่ย่อยสลายโปรตีนให้เป็นสารอินโดลและไฮโดรเจนซัลไฟด์ เนื้อปลาในช่วงนี้มีสีเหลือง มีไขมันปลาสีเหลืองเข้มลอยที่บริเวณผิวน้ำด้วย (กฤษฎดา สมิตะสิริ, 2529)

ในระยะการหมักนาน 15-60 วัน ปริมาณเกลือในของเหลวมีค่าประมาณร้อยละ 20 เนื้อปลามีลักษณะนิ่มลงแต่ยังคงเป็นตัวปลา การย่อยโปรตีนเกิดขึ้น โดยเอนไซม์จากเครื่องในของปลา เช่น ทริปซิน (trypsin) คาเทปซิน (cathepsin) เปปซิน (pepsin) และอีเรปซิน (erepsin) เป็นต้น และเอนไซม์จากแบคทีเรียร่วมกันย่อยให้เนื้อปลานิ่มลง (Saisithi *et al.*, 1966) สีของเนื้อปลาซีดเมื่อกวนน้ำหมักปลาจะข้นกว่าในระยะแรก ไขมันของปลาเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลและลอยอยู่บนผิวน้ำมากขึ้น (Saisithi, 1987)

ในระยะการหมักนาน 3-4 เดือน ปริมาณเกลือในของเหลวมีความเข้มข้นประมาณอยู่ร้อยละ 24-29 เนื้อปลาเริ่มเปื่อยยุ่ย และหลุดออกจากก้างปลากลายเป็นของเหลวข้นสีเทาอมแดง กลิ่นคาวปลาจะหายไปเพราะความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้นทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดกลิ่นคาวที่กล่าวข้างต้นไม่สามารถเจริญอยู่ได้ แต่มีกลิ่นคาวน้ำปลาเกิดขึ้นแทน ของเหลวที่ได้จากการหมักในระยะนี้สามารถนำมาบริโภคได้ (พงศ์เทพ เกิดเนตร, 2533)

ในระยะการหมักนาน 8-12 เดือน ปริมาณเกลืออยู่ที่ช่วงร้อยละ 26-29 เป็นบุงูที่มีคุณภาพดี มีกลิ่นหอมกว่าบุงูที่หมักนาน 3-4 เดือน เนื้อปลาจะเปื่อยมากขึ้น น้ำหมักปลาจะมีสีน้ำตาลเข้มและใสขึ้น

8.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมี

กิจกรรมของเอนไซม์จากตัวปลา และแบคทีเรียที่เจริญในระหว่างการหมักจะย่อยโปรตีนในเนื้อปลากลายเป็นเปปไทด์ ก่อนถูกย่อยต่อกระทั่งกลายเป็นเอมีน กรดอะมิโน แอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณไนโตรเจนของกรดอะมิโน ค่าฟอร์มอลไนโตรเจน และค่าแอมโมเนียไนโตรเจน จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามเวลาการหมัก

Tungkawachara และคณะ (2003) แบ่งระยะเวลาในการย่อยโปรตีน และการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนโตรเจนในระหว่างการหมักปลาเป็น 3 ระยะคือ

1.ระยะ 25 วันแรก เกลือจะดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อของปลาเนื่องจากกระบวนการออสโมซิส

2.ระยะ 80-120 วันของการหมักเป็นช่วงของการย่อยโปรตีนในกล้ามเนื้อปลา ทำให้ได้ของเหลวที่มีปริมาณโปรตีนสูง ซึ่งโดยปกติเนื้อปลาจะถูกย่อยสลายหมดภายใน 120-140 วัน

3.ระยะที่สาม ระหว่าง 140-200 วันเป็นช่วงที่ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ละลายได้มีปริมาณเพิ่มขึ้น (Beddows *et al.*, 1979; พันธุ์รงค์ จันทรแสงศรี, 2547)

8.3 การเกิดสี กลิ่นรสของบูกูและหรือน้ำปลา

การเกิดสีน้ำตาลในผลิตภัณฑ์ปลาหมักเกิดขึ้นได้ 2 วิธี ได้แก่ ปฏิกริยาระหว่างน้ำตาลกับสารประกอบอะมิโน และปฏิกริยาระหว่างไขมันกับสารประกอบอะมิโนซึ่งจะเปลี่ยนสีของของเหลวจากสีเหลืองหรือน้ำตาลอ่อนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งความเข้มของสีจะเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับอุณหภูมิของการหมักและปริมาณออกซิเจน แต่แสงจะไม่มีผลทำให้สีเข้มขึ้น (สิทธิพันธุ์ไชยนันท์, 2522) น้ำตาลเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล โดยน้ำตาลที่พบในปลาที่ตายใหม่ๆคือ น้ำตาลไรโบส และไรโบฟอสเฟต (ribophosphate) ที่ได้จากการย่อยกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid) จากการศึกษาในระบบจำลองพบว่า ความเข้มของสีน้ำตาลเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับปริมาณสารประกอบอินทรีย์ฟอสเฟต ทอรีน (taurine) และกรดอะมิโน ในขณะที่เกลือโซเดียมคลอไรด์เป็นปฏิกิริยาผกผันกับความเข้มของสีน้ำตาล โดยถ้าปริมาณเกลือสูงจะทำให้ความเข้มของสีน้ำตาลลดลง (ประเสริฐ สายสิทธิ์, 2511 อ้างโดย นงลักษณ์ เกียรติตันสกุล, 2541) และพบว่า การหมักโดยใช้ถังแบบให้อากาศ จะมีสีที่เข้มกว่าการใช้ถังหมักธรรมชาติ ทั้งนี้อาจเป็นผลจากปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้นไปเร่งปฏิกิริยา oxidation ของไขมันกับ amino group หรือปฏิกิริยาสีน้ำตาลของ amine ที่ได้จากปฏิกิริยาย่อยโปรตีน (Saisithi, 1987)

การย่อยไขมันในตัวปลาหลังถูกย่อยโดยเอนไซม์ไลเปสจากตัวปลาและจุลินทรีย์ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งนำไปสู่การสะสมของกรดไขมันชนิดที่ระเหยได้ แต่เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสทำงานได้ดีกว่าเอนไซม์ไลเปส กลิ่นและรสจากการย่อยโปรตีนจึงเด่นกว่ากลิ่นรสจากการย่อยไขมัน Dougan และ Howard (1975) ได้แบ่งกลิ่นของปลาหมักเกลือเป็น 3 กลุ่มได้แก่

1. กลิ่นคล้ายแอมโมเนีย เกิดจากแอมโมเนีย และ ไตรเมทิลลามีน

2. กลิ่นคล้ายเนย เกิดจากกรดไขมันที่ระเหยได้ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำประกอบด้วย กรดอะซิติกและ n-butyric acid เป็นส่วนใหญ่

3. กลิ่นคล้ายเนื้อ เกิดจากสารประกอบที่ระเหยได้ในกลุ่มของสารประกอบคีโตน กรดคีโต และกรดอะมิโน โดยเฉพาะ glutamic acid

Greig และ Estrella (1988) พบว่าน้ำปลาที่ได้จากการหมักปลาทั้งตัว มีกลิ่นรสที่ดีกว่าน้ำปลาที่หมักกับปลาที่ควักไส้ออก และการเพิ่มขึ้นของความแรงของกลิ่นรสมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ทั้งกลุ่มของกรดไขมันที่ระเหยได้ เช่น formic acid, acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid และ valeric acid อีกทั้งกลุ่มของด่างที่ระเหยได้ เช่น แอมโมเนีย เอมีนชนิดต่าง ๆ และสารประกอบไนโตรเจน (basic nitrogenous compound) (Saisithi *et al.*, 1966; Dougan and Howard, 1975; McIver *et al.*, 1982) ส่วน Sanceda และคณะ (1992) พบว่าการหมักปลาในสภาพที่มีอากาศจะทำให้ได้น้ำปลาที่มีกรดที่ระเหยได้สูงกว่าน้ำปลาที่ได้จากการหมักแบบไม่มีอากาศ และจะมีกลิ่นกรด กลิ่นเนย กลิ่นหืน และกลิ่นฉุน (pungent) สูงกว่าน้ำปลาที่ได้จากการหมักแบบไม่มีอากาศ ส่วนปราณิสซา เชื้อโพรซิหัก และคณะ (2541) ได้นำปลาไส้ตันมาผสมกับเกลือในอัตราส่วน 3:1 แล้วแบ่งออกเป็น 2 ส่วน แต่ละส่วนแบ่งเป็น 3 ถัง ส่วนที่หนึ่ง หมักแบบธรรมชาติ และส่วนที่สอง ติดตั้งเครื่องกวนทั้ง 3 ถัง เปิดเครื่องกวนวันละ 8 ชั่วโมง เว้นวันเสาร์และอาทิตย์ พบว่าหลังจากหมักเป็นเวลา 6 เดือน ผลการทดสอบด้านประสาทสัมผัสของน้ำปลาที่ได้จากการหมักแบบธรรมชาติและเติมอากาศไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อหมักนาน 1 ปี พบว่าการหมักแบบธรรมชาติได้รับคะแนนการยอมรับสูงกว่าแบบเติมอากาศ ($P \leq 0.05$) ดังนั้นหากต้องการหมักแบบเติมอากาศ ควรใช้ระยะเวลาในการหมักไม่เกิน 6 เดือน

การเติมไลซีนร้อยละ 0.5, 1, 2 และ 3 ในการผลิตน้ำปลา พบว่านอกจากทำให้ปริมาณโปรตีนในน้ำปลาเพิ่มขึ้นแล้ว การเติมไลซีนร้อยละ 2 ยังทำให้น้ำปลาได้รับการยอมรับทางประสาทสัมผัสเพิ่มขึ้น แต่การเติมในระดับสูงมีผลทำให้น้ำปลามีรสหวานและสีเข้มกว่าน้ำปลาที่ไม่ได้เติมไลซีนจึงทำให้การยอมรับทางด้านรสชาติและสีลดลงแต่ไม่มีผลต่อการยอมรับทางด้านกลิ่น (Sanceda *et al.*, 1990)

9. เชื้อจุลินทรีย์ที่พบในการหมักน้ำปลาหรือน้ำบูดู

จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในตัวปลา อาจติดมากับตัวปลา เกลือ วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการหมัก โดยเชื้อที่ปนเปื้อนนี้มีทั้งชนิดที่ชอบเกลือ และไม่ชอบเกลือ แบคทีเรีย

ที่ไม่ชอบเกลือ เมื่อสัมผัสกับเกลือจะตายไปอย่างรวดเร็วเพราะเกลือทำให้เกิดแรงดันออสโมซิส (osmotic pressure) เป็นผลให้โปรโตพลาสซึมของเซลล์แบคทีเรียหดตัวเนื่องจากการสูญเสียน้ำ (plasmolysis) ทำให้เซลล์แบคทีเรียได้รับอันตรายถึงตายหรืออาจทำให้การเจริญหยุดชะงักลง ในขณะที่แบคทีเรียที่ชอบเกลือจะเจริญขึ้นอย่างรวดเร็ว การเติบโตของแบคทีเรียจะสูงสุดในระยะแรกๆของการหมัก ซึ่งเพียงพอที่จะทำให้โปรตีนและไขมันในเนื้อปลาเกิดการเปลี่ยนแปลง และเมื่อแบคทีเรียตายยังคงมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยเนื้อปลาต่อไปได้

กลุ่มแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการหมักน้ำบูดูแบ่งออกได้เป็น 3 พวกคือ (พงษ์เทพ เกิดเนตร, 2533)

9.1 แบคทีเรียที่ย่อยโปรตีน เป็นกลุ่มที่สามารถสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยโปรตีน ได้แก่ *Bacillus* spp. และ *Micrococcus* spp.

9.2 แบคทีเรียชนิดที่ย่อยไขมัน มีหลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสย่อยไขมันและน้ำมันให้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล ซึ่งการย่อยอาจเป็นแบบไฮโดรไลซิสหรือออกซิเดชัน ได้แก่ *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. และ *Achromobacter* spp.

9.3 แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญมาก เช่น *Lactobacillus* spp. และ *Pediococcus* spp. เนื่องจากกรดแลคติกที่สร้างขึ้นจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์อื่นๆเจริญไม่ได้หรือตายไป

มาลี อมรทิพย์รัตน์ (2522) รายงานชนิดของแบคทีเรียที่พบในระหว่างการหมัก บูดประกอบด้วยแบคทีเรียชนิดแกรมบวกได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus* spp. และ *Sarcina* spp. ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียชนิดรูปท่อนแกรมบวกและสร้างสปอร์ได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus tetraosporos* ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียชนิดแกรมบวกและไม่สร้างสปอร์คือ *coryneform* ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแบคทีเรียชนิดรูปท่อนแกรมลบคือ *Proteus* spp. มีปริมาณเล็กน้อย

Saisithi (1966) พบเชื้อ *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp. และแบคทีเรียกลุ่ม *Coryneform* ในน้ำปลา และจากเกลือทะเล ที่ใช้หมักน้ำปลา โดยพบเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด 27×10^4 cfu ต่อกรัม Bain และคณะ(1957) รายงานว่าเชื้อทั้งหมดที่พบเป็นชนิด halophilic เช่น *Halobacterium* spp. และ *Halococcus* spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือที่มักพบเสมอในตัวอย่างน้ำปลา เพราะในน้ำปลามีความเข้มข้นของเกลือสูงอยู่ที่ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเป็นกรดค้างอยู่ที่ช่วง 6.5-7.5 โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้มีบทบาทจนถึงเดือนที่ 9 ของการหมัก

10. ปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction)

10.1 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด

ปฏิกิริยาเมลลาร์ดเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอนิลของโมเลกุลน้ำตาลหรือไขมันกับสารประกอบอะมิโนเกิดเป็นไกลโคซิลเอมีน (N-substituted glycosylamine) และเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องจนได้สารสีน้ำตาลที่มีผลเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลโปรตีน และนำไปสู่การเปลี่ยนสมบัติทางหน้าที่และทางกายภาพของอาหารได้ จึงมีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของอาหาร (นิธิยารัตนาปนนท์, 2545; Labuza and Baisier, 1992; Van Boekel, 1998) ปฏิกิริยาเมลลาร์ดประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้ (Van Boekel, 1998; นธิยารัตนาปนนท์, 2545)

10.1.1 ระยะเริ่มต้น (early stage) กรดอะมิโนไลซีนและน้ำตาลทำปฏิกิริยากันเกิด Schiff's base กับหมู่อะมิโนของไลซีนและเปลี่ยนเป็น Amadori products หรือ lactulosyllysine โดยปฏิกิริยา Amadori rearrangement และน้ำตาลอัลโดสเปลี่ยนรูปเป็นน้ำตาลคีโตส ในขั้นตอนนี้ไลซีนสูญเสียสภาพไปจากเดิม ในระยะนี้สีและกลิ่นรสของอาหารเปลี่ยนแปลงน้อยมาก

10.1.2 ระยะก้าวหน้า (advanced stage) ในระยะนี้ Amadori products แตกตัวเป็น enol form ของสารประกอบ Amadori และเกิดผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น hydroxymethylfurfural (HMF), furfurals และ pyrrole ซึ่งเกิดในสภาวะที่ pH ต่ำกว่า 7 ส่วนในสภาวะที่ pH มากกว่า 7 จะเกิดสารประกอบเหล่านี้คือ 4-deoxyaminoreductone และ 5,6-dihydro-3-hydroxypyridone และในสภาวะที่ pH ประมาณ 7 เกิดสาร β -pyranone, 3-furanone, cyclopentenone และ galactosylisomaltol ซึ่งสภาวะนี้มีโอกาสเกิดมากในนํ้านม ผลิตภัณฑ์ต่างๆที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดในขั้นนี้เรียกว่า advanced glycation end products (AGEs)

10.1.3 ระยะสุดท้าย (final stage) ในระยะนี้ จะเกิดสารสีน้ำตาลคือเมลานอยดินส์ (Melanoidins) จากสาร AGEs นอกจากสารสีน้ำตาลเมลานอยดินส์ที่เป็นสารประกอบไนโตรเจนแล้ว ยังเกิดสารสีน้ำตาลจากการสลายตัวของน้ำตาล (sugar degradation) และในขั้นตอนนี้สุดท้ายของปฏิกิริยาเมลลาร์ดนี้ พบว่าปริมาณไลซีนลดลงเนื่องจากการทำปฏิกิริยากับเมลานอยดินส์

10.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล

10.2.1 ชนิดของกรดอะมิโน กรดอะมิโนที่แตกต่างกันก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่อัตราเร็วต่างกัน เนื่องจากความแตกต่างของโครงสร้างและหมู่อะมิโนอิสระของกรดอะมิโน โดยไลซีนจะเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลได้เร็วที่สุด เพราะมีขนาดโมเลกุลเล็กและเป็นกรดอะมิโนชนิดแอลฟา

(α) เมื่อกรดอะมิโนมีขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้นจะเกิดปฏิกิริยาสร้างสีน้ำตาลได้ช้าลง สำหรับกรดอะมิโนชนิดโอเมกา (ω) จะเกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้นเมื่อความยาวของสายโมเลกุลเพิ่มขึ้น หมู่อะมิโนในโมเลกุลของโปรตีนหมู่อะมิโนของไลซีนเกิดปฏิกิริยาเร็วที่สุด เนื่องจากมีหมู่อะมิโนที่พร้อมจะเกิดปฏิกิริยา 2 หมู่ (Labuza and Baisier, 1992)

10.2.2 ชนิดของน้ำตาล น้ำตาลที่เกิดปฏิกิริยาได้คือน้ำตาลรีดิคัล น้ำตาลต่างชนิดกันจะให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่ต่างกันตามลำดับดังนี้ aldopentoses > aldohexoses > ketohexoses > disaccharides (Naranjo *et al.*, 1998) เพราะหมู่อัลดีไฮด์ในน้ำตาลกลูโคสมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูงกว่าหมู่คีโตนของน้ำตาลฟรักโทสและน้ำตาลชนิดไดแซคคาไรด์ (Yeboah *et al.*, 1999)

10.2.3 อัตราส่วนของน้ำตาลต่อกรดอะมิโน เมื่อเพิ่มสัดส่วนของกรดอะมิโนอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้น และที่อัตราส่วนเดียวกัน เมื่อความเข้มข้นขององค์ประกอบทั้งสองเพิ่มขึ้น อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้น

10.2.4 อุณหภูมิ อุณหภูมิที่ทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดีขึ้นอยู่กับลักษณะของอาหาร อาหารที่มีลักษณะแห้งหรือมีน้ำในอาหารน้อยจะเกิดปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าอาหารที่มีน้ำปริมาณมากในอาหาร และที่อุณหภูมิสูงจะเร่งปฏิกิริยาให้เกิดเร็วขึ้น (Labuza and Baisier, 1992)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของหัวกุ้งขาวและเครื่องในหมึกกระดองต่อกระบวนการหมัก และคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเศษเหลือของกระบวนการแปรรูปปลาโตแซ่เยือกแข็ง
2. เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาเก็บรักษาต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์บูดูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์

ขอบเขตงานวิจัย

ศึกษาองค์ประกอบเคมี กายภาพ และจุลินทรีย์ของวัตถุดิบที่ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมักโดยตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงด้านเคมี และจุลินทรีย์ ระหว่างกระบวนการหมักโปรตีนไฮโดรไลเสททุกระยะ 30 วัน และคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสท และศึกษาคุณภาพบูดูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์ และการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาบูดูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิห้อง 35 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 เดือน

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. วัสดุดิบ

1.1 หัวกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) และเครื่องในหมึกกระดอง (*Sepia pharaonis*) จัดซื้อจากแพปลา ณ ท่าเรือประมง จังหวัดสงขลา จัดเก็บวัสดุดิบในถุงพลาสติกก่อนจัดเก็บในถังโฟม โดยวางสลับกับชั้นของน้ำแข็ง ขนส่งมายังคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ภายใน 1 ชั่วโมง และจัดเก็บในสภาพดังกล่าวที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 2 วัน ก่อนนำมาใช้ทดลอง

1.2 วัสดุเศษเหลือของปลาตาโต (*Priacanthus tayenus*) ที่ประกอบด้วยส่วนหัวที่มีเครื่องใน และส่วนของโครงก้างปลา โดยใช้สองส่วนนี้ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ซึ่งวัสดุเศษเหลือของปลาตาโตได้รับบริจาคจากบริษัทเอส เอส โพรสเซ็นฟู๊ดส์จำกัด อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา โดยบรรจุในถุงพลาสติกก่อนจัดเก็บในถังโฟม โดยวางสลับกับน้ำแข็ง ขนส่งถึงคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ภายใน 1 ชั่วโมง และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่เกิน 2 วัน ก่อนนำมาใช้ทดลอง

1.3 เกลือ เป็นเกลือสินเธาว์ไม่ใส่ไอโอดีน มีลักษณะเป็นเม็ดสีขาวได้รับบริจาคจากร้านเกลือสมุทร อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

1.4 เครื่องปรุงในการผลิตบูดูพาสเจอร์ไรซ์พร้อมบริโภค ประกอบด้วยส้มแขกแห้ง (*Garcinia atroviridis* Griff.), หอมแดง (*Allium ascalonicum* Linn.), พริก (*Capsicum frutescens* Linn.), น้ำตาลปีก (น้ำตาลโตนด) และตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* Stapf.)

2. สารเคมีและอุปกรณ์

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ระบุใน Table 5 และ 6 ตามลำดับ

Table 5. Chemical and reagents used for the experiments

Chemicals	Brand name and Company
95% Ethanol	SV Medico, Thailand
Absolute ethanol (99.99%)	Merck, Germany
Folin-Ciocalteu reagent	Merck, Germany
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Ajax Finechem, Adivision of Nuplex Industries (Aust) Pty Ltd, New Zealand
Gallic acid	Fluka, Sigma-Aldrich chemie GmbH, Spain
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Fluka, Sigma-Aldrich chemie GmbH, Germany
Ferric chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	BDH, VWR international Ltd., England
Hydrochloric acid (37%)	Merck, Thailand
Sodium acetate	Carlo, Erba reagent, Italy
6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane -2-carboxylic acid (Trolox)	Fluka, Sigma-Aldrich chemie GmbH, Germany
Peptone	Merck, Germany
Plate count agar (PCA)	Merck, Germany
Lauryl sulphate tryptone (LST) broth	Merck, Germany
EC broth	Merck, Germany
Baird parker agar (BP)	Merck, Germany

Table 6. Instruments used for the experiment

Instruments	Model	Company/Country
Balance	B3100S	Sartorius, Germany
Blender	TYPE 276	Moulinex, France
pH meter	SevenGo SG2	Schott, USA
Spectrophotometer	UV-16001	Shimadzu, Kyoto, Japan
Microplate reader	Power wave X	Biotek, USA
Water bath	W350	Memmert, Germany
Colorimeter	Quest xT	Hunter Lab , USA
Hot air oven		Memmert, Germany
Autoclave	SS325	Tomy seiko Co., Ltd, Japan
Digestion unit	Kjedatherm	Gerhardt, USA
Distillation unit	Vapodest 30	Gerhardt, USA

วิธีการ

1. ผลของการเติมหัวกุ้งขาว และเครื่องในหมึกกระดองต่อการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท

1.1 ศึกษาคุณลักษณะของวัตถุดิบ

สุ่มตัวอย่างวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิด คือ หัวกุ้งขาว เครื่องในหมึก และวัสดุเศษเหลือของปลาตาโต เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพ ทางเคมี และทางจุลินทรีย์ดังนี้

1.1.1 ค่าความเป็นกรด ด่าง โดยเครื่อง pH meter (A.O.A.C., 1990)

1.1.2 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl (A.O.A.C., 2000)

1.1.3 ปริมาณความชื้น (A.O.A.C., 1990)

1.1.4 ปริมาณเถ้า (A.O.A.C., 1990)

1.1.5 ปริมาณค่าที่ระเหยได้ทั้งหมด (Hasegawa, 1987)

1.1.6 ปริมาณไตรเมทิลเอมีน (Hasegawa, 1987)

1.1.7 ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด (Vanderzant and Splittstoesser, 1992)

1.1.8 ปริมาณเชื้อ Halophilic bacteria (Chaveesuk *et al.*, 1993)

1.2 เตรียมวัสดุทั้ง 3 ชนิดก่อนการหมัก ดังนี้ คือ วัสดุเศษเหลือของปลาตาโต และหัวกุ้งขาว สับให้มีขนาดเล็กลง สำหรับเครื่องในหมักกระดองนำไปล้างด้วยน้ำประปา 3 ครั้ง เพื่อกำจัดสิ่งปลอมปนที่ติดมา แล้ววางให้สะเด็ดน้ำ 5 นาที

1.3 นำวัสดุเศษเหลือของปลาตาโต หัวกุ้งขาว และเครื่องในหมักกระดองหมักกับเกลือ โดยจัดชุดทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ CRD (Completely Randomized Design) ซึ่งประกอบด้วย

ชุดหมักที่ 1 วัสดุเศษเหลือของปลาตาโต และเกลือในอัตราส่วน (โดยน้ำหนัก) เท่ากับ 4:1 (ชุดควบคุม)

ชุดหมักที่ 2 เตรียมวัสดุหมักเช่นเดียวกับชุดควบคุม โดยเติมหัวกุ้งขาวในปริมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักวัสดุเศษเหลือของปลาตาโต

ชุดหมักที่ 3 เตรียมวัสดุหมักเช่นเดียวกับชุดควบคุม โดยเติมหัวกุ้งขาวในปริมาณร้อยละ 20 ของน้ำหนักวัสดุเศษเหลือของปลาตาโต

ชุดหมักที่ 4 เตรียมวัสดุหมักเช่นเดียวกับชุดควบคุม โดยเติมหัวกุ้งขาวกับเครื่องในหมักกระดองในปริมาณร้อยละ 10 และ 10 ของน้ำหนักวัสดุเศษเหลือของปลาตาโต ตามลำดับ

ชุดหมักที่ 5 เตรียมวัสดุหมักเช่นเดียวกับชุดควบคุม โดยเติมหัวกุ้งขาวกับเครื่องในหมักกระดองในปริมาณร้อยละ 10 และ 20 ของน้ำหนักวัสดุเศษเหลือของปลาตาโต ตามลำดับ

1.4 นำเกลือร้อยละ 70 ของปริมาณเกลือที่ใช้ทั้งหมด มาคลุกเคล้ากับวัสดุเศษเหลือตามที่ระบุไว้ในแต่ละชุดทดลอง แล้วบรรจุลงถังขนาด 25 ลิตรกรัมอัดให้แน่น และกลบผิวหน้าด้วยเกลือส่วนที่เหลือ ปิดฝาให้สนิท แล้วนำไปวางไว้ที่โล่งเพื่อรับแสงแดด โดยแต่ละชุดทดลองจะมี ตัวอย่างชุดละ 3 ถัง

1.5 สุ่มของเหลวที่เกิดขึ้นทุก 30 วัน โดยใช้ภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อดักของเหลวจากถังหมัก ปริมาตร 250 มิลลิลิตร กรองผ่านผ้าขาวบางก่อนกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 และบรรจุเก็บในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท เพื่อวิเคราะห์ค่าต่างๆดังในข้อ 1.1 ตลอดจนวิเคราะห์หาปริมาณอะมิโนไนโตรเจน (A.O.A.C, 1984) และปริมาณเกลือ (A.O.A.C, 1995)

1.6 ยุติการหมักเมื่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในของเหลวมีค่าไม่น้อยกว่าร้อยละ 90 ของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในวัตถุดิบเริ่มต้น จากนั้นกรองของเหลวในถังหมักด้วยผ้าขาวบางจัดเก็บใส่ภาชนะที่มีฝาปิดสนิท เพื่อวิเคราะห์ค่าต่างๆ และใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลองต่อไป

1.7 สุ่มของเหลวที่ได้จากข้อ 1.6 มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 แล้วใช้เพื่อวิเคราะห์ค่าต่างๆดังในข้อ 1.5 และวิเคราะห์เพิ่มเติมในค่าต่อไปนี้

1.7.1 ความสามารถจับอนุมูลอิสระของ DPPH (Wu *et al.*, 2003)

1.7.2 ความสามารถจับอนุมูลอิสระของ ABTS (Arnao *et al.*, 2001)

1.7.3 สมบัติการเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (reducing power) (Oyaizu, 1988)

1.7.4 การยอมรับทางประสาทสัมผัส โดยการนำของเหลวจากชุดการทดลองต่างๆมา ประเมินการยอมรับทางประสาทสัมผัสในด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น กลิ่นรส รสชาติ ความเค็ม และความชอบโดยรวม โดยการทดสอบแบบ 9-point Hedonic scale เมื่อระดับคะแนน 1 หมายถึง ไม่ชอบมากที่สุด และระดับคะแนน 9 หมายถึง ชอบมากที่สุด ผู้ทดสอบชิมจำนวน 30 คน คัดเลือก ชุดที่ได้รับการยอมรับความชอบโดยรวมมากที่สุด แต่หากการยอมรับทางประสาทสัมผัสไม่แตกต่างกันจะนำสมบัติการต้านออกซิเดชันเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

1.8 จำนวนค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์ต่างๆ แล้ววิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยตามวิธี ANOVA แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อประเมินผลของการเติมหัวกุ้งขาว และเครื่องในหมึกกระดอง ต่อกระบวนการหมัก และคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสท

2. การผลิตบุดูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์ จากโปรตีนไฮโดรไลเสท

2.1 สูตรของบุดูปรุงรส

สูตรของบุดูปรุงรสซึ่งได้จากการศึกษาเบื้องต้นได้เป็นสูตรที่มีส่วนประกอบดังนี้ ได้แก่ โปรตีนไฮโดรไลเสท : น้ำ (1:1.5) และเครื่องปรุง (100 กรัม) ประกอบด้วย

ส้มแขกแห้ง	18.8	กรัม
หอมแดงสด	30	กรัม
พริกขี้หนูสด	15.2	กรัม
ตะไคร้	18	กรัม
น้ำตาลปีก (น้ำตาลโตนด)	18	กรัม

ดังนั้นในบุดูปรุงรสน้ำหนัก 250 กรัม ประกอบด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสทเจือจาง 150 กรัม และเครื่องปรุงตามที่ระบุข้างต้นน้ำหนักรวม 100 กรัม สูตรดังกล่าวทำให้บุดูปรุงรรมี pH เท่ากับ 4.2 ทำให้เป็นปัจจัยหนึ่งที่จะช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยต่อเชื้อก่อโรค (*Clostridium botulinum*)

2.2 การผลิตบุดูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์

2.2.1 ลวกหอมแดงสด และพริกขี้หนูสดด้วยน้ำเดือดนาน 2 นาที แล้ววางให้สะเด็ดน้ำ 5 นาที

2.2.2 เจือจางโปรตีนไฮโดรไลเสท ด้วยน้ำในปริมาตร 1.5 เท่า ก่อนนำไปต้มพร้อมส้อม
แยก ให้เดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใส่น้ำตาลปึก ต้มจนละลายหมดภายใน 3 นาที

2.2.3 บรรจุของผสมลงขวดแก้วพร้อมปิดสนิท

2.2.4 ต้มฆ่าเชื้อในน้ำเดือดโดยให้จุดที่ร้อนซ้ำที่สุดมีอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็น
ระยะเวลา 10 นาที

2.3 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของบุดูปรุงรสพาสเจอร์ระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 3 เดือน

วิธีการผลิต โดยทำการผลิตบุดูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์ตามวิธีการ 2.2 และจัดเก็บที่
อุณหภูมิ 28 (อุณหภูมิห้อง), 35 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน โดยสุ่มตัวอย่างในสัปดาห์
ที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 โดยนำบุดูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์มาดำเนินการ ดังนี้

1. กรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อแยกส่วนของแข็ง และของเหลวของบุดูปรุงรสพาส
เจอร์ไรซ์

2. นำของเหลวที่แยกได้ไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 ก่อนบรรจุ
ขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เรียกว่าส่วนของเหลวของบุดูปรุงรส
พาสเจอร์ไรซ์

3. นำส่วนของแข็งไปบดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนนำไปสกัดโดยชั่งตัวอย่างใส่
ขวดรูปชมพู่ และเติมน้ำกลั่นปริมาตรเป็น 4 เท่าของตัวอย่าง จากนั้นนำไปต้มใน Water bath ที่
อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง
Whatman No. 1 แล้วนำไปบรรจุขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
(ดัดแปลงจาก Yen and Hsieh, 1997) เรียกว่าส่วนของแข็งของบุดูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์

การวิเคราะห์

ก. ส่วนของเหลวของบุดูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์

(1) วิเคราะห์ค่าสี โดยใช้ Hunter Lab

(2) Browning intensity โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm
(Hjalmarsson *et al.*, 2007)

(3) วิเคราะห์สมบัติต้านออกซิเดชัน คือ วิเคราะห์ความสามารถจับอนุมูลอิสระของ
DPPH (Wu *et al.*, 2003) และสมบัติการเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (reducing power) (Oyaizu, 1988)

(4) วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Kahkonen *et al.*, 1999)

ข. ส่วนของแข็งของบุดูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์

(1) วิเคราะห์สมบัติต้านออกซิเดชัน คือ วิเคราะห์ความสามารถจับอนุมูลอิสระของ DPPH (Wu *et al.*, 2003) และสมบัติการเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (reducing power) (Oyaizu, 1988)

(2) วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Kahkonen *et al.*, 1999)

ค. ส่วนของบุดูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์ทั้งหมดโดยการปั่นรวมกันก่อนนำไปวิเคราะห์ค่าต่างๆ

(1) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (A.O.A.C., 1990)

(2) วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด เชื้อ *Staphylococcus aureus* และเชื้อ *E. coli*. (Hasegawa, 1987)

(3) ประเมินการยอมรับทางประสาทสัมผัส ในด้านกลิ่น สี รสชาติและความชอบ โดยรวมโดยการทดสอบแบบ 9-point Hedonic scale ดังระบุในข้อ 1

2.4 กำหนดค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์ต่างๆ แล้ววิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยตามวิธี ANOVA แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลของการเติมหัวกุ้งขาวและเครื่องในหมึกกระดองต่อโปรตีนไฮโดรไลสจากเศษเหลือปลา คาโต

1.1 องค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพของวัตถุดิบ

ผลวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โปรตีน เถ้า และไขมันในวัตถุดิบ 3 ชนิด คือ หัวกุ้งขาว เครื่องในหมึก และวัสดุเศษเหลือของปลาคาโต (Table 7) พบปริมาณโปรตีนมากที่สุดในเครื่องในหมึก รองลงมาคือในหัวกุ้งขาว และวัสดุเศษเหลือของปลาคาโตตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากเครื่องในปลาหมึกไม่มีส่วนประกอบที่เป็นของแข็งในรูปกระดูกหรือเปลือก ซึ่งในวัตถุดิบทั้ง 3 จัดเป็นแหล่งของโปรตีนที่ดีโดยเฉพาะในวัสดุเศษเหลือของปลาคาโต และเครื่องในปลาหมึกที่มีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกับปริมาณโปรตีนในปลาที่นิยมใช้หมักน้ำปลา และบดแสดงดัง Table 2 ส่วนปริมาณของเถ้า และไขมันพบว่าในเครื่องในหมึกมีน้อยที่สุด จากการตรวจสอบเอกสารยังไม่พบรายงานวิจัยที่กล่าวถึงองค์ประกอบเคมีของเครื่องในหมึก ในกรณีของหัวกุ้งขาวนั้น Cao (2008) รายงานว่าประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 60.3 เถ้าร้อยละ 19.9 และไขมันร้อยละ 7.9 น้ำหนักแห้งของวัตถุดิบ Kittiphattanabawon (2005) รายงานว่าวัสดุเศษเหลือของปลาคาโตเฉพาะส่วนของก้างปลาประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 13.3 เถ้าร้อยละ 14.40 และไขมันร้อยละ 8.77 น้ำหนักเปียกของวัตถุดิบ

ผลวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าหัวกุ้งขาวมีปริมาณ TVB-N และ TMA สูงสุด ซึ่งอาจเป็นผลจากกิจกรรมจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่พบมากในส่วนของเครื่องในสัตว์ (Hebard *et al.*, 1982) สอดคล้องกับค่าความเป็นกรดต่างของหัวกุ้งขาวที่มีความเป็นด่างสูงกว่าเครื่องในหมึกและวัสดุเศษเหลือของปลาคาโต อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณ TVB-N และ TMA ในเครื่องในหมึกสูงกว่าวัสดุเศษเหลือของปลาคาโต แต่พบว่าค่าความเป็นกรดต่างกับไม่แตกต่างกันทั้งนี้อาจเป็นเพราะในปลาหมึกเกิดการสะสมของกรดแลกติกจากกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) แบบไม่ใช้ออกซิเจนสูงกว่ากุ้งและปลา (นงลักษณ์ สุทธิวิช, 2531) Matches และคณะ (1990) รายงานว่าปลาหมึกมีปริมาณไกลโคเจน (glycogen) มากกว่าในกุ้ง และปลา ซึ่ง Somero และ Childress (1990) อธิบายว่าไกลโคเจนเป็น buffering capacity ที่ดีทำให้ค่าความเป็นกรดต่างในเครื่องในหมึกไม่มีการเปลี่ยนแปลงมาก และเป็นที่น่าสังเกตว่าวัสดุเศษเหลือทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการทดลองนี้มีค่า TVB-N และ TMA สูงเกินกว่ามาตรฐานกำหนดเพื่อการบริโภค (25 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และ

Table 7. Proximate composition and initial quality of fish by-product, shrimp cephalothorax, and squid viscera

	fish by-product (<i>Priacanthus tayenus</i>)	shrimp cephalothorax (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	squid viscera (<i>Sepia pharaonis</i>)
Proximate (wet basis)			
Moisture (%)	69.09 ± 0.56 ¹ c	78.23 ± 0.45a	76.56 ± 0.32b
Protein (%)	18.21±1.25a (58.92±0.83) ²	13.10±1.17c (60.26 ± 0.41) ²	16.49±0.90b (70.36 ± 0.28) ²
Ash (%)	29.41±0.85a	24.22 ± 0.40b	19.15 ± 0.52c
Fat (%)	9.48 ± 0.44b	12.48 ± 0.37a	7.25 ± 0.61c
Initial quality			
Total nitrogen (g/□g)	29.14± 0.60a (94.28±1.02) ²	20.97 ± 0.28c (96.41±1.15) ²	26.39±0.95b (112.58±1.25) ²
TVB-N (mgN/100g)	45.57 ± 1.38a	224.47 ± 3.39c	124.45 ± 2.35b
TMA (mgN/100g)	18.20 ± 2.56c	33.37 ± 1.10a	23.45 ± 1.56b
pH	6.84 ± 0.06a	8.23 ± 0.07b	6.87± 0.04a

¹Values represent mean ± standard deviation. (a-d) Mean values in a row with difference letters are significantly difference at P < 0.05.

²(mean ± standard deviation) = dry basis

10 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม) Lannelongue (1982 อ้างโดย Disaraphong, 2005) แสดงให้เห็นว่าวัตถุดิบ ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือ ของกระบวนการผลิตมีคุณภาพต่ำกว่าเกณฑ์ที่ควรบริโภคสด อย่างไรก็ตาม การหมักน้ำปลาและ/หรือบูดูไม่ได้มีการกำหนดคุณภาพในรูปของ TVB-N และ TMA ของวัตถุดิบ เริ่มต้น และผลิตภัณฑ์สุดท้าย

1.2 คุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสทระหว่างการผลิตหมักเศษเหลือปลาตาก

1.2.1 คุณลักษณะทางเคมี

การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเป็นผลจากการย่อยเนื้อปลาและ วัตถุดิบที่ใช้หมักโดยกิจกรรมของเอนไซม์ (Meinle *et al.*, 1972) และกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่ ติดมากับวัตถุดิบ (Harder, 1974 อ้างโดย อรพิน ภูมิภมร, 2526) ส่งผลให้โปรตีนในเนื้อปลา กลายเป็น โพลีเปปไทด์ และกรดอะมิโน ก่อนถูกย่อยต่อกลายเป็นเอมีน และแอมโมเนีย ทำให้ ของเหลวที่ได้จากการหมักมีปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมดเพิ่มขึ้นก่อนจะมีค่าคงที่เมื่อ โปรตีนถูก ย่อยอย่างสมบูรณ์ (Lopetcharat and Parajuli, 2002; Chaveesuwan *et al.*, 1993; Beddows *et al.*, 1979) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในของเหลวที่ได้จากการหมักของชุดหมักต่างๆ (Figure 1) มีค่าเพิ่มขึ้น อย่างรวดเร็วในช่วง 2 เดือนแรก หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆจนถึงเดือนที่ 4 ของการหมัก ก่อน จะเริ่มคงที่ในทุกชุดการทดลอง การเติมหัวกุ้งขาว ในปริมาณร้อยละ 20 มีผลให้ปริมาณไนโตรเจน ทั้งหมด ในระหว่างหมักสูงกว่าชุดควบคุม รายงานของ นงลักษณ์ สุทธิวิช (2541) พบว่าในส่วน หัวของกุ้งมีปริมาณของเอนไซม์มากกว่าในหมึกจึงอาจเป็นสาเหตุให้ชุดทดลองที่เติมหัวกุ้งเกิดการ ย่อยสลายโปรตีนได้ดีกว่า อย่างไรก็ตามเมื่อสิ้นสุดการหมักในเดือนที่ 6 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ของทุกชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) แม้ว่าปริมาณไนโตรเจนในชุด ทดลองที่เติมหัวกุ้งขาวร้อยละ 20 มีแนวโน้มมากที่สุด ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงาน ของ Klomkaeo และคณะ (2006) ที่พบว่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในน้ำปลาจากปลาซาร์ดีนที่ หมักโดยเติมหมึกของปลาทูน่าร้อยละ 0, 10 และ 20 มีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาหมักเพิ่มขึ้น ก่อนจะมีค่าคงที่ จากข้อกำหนดระดับชั้นคุณภาพน้ำปลาไทยที่กำหนดให้น้ำปลาที่มีปริมาณ ไนโตรเจนทั้งหมดมากกว่า 20 กรัมต่อลิตร เป็นน้ำปลาเกรด 1 และน้ำปลาที่มีปริมาณไนโตรเจน ทั้งหมดระหว่าง 15-20 กรัมต่อลิตร เป็นน้ำปลาเกรด 2 (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม , 2526) ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากทุกชุดการทดลองสามารถจัดอยู่ในกลุ่มของน้ำปลา เกรด 2

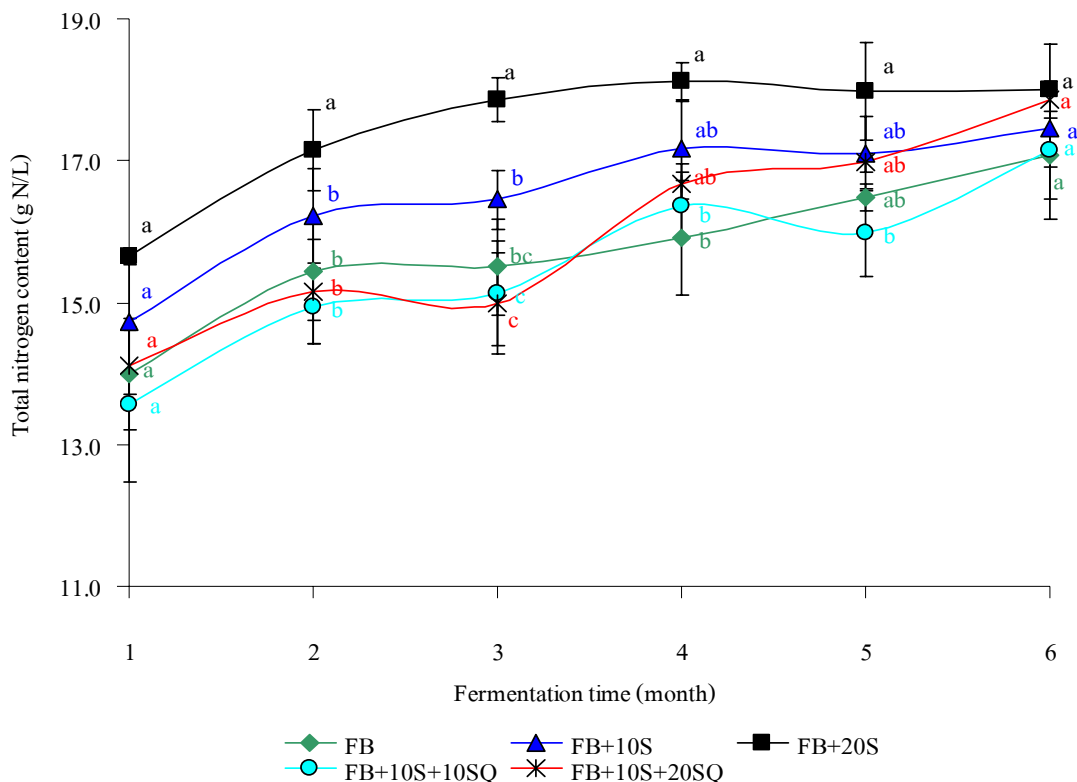


Figure 1. Total nitrogen content of protein hydrolysates during fermentation of mixture of seafood by-products. FB = fish by-product (fish frame/salt = 4:1); FB+10S = FB+10% w/w shrimp cephalothorax; FB+20S = FB+20% w/w shrimp cephalothorax; FB+10S+10SQ = FB+10S+10 % w/w squid viscera and FB+10S+20SQ = FB+10S+20 % w/w Squid viscera

- ^(a-d) Mean values in a equal fermentation time with difference letters are significantly difference at $P < 0.05$.

การวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในโตรเจนเป็นการให้ Formaldehyde ทำปฏิกิริยากับ กรดอะมิโน แล้วเกิดการปล่อยไฮโดรเจนออก่อนก่อนทำการไทเทรตโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Del Toro and Garcia-carreno, 2002) ดังนั้นปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในโตรเจนจึงเป็นการบอกปริมาณ กรดอะมิโน หรืออัตราการย่อยสลายจากสารประกอบโมเลกุลใหญ่ (โปรตีน, เปปไทด์) ให้ได้ สารประกอบโมเลกุลเล็ก (กรดอะมิโน) (Chaveesu *et al.*, 1993) ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในโตรเจนใน ของเหลวที่ได้จากการหมักวัสดุเศษเหลือของปลาตาโต มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักที่ เพิ่มขึ้น (Figure 2) โดยเฉพาะในระหว่าง 4 เดือนแรกที่พบว่าปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จากนั้น จะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆจนสิ้นสุดการหมัก สอดคล้องกับรายงานของ Klomdao และคณะ (2006) ที่

พบว่าปริมาณฟอรั่มัลไนโตรเจนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในระยะ 2 เดือนแรกของการหมักน้ำปลา หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆจนสิ้นสุดการหมัก โดย Tung & Lawachara และคณะ (2003) รายงานว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณฟอรั่มัลไนโตรเจนเป็นผลจากการย่อยสลายเปปไทด์ของโปรตีนที่มากขึ้นนั่นเอง และจากงานวิจัยนี้พบว่าปริมาณฟอรั่มัลไนโตรเจนในชุดควบคุมมีค่าน้อยกว่าทุกชุดทดลอง ยกเว้นในเดือนที่ 1 เพราะการเติมหัวกุ้งขาว และ/หรือเครื่องในหมึกเป็นการเพิ่มแหล่งของเอนไซม์ที่จะเร่งการย่อยสลายเปปไทด์ในระหว่างการหมัก โดยชุดที่มีการเติมหัวกุ้งขาวร้อยละ 20 (FB+20S) และชุดที่เติมหัวกุ้งขาวร้อยละ 10 และเครื่องในหมึกร้อยละ 20 (FB+10S+20SQ) จะมีปริมาณฟอรั่มัลไนโตรเจนสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ส่งผลให้เมื่อสิ้นสุดการหมักในเดือนที่ 6 ปริมาณฟอรั่มัลไนโตรเจนของชุดทดลองทั้ง 2 มีค่าสูงกว่าชุดทดลองอื่น

ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนในของเหลวที่ได้จากการหมักวัสดุเศษเหลือของปลาตาโต (Figure 3) เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาหมักเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในระยะ 3 เดือนแรก ของการหมักที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ กระทั่งสิ้นสุดการหมัก การเติมหัวกุ้งขาว และ/หรือเครื่องในหมึก ร่วมหมักกับเศษเหลือของปลาตาโต (FB+10S+20SQ) มีผลให้ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนของโปรตีนไฮโดรไลเสทในของเหลวที่หมักครบ 6 เดือน แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จากชุดควบคุม การที่ชุดทดลอง FB+20S, FB+10S+20SQ และ FB+10S+10SQ มีปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนสูงกว่าชุดควบคุมเมื่อหมักนานกว่า 3 เดือน อาจเป็นผลจากมีเอนไซม์ย่อยโปรตีน และเชื้อจุลินทรีย์ในหัวกุ้งและเครื่องในหมึกปริมาณสูง โดยกิจกรรมของเอนไซม์ในวัตถุดิบและจากจุลินทรีย์ซึ่งมีบทบาทสำคัญยิ่งต่อการเพิ่มปริมาณของสารประกอบไนโตรเจนในระหว่างการหมัก (Lopetcharat *et al*, 2001) โดย Lopetcharat และ Par (2002) ศึกษาการหมักน้ำปลาจากปลา (*Merluccius productus*) ทั้งตัว และจากวัสดุเศษเหลือซึ่งได้แก่ ส่วนหัว โครงก้างปลา เครื่องใน และหนังปลา ของปลาชนิดเดียวกันเป็นเวลา 2 เดือน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าชุดที่หมักด้วยปลาทั้งตัวจะให้ค่าปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนที่มากกว่า นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าน้ำปลาที่หมักจากปลากระดักสด มีค่าแอมโมเนียไนโตรเจนน้อยกว่าที่หมักจากปลากระดักไม่สด โดยมีค่าแอมโมเนียไนโตรเจนเป็น 3.64 กรัมต่อลิตร และ 1.77 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อหมักครบ 12 เดือน (อารีย์ มีสวัสดิ์, 2542) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนของน้ำปลาที่ได้จากการหมักขึ้นกับวัตถุดิบเริ่มต้นที่ใช้ ซึ่งหากวัตถุดิบที่ใช้มีแหล่งของเอนไซม์ และจุลินทรีย์มากจะมีผลให้ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนมีค่าสูงไปด้วย

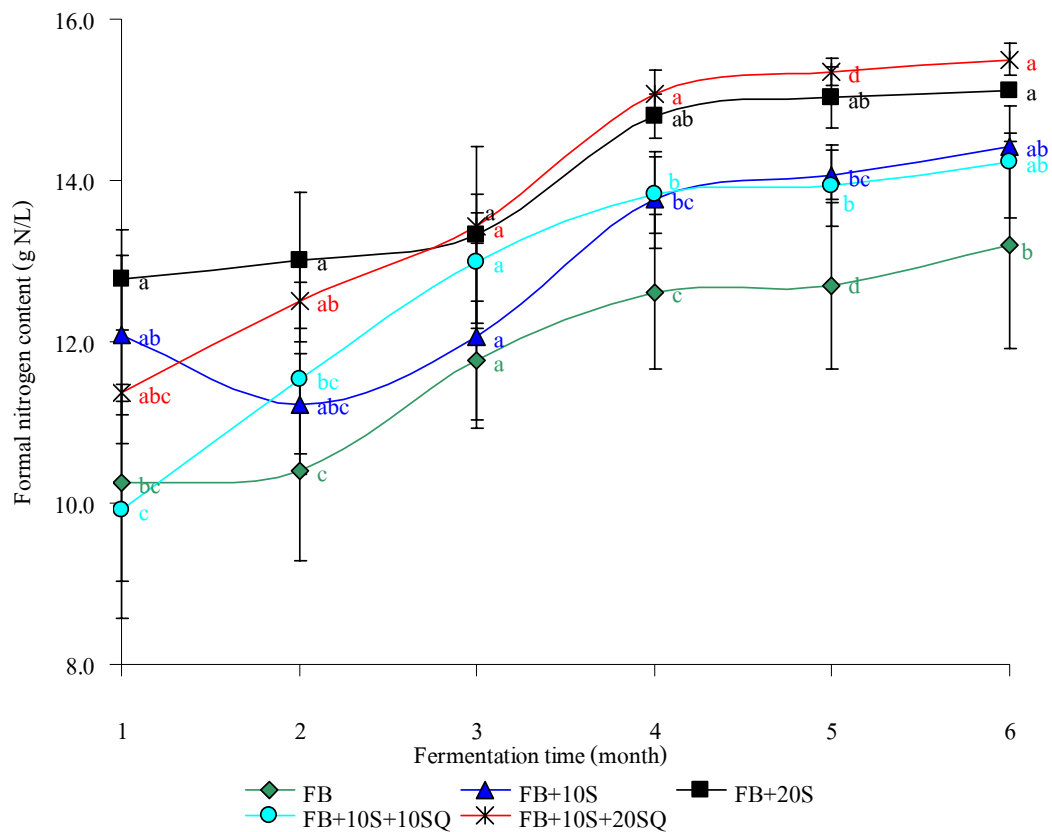


Figure 2. Formal nitrogen content of protein hydrolysates during fermentation of mixture of seafood by-products. Each treatment is described as Figure 1.

- ^(a-d) Mean values in a equal fermentation time with difference letters are significantly difference at $P < 0.05$.

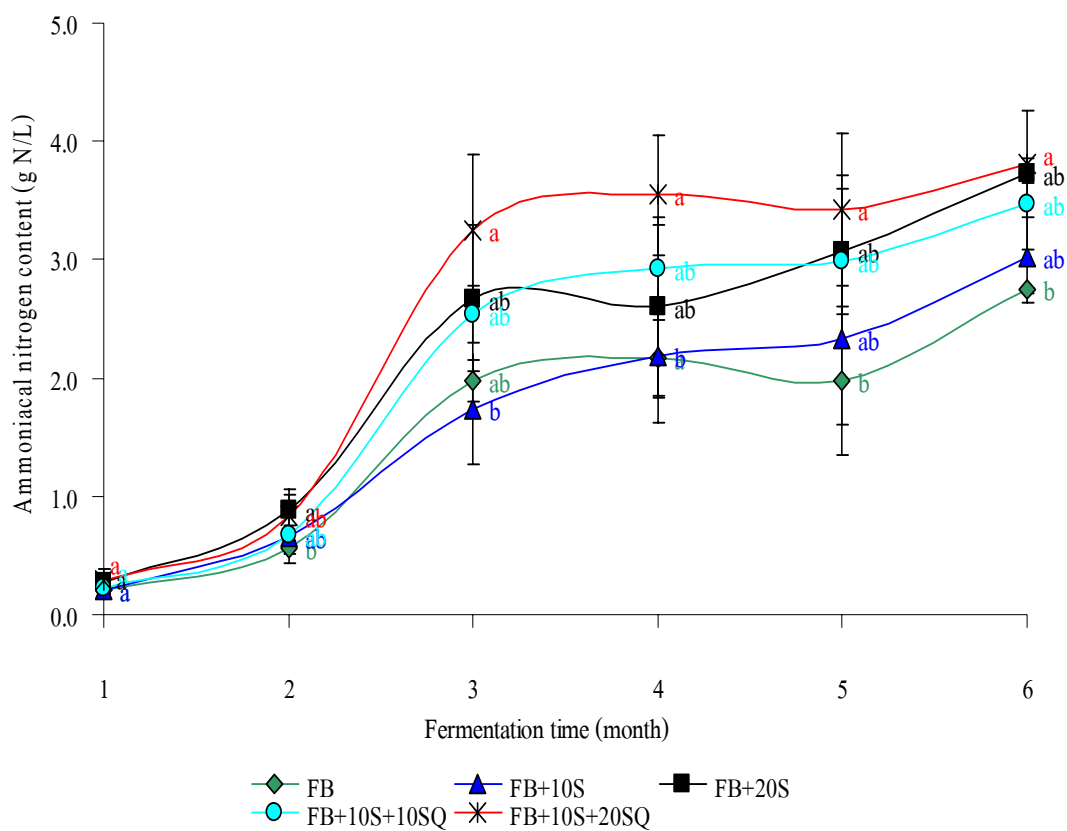


Figure 3. Ammoniacal nitrogen content of protein hydrolysates during fermentation of mixture of seafood by-products. Each treatment is described as Figure 1.

- ^(a-d) Mean values in a equal fermentation time with difference letters are significantly difference at $P < 0.05$.

ปริมาณอะมิโนไนโตรเจนในของเหลวที่ได้จากการหมักวัสดุเศษเหลือของปลา ตาโตร่วมกับวัสดุอื่นๆ เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นไม่มีผลทำให้ปริมาณอะมิโนไนโตรเจนของ ชุดทดลองเดียวกันแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ยกเว้นในชุดทดลอง FB+20S และ เมื่อสิ้นสุดการหมักในเดือนที่ 6 ปริมาณอะมิโนไนโตรเจนของทุกชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) (Table 8) ซึ่งต่างจากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลา หมักเพิ่มขึ้น และแตกต่างจากรายงานของ Klom Dao และคณะ (2006) และ Disaraphong และคณะ (2005) ที่พบว่าปริมาณอะมิโนไนโตรเจนและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในการหมักน้ำปลามีการ เปลี่ยนแปลงที่สอดคล้องกัน โดยช่วงแรกปริมาณสารตั้งกลุ่มของการหมักจะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่าง รวดเร็ว หลังจากนั้นเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนมีค่าคงที่เมื่อหมักครบ 3 เดือน ผลการศึกษาของอารีย์ มี สวัสดิ์ (2542) พบว่าปริมาณอะมิโนไนโตรเจนระหว่างการหมักน้ำปลาของชุดทดลองที่หมักด้วย ปลากระตักสดจะแตกต่างกันไปตามระยะหมัก กล่าวคือในระยะหมัก 0-4 สัปดาห์, 5-12 สัปดาห์, 16 สัปดาห์ และ 20 สัปดาห์ จะมีปริมาณเท่ากับ 2.72 กรัมต่อลิตร, 4.64 กรัมต่อลิตร, ตรวจไม่พบ และ 7.24 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยการลดลงของปริมาณอะมิโนไนโตรเจนอาจเป็นผลจากถูกใช้ในการ เจริญของแบคทีเรีย บางส่วนถูกใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเกิดสีน้ำตาล (Maillard reaction) และ ปฏิกิริยา oxidative deamination ในระหว่างการหมักน้ำปลา (อารีย์ มีสวัสดิ์, 2542) ดังนั้นความ แปรปรวนของปริมาณอะมิโนไนโตรเจนในชุดหมักต่างๆของการศึกษานี้จึงอาจเป็นผลจากการถูก ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าว อย่างไรก็ตามเมื่อสิ้นสุดการหมักโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากทุก ชุดทดลองมีปริมาณอะมิโนไนโตรเจนอยู่ในช่วง 10.45 – 11.69 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นไปตาม ข้อกำหนดของมาตรฐานน้ำปลาไทยที่กำหนดให้ต้องมีค่ามากกว่า 10 กรัมต่อลิตร (สำนักงาน มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2526)

Table. 8 Amino nitrogen content changer during fish protein hydrolysate fermentation with various ratio fish fillets by-products, shrimp cephalothrax and squid viscera.

Treatment	Month					
	1	2	3	4	5	6
FB	10.05 ± 1.18 ^{bc,w}	9.84 ± 1.08 ^{b,w}	9.79 ± 0.71 ^{a,w}	10.45 ± 0.85 ^{b,w}	10.71 ± 1.19 ^{ab,w}	10.45 ± 1.26 ^{ab,w}
FB+10S	11.87 ± 0.98 ^{ab,w}	10.58 ± 0.52 ^{ab,w}	10.34 ± 1.61 ^{a,w}	11.58 ± 1.12 ^{ab,w}	11.74 ± 1.04 ^{a,w}	11.40 ± 0.39 ^{a,w}
FB+20S	12.50 ± 0.65 ^{a,w}	12.13 ± 0.84 ^{a,w}	10.65 ± 0.54 ^{a,x}	12.20 ± 0.62 ^{a,w}	11.97 ± 0.61 ^{a,w}	11.39 ± 0.16 ^{a,w,x}
FB+10S+10SQ	9.69 ± 1.30 ^{c,w}	10.87 ± 1.10 ^{ab,w}	10.45 ± 0.70 ^{a,w}	10.91 ± 0.85 ^{ab,w}	10.94 ± 0.99 ^{ab,w}	10.75 ± 0.77 ^{ab,w}
FB+10S+20SQ	11.09 ± 0.53 ^{abc,w}	11.68 ± 0.33 ^{a,w}	10.19 ± 1.36 ^{a,w}	11.53 ± 1.18 ^{ab,w}	11.92 ± 0.49 ^{a,w}	11.69 ± 0.99 ^{a,w}

•FB = fish by-product (fish frame/salt = 4:1); FB+10S = FB+10% w/w shrimp cephalothrax; FB+20S = FB+20% w/w shrimp cephalothrax; FB+10S+10SQ = FB+10S+10 % w/w Squid viscera

•Values represent mean ± standard deviation;^(a-d) Mean values in a column with difference letters are significantly difference at P < 0.05.
^(w-z) Mean values in a row with difference letters are significantly difference at P < 0.05.

ปริมาณค่าที่ระเหยได้ทั้งหมดของทุกชุดหมักเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีค่าสูงสุดในเมื่อหมักถึงเดือนที่ 4 (Figure 4) ยกเว้นชุดทดลอง FB+10S จากนั้นมีปริมาณลดลง โดยทั่วไปการเติมหัวกึ่งขาว หัวกึ่งขาวและ/หรือเครื่องในหมักไม่มีผลให้ปริมาณค่าที่ระเหยได้ทั้งหมดในแต่ละชุดหมักแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) แต่ทำให้มีปริมาณค่าที่ระเหยได้ทั้งหมดสูงกว่าชุดควบคุม (ยกเว้นเดือนที่ 4 ของการหมัก) ทั้งนี้อาจเป็นผลจากหัวกึ่ง และเครื่องในหมักมีปริมาณค่าที่ระเหยได้ทั้งหมดเริ่มต้นสูงกว่าในวัสดุเศษเหลือของปลาตาโต (Table 7) นอกจากนี้ยังอาจเป็นไปได้ว่าในหัวกึ่ง และเครื่องในหมักมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสทำให้การย่อยโปรตีนเกิดได้นิ่งลักษณะ ก๊าซติดตันสกุล (2541) พบว่าปริมาณค่าที่ระเหยได้ทั้งหมดในชุดทดลองที่หมักจากปลาทั้งตัวมีปริมาณมากกว่าที่หมักด้วยปลาที่คั่วกใส่ออก เช่นเดียวกับรายงานของ พงษ์เทพ เกิดเนตร (2533) ที่พบว่าชุดหมักบูดูที่ไม่มีการเติมเอนไซม์มีอัตราการเพิ่มของปริมาณค่าที่ระเหยได้ทั้งหมดช้ากว่าชุดที่มีการเติมเอนไซม์ โดยการเพิ่มขึ้นของค่าค่าที่ระเหยได้ทั้งหมดแสดงว่ามีการแตกตัวของสารประกอบไนโตรเจนเกิดขึ้นสูงซึ่งเป็นผลจากกิจกรรมของเอนไซม์ในเนื้อปลา และจากแบคทีเรียที่เรี่ยนเอง จากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าปริมาณค่าที่ระเหยได้ทั้งหมดมีค่าสูงสุดในเดือนที่ 4 ก่อนมีค่าลดลงอาจเพราะเกิดการสลายตัวของสารประกอบค่าที่ระเหยได้เป็นสารประกอบอื่นมากขึ้นหรืออาจเกิดปฏิกิริยาสร้างสีน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้น และเมื่อสิ้นการหมักเดือนที่ 6 พบว่าปริมาณค่าที่ระเหยได้ทั้งหมดมีค่าอยู่ระหว่าง 159.26 – 236.00 มิลลิกรัมในโตรเจนต่อ 100 มิลลิตร (Figure 4) จากรูปที่ 4 แสดงให้เห็นว่าชุดควบคุมมีค่าปริมาณค่าที่ระเหยได้ทั้งหมดต่ำกว่าทุกชุดทดลองอื่นทั้งนี้อาจเพราะเชื้อแบคทีเรียในวัตถุดิบของชุดควบคุมแตกต่างกับชุดอื่นๆและเป็นกลุ่มที่สามารถนำค่าที่ระเหยได้ทั้งหมดที่เป็นแหล่งไนโตรเจนไปใช้จึงส่งผลให้ปริมาณค่าที่ระเหยได้ทั้งหมดมีค่าลดลงจนต่ำที่สุดจากชุดทดลองทั้งหมดในเดือนที่ 6

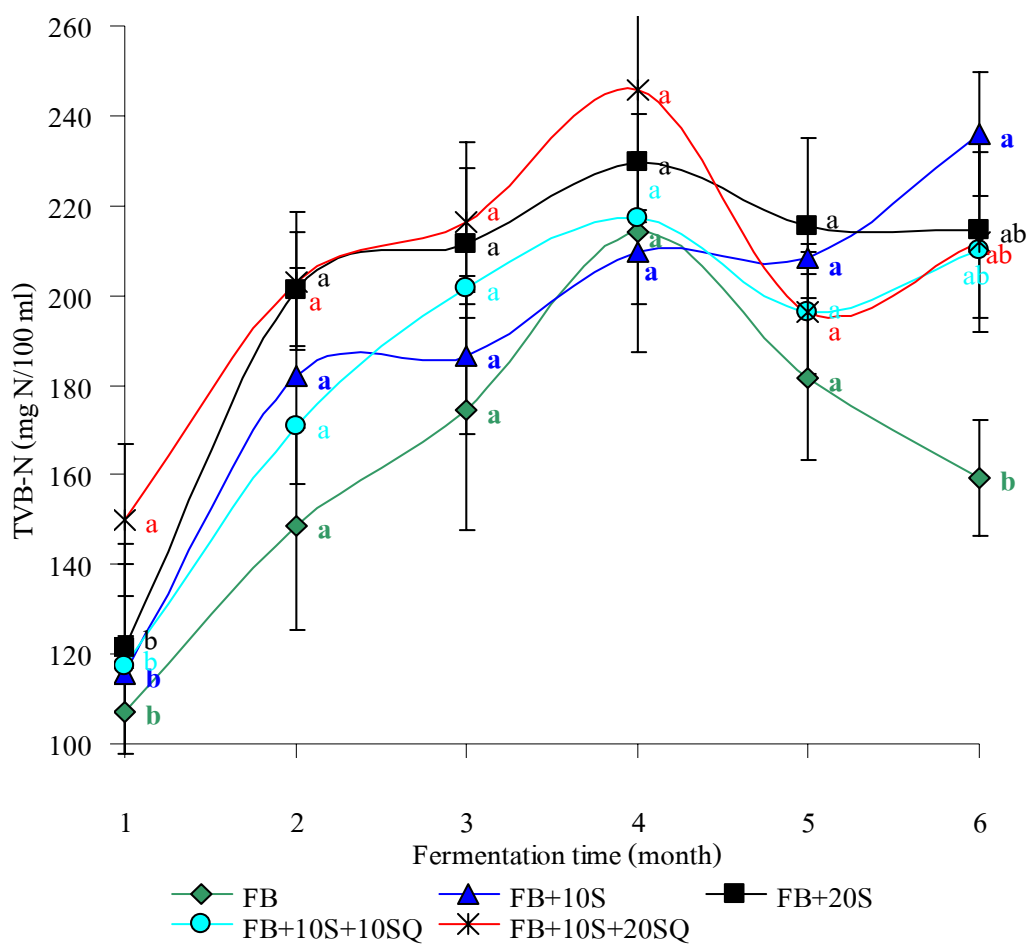


Figure 4. Total volatile bases nitrogen (TVB-N) content of protein hydrolysates during fermentation of mixture of seafood by-products. Each treatment is described as Figure 1.

- ^(a-d) Mean values in a equal fermentation time with difference letters are significantly difference at $P < 0.05$.

ปริมาณ TMA ในของเหลวที่ได้จากการหมักวัสดุเศษเหลือของปลาตาโตแสดงใน Figure 5 โดยพบว่าปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วกระทั่งการหมักถึงเดือนที่ 2 จากนั้นจะมีปริมาณคงที่ตลอดระยะเวลาการหมักที่เหลือ การเติมหัวกึ่ง และ/หรือเครื่องในหมักร่วมหมักด้วยไม่มีผลให้ปริมาณของ TMA แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ซึ่งผลที่ได้แตกต่างจากการศึกษาของ นงลักษณ์ เกียรติตันสกุล (2541) และ พงษ์เทพ เกิดเนตร (2533) ที่พบว่าปริมาณ TMA ระหว่างหมักจะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น และลดลงในช่วงหลังของการหมัก ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณค่าที่ระเหยได้ทั้งหมด Sa[aguchi และคณะ (1981) รายงานว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณ TMA เมื่อหมักนานขึ้นนั้นเป็นผลจากการหมักทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย ที่สามารถเปลี่ยน ไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ให้เป็น ไตรเมทิลเอมีน แต่ในการศึกษานี้พบว่าปริมาณ TMA มีค่าลดลง (Figure 5) แสดงให้เห็นว่าอาจมีกลุ่มแบคทีเรียบางชนิดในการทดลองนี้มีการใช้ TMA เป็นสารอาหารหรือเจริญเติบโต Ho และคณะ (2008) รายงานว่าจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Paracoccus sp.* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบเกลือสามารถย่อยสลาย (Degradation) ไตรเมทิลเอมีน (TMA), ไดมethylเอมีน (DMA), และเมทิลเอมีน (MA) โดยสามารถย่อยสลาย TMA (>85%), DMA (>90%), and MA (>93%) เมื่อมีค่า pH อยู่ในช่วง 6-8 อีกทั้ง Kim และคณะ (2003) ระบุว่า *Paracoccus sp.* สามารถออกซิไดซ์ TMA ได้ DMA ซึ่งจะถูกรีดออกซิไดซ์ต่อไปได้เป็น MA โดยสุดท้าย MA สามารถออกซิไดซ์อย่างสมบูรณ์ได้ NH_3

ปริมาณเกลือที่ละลายในของเหลวจากการหมักในชุดหมักต่างๆ แสดงใน Figure 6 พบว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเกลือสามารถแบ่งได้เป็น 3 ช่วง คือ ในช่วง 2 เดือนแรกของการหมักพบว่าปริมาณเกลือมีค่าต่ำและคงที่ ช่วงที่ 2 ระหว่างเดือนที่ 2-4 ของการหมักปริมาณเกลือในของเหลวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีค่าสูงสุด และคงที่ในช่วงสุดท้ายระหว่างเดือนที่ 4-6 ส่งผลให้ปริมาณเกลือมีค่าระหว่างร้อยละ 26-29 หลังหมักนาน 3 เดือน ซึ่งเป็นสัดส่วนที่ถูกกำหนดไว้แล้วตั้งแต่ต้นเพราะแม้ว่าเกลือที่เติมลงไปเริ่มต้นคิดเป็นร้อยละ 20 ของตัวอย่างทั้งหมด (จากอัตราส่วนปลา (ตัวอย่าง) : เกลือ คือ 4:1) แต่เนื่องจากปลาหรือตัวอย่างที่ใช้ในการหมักมีความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 69-78 ดังนั้นปริมาณเกลือเริ่มต้นที่ถูกต้อง คือ ร้อยละ 26-29 ซึ่งเป็นอัตราส่วนของน้ำเกลืออิมตัว (น้ำเกลืออิมตัวมีเกลือเข้มข้นร้อยละ 26 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น น้ำเกลืออิมตัวจึงมีเกลือสูงขึ้น การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเกลือในการทดลองนี้ใกล้เคียงกับรายงานของ Disaraphong (2005) ที่พบว่าปริมาณเกลือในของเหลวมีค่าเพิ่มขึ้นในระยะแรกของการหมัก และเมื่อถึงเดือนที่ 2 ปริมาณเกลือมีค่าคงที่กระทั่งสิ้นสุดการหมัก โดยปริมาณเกลือในของเหลวเมื่อการหมักสิ้นสุดมีค่าระหว่างร้อยละ 28-30 โดยตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

ของน้ำปลาที่กำหนดให้มีปริมาณเกลือไม่ต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2526)

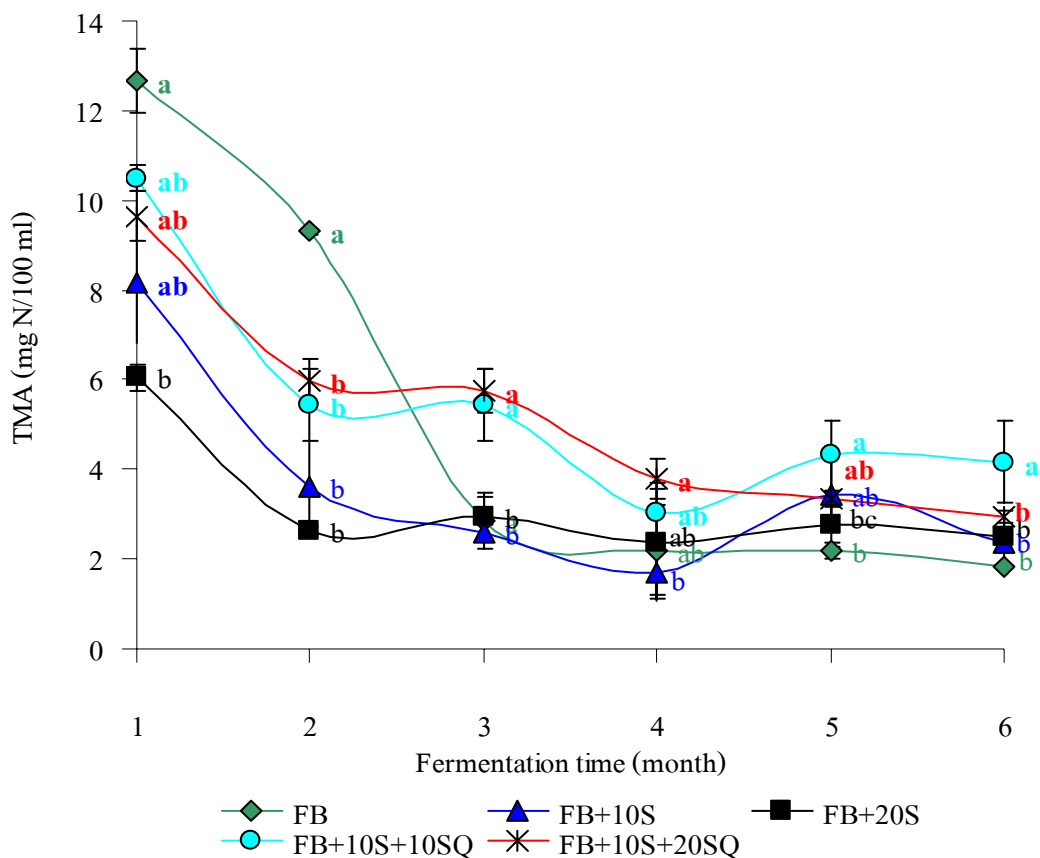


Figure 5. Trimethylamine (TMA) content of protein hydrolysates during fermentation of mixture of seafood by-products. Each treatment is described as Figure 1.

- ^(a-d) Mean values in a equal fermentation time with difference letters are significantly difference at $P < 0.05$.

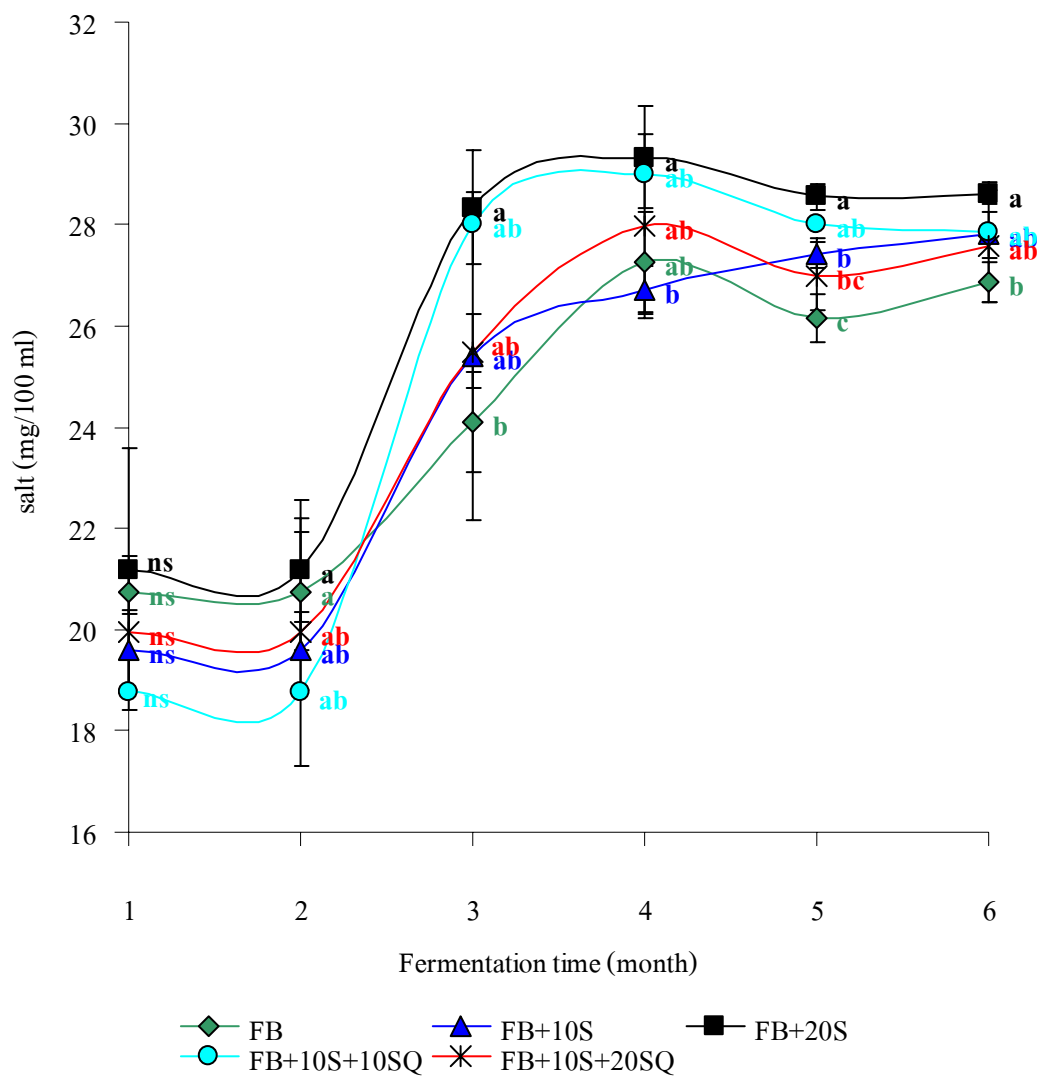


Figure 6. Salt content of protein hydrolysates during fermentation of mixture of seafood by-products. Each treatment is described as Figure 1.

- ^(a-d) Mean values in a equal fermentation time with difference letters are significantly difference at $P < 0.05$.

1.2.2 คุณลักษณะทางกายภาพ

ของเหลวที่ได้จากการหมักวัสดุเศษเหลือของปลาตาโตร่วมกับส่วนอื่น ๆ มีค่าพีเอช แสดงใน Table 9 ซึ่งพบว่าระยะเวลาหมักและการเติมหรือไม่เติมหัวกุ้งขาว หรือเครื่องในหมึก โดยรวมไม่มีผลให้ค่าพีเอชของของเหลวที่ได้จากการหมักแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ทั้งนี้อาจเป็นผลจาก เปปไทด์ กรดอะมิโน และสารประกอบไนโตรเจนที่ได้จากการย่อยโปรตีนต่าง มีสมบัติควบคุมการเปลี่ยนแปลงของพีเอช (บัฟเฟอร์) (อารีย์ มีสวัสดิ์, 2542) อย่างไรก็ตามเมื่อมีการเติมหัวกุ้งขาวและ/หรือเครื่องในหมึกในปริมาณที่เพิ่มขึ้นของเหลวที่ได้จากการหมักมีปริมาณของค่าพีเอชเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในชุด FB+10S+20SQ Taylor และคณะ (1987) กล่าวว่า การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชเป็นผลจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (Decarboxylation) และปฏิกิริยาดีอะมิเนชัน (Deamination) ซึ่งปฏิกิริยาชนิดหลังนี้เป็นผลจากการเกิด oxidative deamination ของกรดอะมิโนโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ *Pediococcus halophilus* ทำให้เกิดสารประกอบอะโรมาติกที่มีความเป็นกรด ได้แก่ formic, acetic, propionic, และ isobutyric มีผลให้ค่าพีเอชของน้ำปลาตกลง (Virulha [et al.](#), 2000) ส่วนกรณีที่ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นนั้นเป็นผลจากการหมักทำให้เกิดสารประกอบที่มีความเป็นด่าง (Aquerreta *et al.*, 2001) เช่น แอมโมเนีย เอมีน และ ไตรเมทิลเอมีน (Orejana and Liston, 1981; Hultmann and Rustad, 2004)

ค่าสีในของเหลวที่ได้จากการหมักวัสดุเศษเหลือของปลาตาโตร่วมกับวัสดุอื่น ๆ แสดงใน Figure 7 พบว่าการเติมเครื่องในหมึกมีผลให้ค่า L^* , a^* และ b^* ของของเหลวจากการหมักต่ำกว่าชุดทดลองอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากสีของหมึกมีสีดำ ในภาพรวมพบว่าค่า a^* และ b^* มีค่าเพิ่มขึ้นในระหว่างการหมัก ส่วนค่า L^* ลดลงเมื่อหมักครบ 2 เดือน จากนั้นมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและมีค่าคงที่กระทั่งการหมักครบ 6 เดือน สอดคล้องกับรายงานของ Disaraphong (2005) ที่พบว่าค่า L^* ลดลงเมื่อหมักครบ 4 เดือน และเพิ่มขึ้นในเดือนที่ 8 ของการหมัก และผลของงานวิจัยนี้พบว่าในชุดทดลองที่ไม่มีเครื่องในหมึก เมื่อมีการเพิ่มปริมาณหัวกุ้งมีผลให้ค่า L^* และ b^* ลดลง ในขณะที่ Klom [et al.](#) (2006) รายงานว่าค่า a^* และ b^* มีค่าเพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักน้ำปลา ส่วนค่า L^* ที่มีค่าลดลงนั้นเป็นผลจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่อาศัยเอนไซม์ (non-enzymtic browning) และ Kim และคณะ (2004) รายงานว่าค่า L^* , a^* และ b^* มีค่าลดลงในระหว่างการหมักน้ำปลาจนหมักครบ 6 เดือน จะมีค่าคงที่จนถึงสิ้นสุดการหมัก การที่ผลการทดลองของแต่ละผู้ทำการวิจัยแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าวัตถุดิบทั้งในแง่ของชนิด และคุณภาพที่ใช้ในการหมัก รวมทั้งสภาวะการหมัก และระยะเวลาการหมักที่ต่างกันส่งผลให้ได้ผลการทดลองที่ต่างกัน

Table 9. pH value of protein hydrolysates (of mixture of seafood by-products) during fermentation.

Treatment	Month					
	1	2	3	4	5	6
FB	6.61±0.02 ^{b,y}	6.91±0.12 ^{a,w}	6.69±0.22 ^{b,xy}	6.55±0.04 ^{b,y}	6.38±0.07 ^{b,z}	6.78±0.10 ^{a,x}
FB+10S	6.85±0.05 ^{ab,wx}	6.99±0.17 ^{a,w}	6.83±0.04 ^{ab,wx}	6.65±0.18 ^{b,xy}	6.48±0.11 ^{ab,y}	6.80±0.06 ^{a,wx}
FB+20S	6.91±0.13 ^{ab,wx}	7.15±0.01 ^{a,w}	6.90±0.12 ^{ab,xy}	6.79±0.10 ^{ab,yz}	6.63±0.06 ^{ab,z}	6.78±0.04 ^{a,yz}
FB+10S+10SQ	6.99±0.16 ^{ab,w}	7.05±0.05 ^{a,w}	6.85±0.16 ^{ab,w}	6.79±0.14 ^{ab,ns}	6.60±0.22 ^{ab,ns}	6.79±0.09 ^{a,ns}
FB+10S+20SQ	7.15±0.34 ^{a,wx}	7.15±0.28 ^{a,w}	7.00±0.08 ^{a,wx}	6.92±0.16 ^{a,wx}	6.72±0.11 ^{a,x}	6.75±0.24 ^{a,wx}

•FB = fish by-product (fish frame/salt = 4:1); FB+10S = FB+10% w/w shrimp cephalothorax; FB+20S = FB+20% w/w shrimp cephalothorax; FB+10S+10SQ = FB+10S+10 % w/w Squid viscera and FB+10S+20SQ = FB+10S+20% w/w Squid viscera and budu = commercial budu.

•Values represent means ± standard deviation; ^(a-d)Mean values in a column with difference letters are significantly difference at P < 0.05. ^(w-z)Mean values in a row with difference letters are significantly different at P < 0.05.

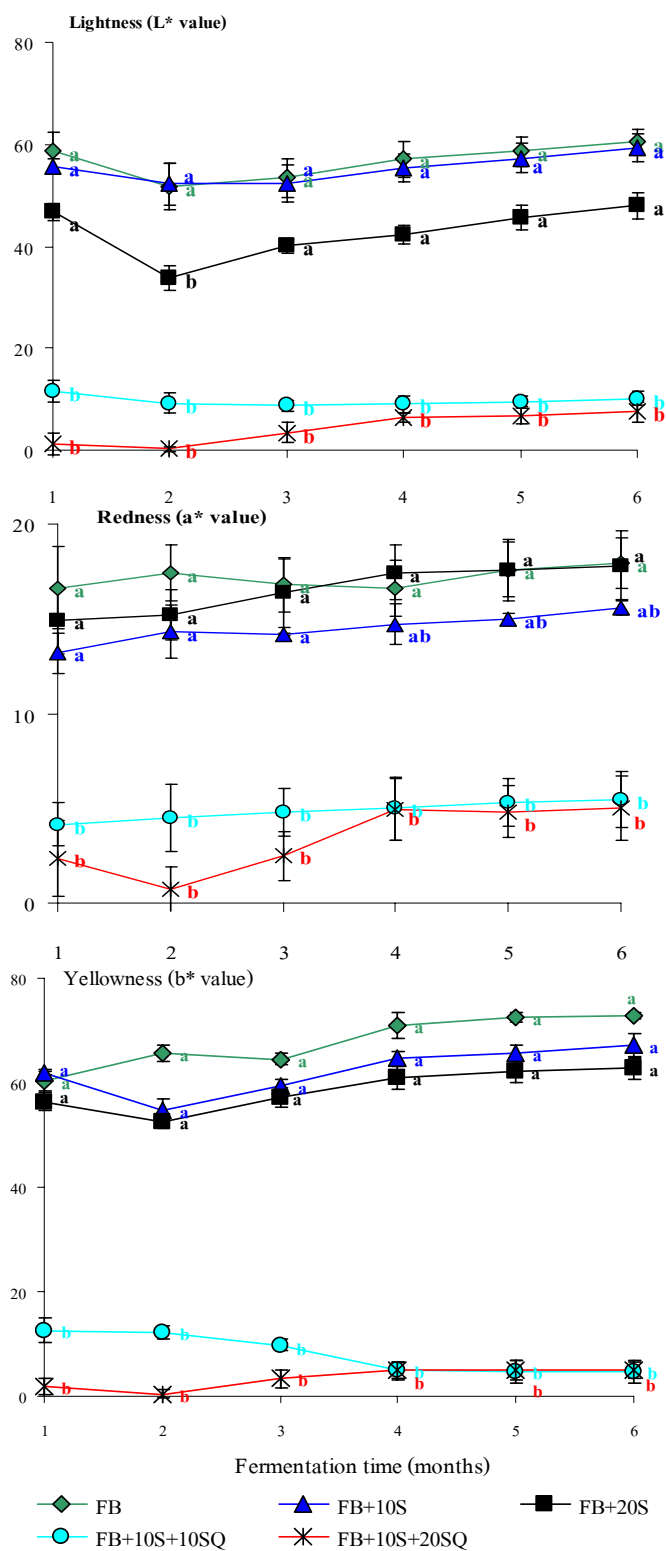


Figure 7. L*, a* and b* values of protein hydrolysates during fermentation of mixture of seafood by products. Each treatment is described as Figure 1.

- ^(a-d) Mean values in a equal fermentation time with difference letters are significantly difference at $P < 0.05$.

1.2.3 คุณลักษณะทางจุลินทรีย์

ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดในของเหลวที่ได้จากการหมักวัสดุเศษเหลือของปลาตาโต และวัสดุอื่นๆ แสดงดัง Figure 8 โดยในระยะ 2 เดือนแรกของการหมักที่มีปริมาณเกลือคงที่ (ร้อยละ 20) ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดมีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อย จากนั้นลดลงอย่างรวดเร็วซึ่งเป็นช่วงเดียวกับที่ปริมาณเกลือในของเหลวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วกระทั่งถึงเดือนที่ 4 จากนั้นปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนมีปริมาณคงที่ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Disaraphong (2005) ที่พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดลดลงเมื่อเวลาหมักน้ำปลาเพิ่มขึ้น และคงที่เมื่อหมักครบ 6 เดือน การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดในระหว่างการหมักช่วงแรกอาจเป็นผลจากความเข้มข้นของเกลือ ปริมาณ โปรตีน และอะมิโนไนโตรเจนเหมาะสมและเพียงพอต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เจริญในระหว่างการหมัก (อารีย์ มีสวัสดิ์, 2542) สายพิณ ไชยนันท์ และ นิวัฒน์ ฉายโชติเจริญ (2530) รายงานว่าการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียในช่วงแรก (0-30 วัน) เป็นผลจากการที่ช่วงแรกเกลือยังแพร่เข้าสู่เนื้อปลาได้น้อยทำให้แบคทีเรียที่ติดมากับวัตถุดิบสามารถมีชีวิตอยู่ได้ ส่วนผลที่ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดมีค่าลดลงหลังหมักครบ 3 เดือน สอดคล้องกับรายงานของพงษ์เทพ เกิดเนตร (2533) ที่พบว่าใน 10 วันแรกของการหมักจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นจากนั้นจะค่อยๆลดลงจนมีปริมาณต่ำสุดในวันที่ 50 ของการหมัก แสดงว่าระยะนี้เกลือได้แพร่เข้าไปในเนื้อปลาอย่างสมบูรณ์ทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ และเกิดการทำลายแบคทีเรียที่ไม่ทนหรือไม่ชอบเกลือ นอกจากนี้ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดแปรผกผันกับปริมาณค่าที่ระเหยได้ทั้งหมด (Figure 4) และปริมาณเกลือ (Figure 6) ทั้งนี้เพราะเกลือมีบทบาทจำกัดแบคทีเรียที่ไม่ทนเกลือหรือไม่ชอบเกลือในระหว่างการหมัก (นงลักษณ์ เกียรติตันสกุล, 2541) ทำให้ของเหลวที่ได้จากการหมักเป็นระยะเวลา 1 เดือน มีปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดระหว่าง 4.11-4.76 log CFU/ml และมีปริมาณลดลงเป็น 3.21-3.90 log CFU/ml เมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 6 เดือน

ปริมาณของฮาโลฟิลิกแบคทีเรีย (Halophilic bacteria) ในของเหลวที่ได้จากการหมักวัสดุเศษเหลือของปลาตาโตและวัสดุอื่นๆ แสดงดัง Figure 9 โดยฮาโลฟิลิกแบคทีเรียมีปริมาณลดลงในช่วงแรกของการหมัก จากนั้นจึงเริ่มคงที่ ยกเว้นในชุดทดลอง FB+20S ที่เปลี่ยนแปลงในลักษณะที่ต่างจากชุดอื่นๆ และมีปริมาณฮาโลฟิลิกแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเมื่อหมักครบ 5 เดือน ก่อนลดลงเล็กน้อยในเดือนที่ 6 โดยมีปริมาณของแบคทีเรียชอบเกลืออยู่ระหว่าง 3.61-3.85 log CFU/ml ซึ่งมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงแตกต่างจากรายงานของ Lopetcharat และคณะ (2002) ที่ระบุว่าปริมาณแบคทีเรียชอบเกลือในระหว่างการหมักเพิ่มขึ้นภายหลังหมักครบ 10 วัน จากนั้นจะลดลง

เมื่อหมักถึงวันที่ 20 และมีปริมาณคงที่จนถึงสิ้นสุดการหมัก แต่สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Disaraphong (2005) ที่พบว่าปริมาณฮาโลฟิลิกแบคทีเรียลดลงอย่างรวดเร็วในระหว่างการหมัก 5 เดือนแรก และมีปริมาณคงที่จนหมักครบ 12 เดือน แสดงให้เห็นว่าชนิดของฮาโลฟิลิกแบคทีเรียในอาหารหมัก แต่ละประเภทอาจมีความสามารถในการเจริญในสภาพที่มีเกลือได้แตกต่างกัน

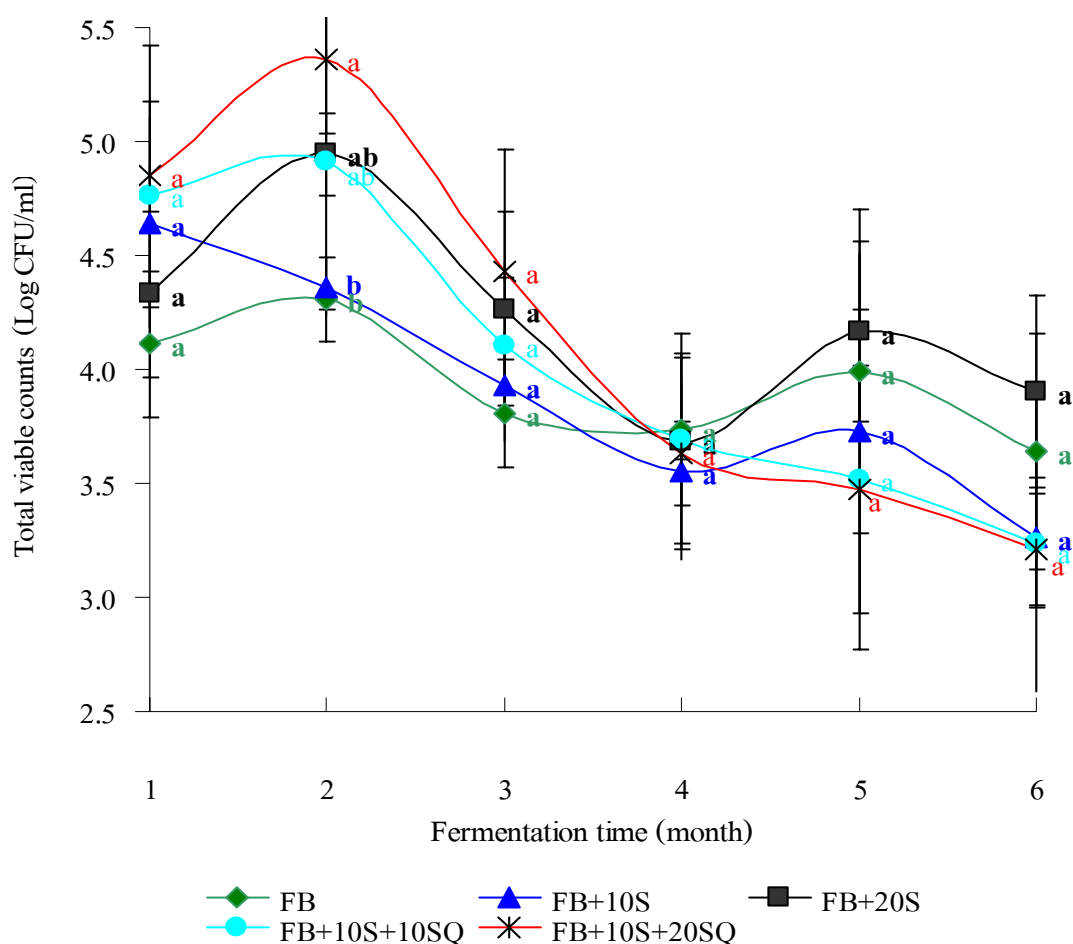


Figure 8. Total viable counts (log CFU/ml) of protein hydrolysates during fermentation of mixture of seafood by-products. Each treatment is described as Figure. 1.

- ^(a-d) Mean values in a equal fermentation time with difference letters are significantly difference at $P < 0.05$

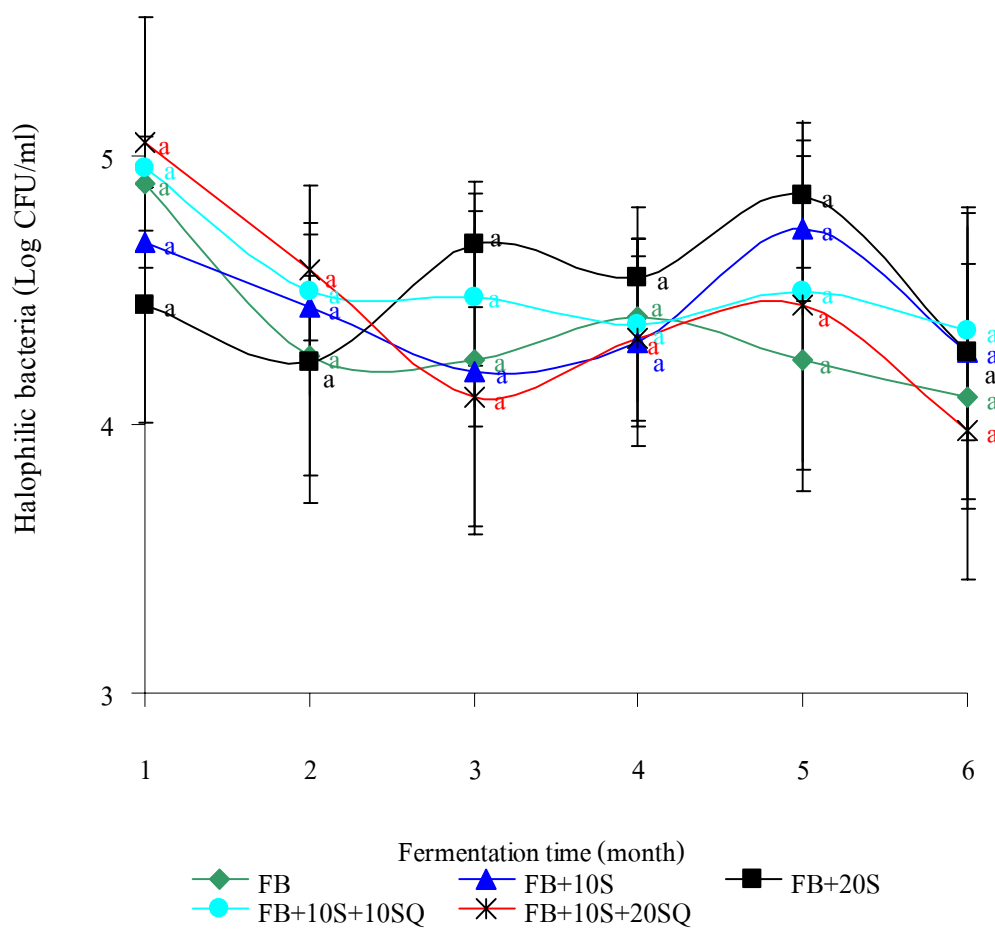


Figure 9. Halophilic bacteria of protein hydrolysates during fermentation of mixture of seafood by-products. Each treatment is described as Fig. 1.

- ^(a-d) Mean values in a equal fermentation time with difference letters are significantly difference at $P < 0.05$.

1.3 คุณภาพประสาทสัมผัสและองค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสท

การยอมรับทางประสาทสัมผัสต่อโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากการหมักเศษเหลือของปลาตาโตร่วมกับวัสดุอื่นๆ เปรียบเทียบกับบุงูที่ผลิต และจำหน่ายในทางการค้า (Table 10) พบว่าการยอมรับในด้านสี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม ของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเศษเหลือปลาตาโต และจากชุดหมักที่เติมหัวกุ้งขาวร่วมหมักด้วย (FB, FB+10S และ FB+20S) และบุงูทางการค้าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ส่วนชุดทดลองอื่นๆ (ชุดที่มีการเติมเครื่องในหมัก) มีคะแนนการยอมรับในทุกด้านต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญเพราะน้ำหมักจากเครื่องในหมักทำให้ของเหลวที่ได้จากการหมักมีสีดำซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ของผู้บริโภค

ผลวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสทเมื่อการหมักสิ้นสุด แสดงให้เห็นว่าของเหลวที่ได้จากการหมักวัสดุเศษเหลือซึ่งได้แก่ วัสดุเศษเหลือของปลาตาโตผสมหัวกุ้งขาว วัสดุเศษเหลือของปลาตาโตผสมหัวกุ้งขาว และเครื่องในหมัก และวัสดุเศษเหลือของปลาตาโต เป็นเวลา 6 เดือนมีคุณภาพเทียบเท่ากับปลาเกรด 2 โดยมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 15-20 กรัมต่อลิตร ปริมาณอะมิโนไนโตรเจนอยู่ในช่วง 10.45-11.69 กรัมต่อลิตร มีปริมาณเกลือระหว่างร้อยละ 26-29 มีค่าพีเอชระหว่าง 6.75-6.80 และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน 1×10^4 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

Table 10. Sensory test of fish protein hydrolysate fermented with various ratio fish fillets by-products, shrimp cephalothorax and squid viscera and commercial budu

Treatment	Sensory test						
	Appearance	Color	Odor	Taste	Flavour	Overall liking	saltiness
FB	6.97±2.11a	7.41±1.27a	6.31±1.95a	5.52±2.92b	6.07±2.72b	6.07±2.67a	5.14±2.92bc
FB+10S	6.28±2.22a	6.31±1.75b	6.34±1.97a	5.72±2.36b	6.03±2.04b	6.00±2.02a	5.00±2.48bc
FB+20S	6.38±1.90a	6.38±1.80b	5.79±2.51a	5.97±2.49ab	5.59±2.41b	6.24±2.12a	5.34±2.51b
FB+10S+10SQ	3.34±2.09b	3.41±1.92c	3.72±1.91b	3.90±2.08c	3.59±2.03c	4.07±1.89b	3.97±2.01c
FB+10S+20SQ	3.83±2.17b	3.83±2.11c	3.76±2.21b	4.79±2.09bc	4.17±1.91c	4.45±2.05b	4.86±2.06bc
Budu	7.28±1.60a	7.07±1.56ab	6.79±1.78a	7.07±1.10a	7.24±1.38a	7.14±1.25a	6.66±1.76a

•FB = fish by-product (fish frame/salt = 4:1); FB+10S = FB+10% w/w shrimp cephalothorax; FB+20S = FB+20% w/w shrimp cephalothorax; FB+10S+10SQ = FB+10S+10 % w/w Squid viscera and FB+10S+20SQ = FB+10S+20% w/w Squid viscera and budu = commercial budu.

•Values represent means ± standard deviation.; (a-d) Mean values in a column with different letters are significantly different at P < 0.05.

1.4 สมบัติด้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสท

การวิเคราะห์สมบัติด้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากทุกชุดหมักโดยประเมินจากค่าความสามารถรีดิวส์ และความสามารถต้านอนุมูลอิสระของ DPPH และ ABTS ของโปรตีนไฮโดรไลเสทแสดงใน Table 11 พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากชุดหมักที่เติมเครื่องในหมักร่วมหมักกับเศษเหลือของปลาคาโต (FB+10S+10SQ และ FB+10S+20SQ) มีสมบัติการเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (reducing power) ที่ดีกว่าชุดหมักอื่นๆ และบุคลากรค้าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มปริมาณเครื่องในหมักมีผลให้ค่า reducing power ของโปรตีนไฮโดรไลเสทสูงขึ้น สำหรับสมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ที่แสดงค่าในหน่วยปริมาณของ Trolox (mmol) ของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากชุดหมักที่เติมหัวกุ้งขาวร้อยละ 20 (FB+20S) มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระทั้งสองชนิดสูงสุด แต่สมบัติดังกล่าวไม่แตกต่างจากชุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) Wu และคณะ (2003) พบว่าคาร์โนซีน (carnosine) และ แอนซีรีน (anserine) ซึ่งเป็นไดเปปไทด์ที่พบในโปรตีนไฮโดรไลเสทจากปลาแม็คเคอเรล (macarel) สามารถแสดงสมบัติการเป็นตัวให้อิเล็กตรอน การศึกษาของ Klonpong และคณะ (2007) และ Thaisila และคณะ (2007) พบว่าค่า reducing power ในโปรตีนไฮโดรไลเสทสูงขึ้นเมื่ออัตราการย่อยโปรตีน (Degree of hydrolysis, DH) เพิ่มขึ้น Binsan (2007) พบว่าความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระของ DPPH และ ABTS มีความสัมพันธ์กับปริมาณฟอรั่มัลไนโตรเจน และอะมิโนไนโตรเจนในลักษณะที่โปรตีนไฮโดรไลเสทจะมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้เพิ่มขึ้นเมื่อมีปริมาณสารทั้งสองกลุ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้พบว่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระจากชุดหมักที่เติมหัวกุ้งขาว (FB+20S) อาจเป็นผลรวมจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาสีน้ำตาล ซึ่งรายงานผลการวิจัยโดยคณะต่างๆ ได้แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยานี้มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (Jing and Kitts, 2002; Mura *et al.*, 2002; Morales and Jimenez-Perez, 2001) ดังนั้นเมื่อพิจารณาคุณภาพด้านต่างๆ โดยรวมถึงคัดเลือกชุดการทดลองที่เติมหัวกุ้งร้อยละ 20 (FB+20S) สำหรับการศึกษานี้ต่อไป

Table 11. Antioxidative activities of fish protein hydrolysate fermented with various ratio fish fillets by-products, shrimp cephalothorax and squid viscera and commercial budu

Treatment	Reducing power	ABTS	DPPH
		(mmol Trolox /ml sample \pm SD)	
FB ¹	0.622 \pm 0.01 ⁷ c	2.083 \pm 0.02e	0.102 \pm 0.00c
FB+10S ²	0.590 \pm 0.00c	2.430 \pm 0.03d	0.079 \pm 0.00d
FB+20S ³	0.551 \pm 0.00d	3.620 \pm 0.01a	0.153 \pm 0.00a
FB+10S+10SQ ⁴	0.730 \pm 0.01b	3.279 \pm 0.09b	0.100 \pm 0.00c
FB+10S+20SQ ⁵	0.824 \pm 0.03a	2.902 \pm 0.01c	0.122 \pm 0.03b
Budu ⁶	0.383 \pm 0.01e	3.660 \pm 0.06a	0.159 \pm 0.02a

^{1,2,3,4,5,6}FB = fish by-product (fish frame/salt = 4:1); FB+10S = FB+10% w/w shrimp cephalothorax; FB+20S = FB+20% w/w shrimp cephalothorax; FB+10S+10SQ = FB+10S+10 % w/w Squid viscera; FB+10S+20SQ = FB+10S+20% w/w Squid viscera and budu = commercial budu.

⁷Values represent means \pm standard deviation.; (a-e) Mean values in a column with different letters are significantly different at P < 0.05.

2. คุณภาพของบุดูปรงรสพาสเจอร์ไรซ์ระหว่างการเก็บรักษา

2.1 คุณภาพทางกายภาพ

ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาเก็บรักษาต่อค่าคุณกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ของส่วนที่เป็นของเหลวจากผลิตภัณฑ์บุดูปรงรสพาสเจอร์ไรซ์แสดงดัง Figure 10 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นมีผลให้ค่าคุณกลืนแสงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่อุณหภูมิเก็บรักษาไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าคุณกลืนแสงอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ยกเว้นในช่วงสัปดาห์ที่ 10 ถึง 12 ของการเก็บรักษา ที่พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีค่าคุณกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร สูงสุด ($p < 0.05$) ค่าคุณกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร แสดงปริมาณของสารสีน้ำตาลที่เป็นผลิตภัณฑ์ในระยะสุดท้ายของปฏิกิริยาสร้างสีน้ำตาล (Ajandouz *et al.*, 2001; Morales and Jimenez-Perez, 2001) เนื่องจากผลิตภัณฑ์บุดูปรงรสพาสเจอร์ไรซ์ประกอบด้วย เปปไทด์ และกรดอะมิโนอิสระจากโปรตีนไฮโดรไลเซต และน้ำตาลซูโครสที่ใช้ปรงรส ซึ่งองค์ประกอบทั้งสองกลุ่มเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาสร้างสีน้ำตาลชนิดที่ไม่ได้เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ (Maillard reaction) (Labuza and Baisier, 1992; Van Boel, 1998) ประกอบกับอุณหภูมิและเวลาเป็นปัจจัยสำคัญต่ออัตราเร็ว และระดับของการเกิดปฏิกิริยานี้ (Ames, 1990; Wijewickreme *et al.*, 1999) ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของค่าคุณกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร จึงแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

ค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์ในระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆแสดงดัง Table 12 ในภาพรวมพบว่าค่าพีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอายุเก็บรักษา อย่างไรก็ตามในระหว่างการเก็บรักษานาน 12 สัปดาห์ พบว่าค่าพีเอชเปลี่ยนไปน้อยกว่า 1 หน่วย เนื่องจากผลิตภัณฑ์บุดูปรงรสมีการบรรจุในสภาพกึ่งสุญญากาศ และผ่านการให้ความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรซ์ ดังนั้นการเก็บรักษาให้ผลิตภัณฑ์ที่มีค่าพีเอชต่ำกว่า 5.0 จึงมีความสำคัญต่อการทำให้ผลิตภัณฑ์ปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium botulinum* (Betts, 1998) ผลการศึกษาดังกล่าวจึงแสดงให้เห็นว่า ผลิตภัณฑ์ยังคงปลอดภัยต่อการบริโภค และแม้ว่าผลวิเคราะห์ค่าคุณกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาสร้างสีน้ำตาลยังคงเกิดขึ้น ซึ่งทราบกันดีว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาดังกล่าวคือ กรดอินทรีย์ เช่น กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก แต่ไม่พบว่าการเกิดปฏิกิริยาชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์ที่จะมีผลให้ค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลง ทั้งนี้อาจเป็นผลจาก เปปไทด์ กรดอะมิโน และสารประกอบไนโตรเจนที่ได้จากการย่อยโปรตีนต่างมีสมบัติควบคุมการเปลี่ยนแปลงของพีเอช (บัฟเฟอร์) (อารีย์ มีสวัสดิ์, 2542)

ค่าสีของของเหลวของผลิตภัณฑ์บรูว์รสพาสเจอร์ไรซ์ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆแสดงดัง Figure 11 พบว่าเมื่ออายุการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ค่า L^* และ b^* มีค่าลดลง ในขณะที่ค่า a^* เพิ่มขึ้นในช่วง 6 สัปดาห์แรกของการเก็บรักษา ต่อจากนั้นจะมีค่าคงที่ตลอดการเก็บรักษา โดยอุณหภูมิของการเก็บรักษาที่แตกต่างกันไม่มีผลให้ค่าสีของผลิตภัณฑ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของค่า L^* ที่ลดลงนั้นเป็นการเปลี่ยนแปลงในลักษณะที่ตรงกันข้ามกับการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (Figure 11) ดังนั้นการเกิดสารสีน้ำตาลโดยปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลจึงอาจมีส่วนทำให้ค่า L^* ลดลง ซึ่งค่า L^* ที่ลดลงเป็นผลจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่อาศัยเอนไซม์ (non-enzymtic browning) (Lopetcharat *et al.*, 2001) เช่นเดียวกับ Disaraphong (2005) ที่รายงานว่าค่า L^* ลดลง และค่า a^* เพิ่มขึ้นเป็นผลจากการเกิดสารสีน้ำตาลโดยปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่มากขึ้น

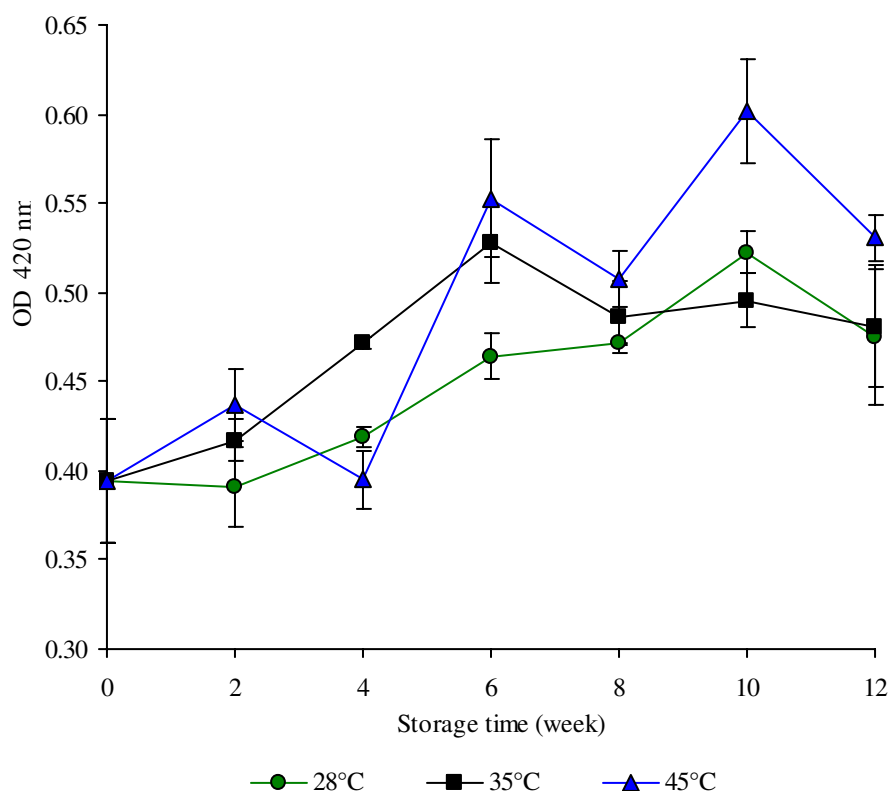


Figure 10. Browning intensity of pasteurized seasoning SPH during storage at 28, 35, and 45 °C

Table 12. pH value of pasteurized seasoned SPH during storage at 28, 35, and 45 °C

Treatment (°C)	Wee □						
	0	2	4	6	8	10	12
28	4.21±0.02 ^{a,z}	4.29±0.00 ^{a,y}	4.32±0.01 ^{a,x}	4.38±0.0 ^{a,w}	4.46±0.01 ^{a,v}	4.61±0.01 ^{b,u}	4.71±0.01 ^{b,t}
35	4.21±0.02 ^{a,y}	4.35±0.00 ^{a,xy}	4.30±0.00 ^{a,x}	4.38±0.02 ^{a,w}	4.54±0.05 ^{a,v}	4.63±0.01 ^{b,u}	4.74±0.01 ^{b,t}
45	4.21±0.02 ^{a,y}	4.29±0.00 ^{a,x}	4.28±0.00 ^{a,x}	4.42±0.01 ^{a,w}	4.46±0.02 ^{a,v}	4.72±0.02 ^{a,u}	4.80±0.01 ^{a,t}

•Values represent means ± standard deviation.; ^(a-c) Mean values in a column with different letters are significantly different at P < 0.05.

^(w-z) Mean values in a row with different letters are significantly different at P < 0.05.

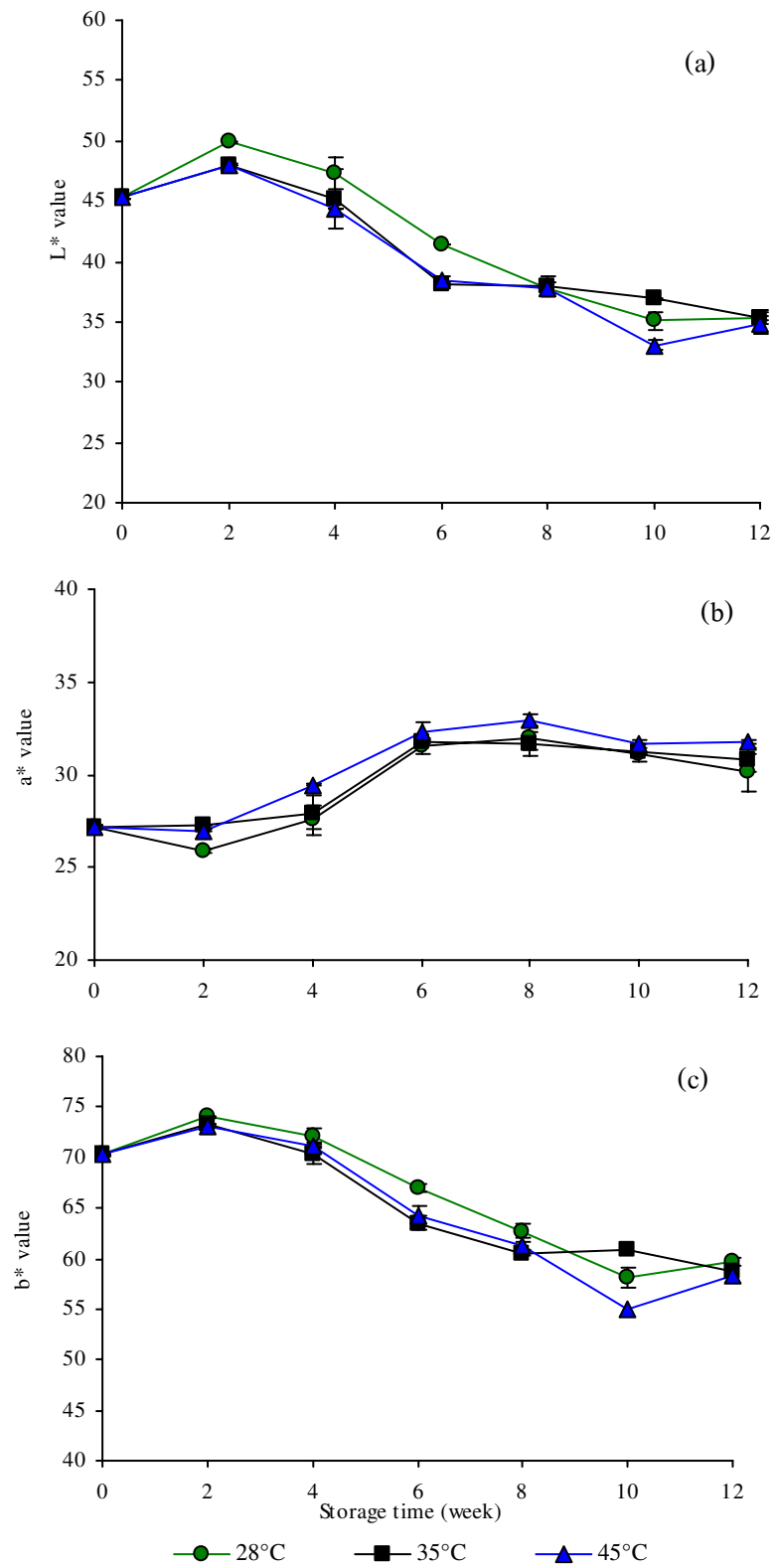


Figure 11. L*(a), a* (b), and b*(c) values of pasteurized seasoning SPH during storage at 28, 35, and 45 °C.

2.2 คุณภาพทางด้านเคมี

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic acid) ของบวบปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์ในส่วนองของของเหลว และของแข็งแสดงดัง Figure 12 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในส่วนองของเหลว (Figure 12a) มีค่าเพิ่มขึ้นในระยะแรกของการเก็บรักษา หลังจากนั้นจะมีปริมาณลดลงตลอดการเก็บรักษา ในภาพรวมอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาที่ต่างกันไม่มีผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในผลิตภัณฑ์ ณ ระยะเวลาเก็บรักษาเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) สารประกอบฟีนอลิกพบมากในพืช ผัก ผลไม้และเครื่องดื่มบางชนิด เช่น ชา กาแฟ ไวน์และน้ำผลไม้ (วิวัฒน์ หวังเจริญ, 2545) ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในระยะแรกของการเก็บรักษา อาจเป็นเพราะการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกจากพืชสมุนไพรและเครื่องเทศบางส่วนลงสู่ส่วนของของเหลวในผลิตภัณฑ์ (Katina *et al.*, 2007) หรือเพราะสารประกอบไนโตรเจนของของเหลวในผลิตภัณฑ์เองสามารถทำปฏิกิริยากับสารฟอลิน Folin-Ciocalteu ได้ด้วย จึงทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีค่ามากกว่าที่ควรจะเป็น (Prior *et al.*, 2005) แต่หลังจากเก็บรักษาครบ 4 สัปดาห์ กลับมีปริมาณลดลงอาจเป็นผลจากสารประกอบไนโตรเจนดังกล่าวถูกนำไปใช้ในปฏิกิริยาเกิดสีน้ำตาล ซึ่งแสดงผลการเพิ่มขึ้นของปฏิกิริยานี้ด้วยค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรที่สูงขึ้นดัง Figure 10 เป็นผลให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงสัปดาห์ 10 โดยมีค่าลดลงคิดเป็นร้อยละ 75 ของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเริ่มต้น และค่าลดลงอาจเป็นผลดังรายงานของ Benitez และคณะ (2002) ที่พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจะมีค่าลดลงระหว่างการเก็บรักษาไวน์ (sherry wine) โดยความร้อนทำให้สารประกอบฟีนอลิกเกิดการสลายตัว (Jacóman and Smith, 1996; Kim and Pratt, 1992) เช่นเดียวกับ Katsube และคณะ (2009) ที่พบว่าความร้อนทำให้เกิดการสลายของสารประกอบฟีนอลิกได้

ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากของแข็งของบวบปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์ในระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 3 เดือน แสดงดัง Figure 12b พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆในช่วง 8 สัปดาห์แรกของการเก็บรักษา ยกเว้นในเดือนที่ 2 พบว่าชุดทดลองที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าชุดทดลองอื่น จากนั้นมีค่าเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 10 และลดลงเล็กน้อยเมื่อเก็บรักษาครบ 12 สัปดาห์ โดยอุณหภูมิของการเก็บรักษาทำให้อัตราการเพิ่มขึ้นของสารประกอบฟีนอลิกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในระหว่างการเก็บรักษา 8 สัปดาห์แรก แต่หลังจากนั้นผลของอุณหภูมิเก็บรักษาไม่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยในสัปดาห์ที่ 10 พบว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าเพิ่มขึ้นสูงสุด ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการสูญเสียโครงสร้างที่แข็งแรงของผักและเครื่องเทศในระดับที่ทำให้เกิดการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิก โดยสอดคล้องกับรายงานที่พบว่าอุณหภูมิ

และกระบวนการไฮโดรไลซิสในระหว่างการเก็บรักษาอาหารเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการย่อยสลายประกอบฟีนอลิกเชิงซ้อนหรือสารประกอบฟีนอลิกที่จับอยู่กับสารประกอบอื่น เช่น น้ำตาล เป็นต้น ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอิสระเพิ่มขึ้น (Recamales *et al.*, 2006) แต่เมื่อเก็บรักษาครบ 12 สัปดาห์มีค่าลดลงทั้งนี้อาจเป็นผลจากความร้อนทำให้เกิดการสลาย (degradation) ของสารประกอบโพลีฟีนอลิก โดยพบว่า การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40, 60 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2, 4, 6, 8 และ 10 ชั่วโมง ส่งผลให้ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดใบหม่อนด้วยน้ำมีค่าลดลง (Katsube *et al.*, 2009) สอดคล้องกับการทดลองของ Larrauri และคณะ (1997) ศึกษาผลของความร้อนต่อปริมาณโพลีฟีนอลิกและกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของเปลือกองุ่นแดง (red grape pomace peels) โดยพบว่าความร้อนส่งผลให้ปริมาณ โพลีฟีนอลิกทั้งหมด และกิจกรรมการต้านออกซิเดชันมีค่าลดลง เมื่อเทียบกับชุดควบคุมคือเปลือกองุ่นแดงที่ทำแห้งแบบฟรีสซ์ดรายด์เมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษาปริมาณของสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากของแข็งของบุดูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์มีค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 42-66 ของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในส่วน ของแข็งของผลิตภัณฑ์เริ่มต้น และพบว่าร้อยละ 92 ของปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ในผลิตภัณฑ์บุดูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์ใน 1 หน่วยบรรจุ (250 กรัม) มาจากส่วนของแข็งของผลิตภัณฑ์

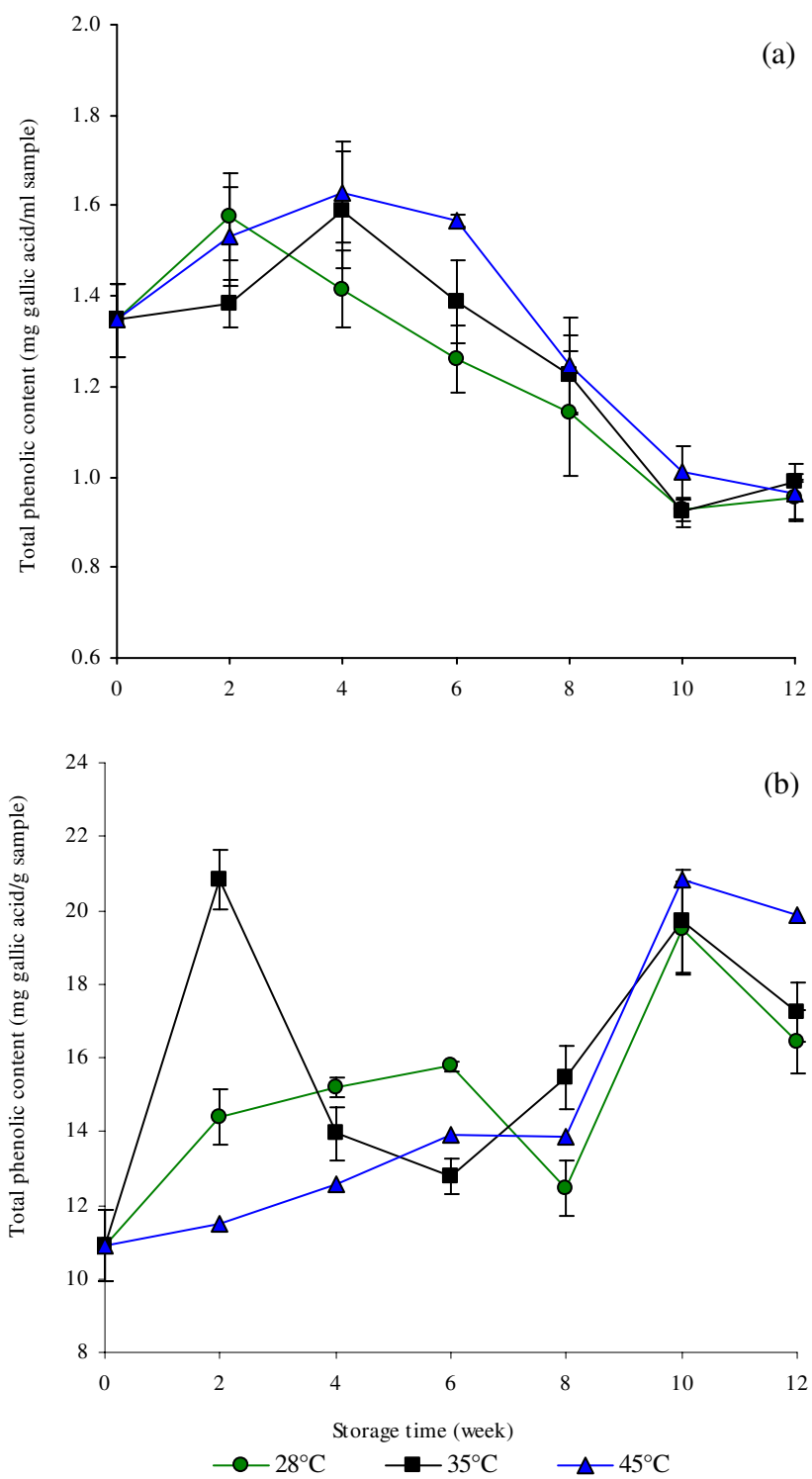


Figure 12. Total phenolic content (mg of gallic acid) in liquid phase (a), solid phase (b) of pasteurized seasoning SPH during storage at 28, 35, and 45 °C

2.2.1 สมบัติต้านออกซิเดชัน

สมบัติการเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (reducing power) ของของเหลวในบุดูปรุงรส พาสเจอร์ไรซ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆแสดงใน Figure 13a ในภาพรวมสมบัติการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนมีค่าเพิ่มขึ้นตามอายุการเก็บรักษา ผลการศึกษานี้ยังพบว่าความสามารถในการรีดิวส์ของของเหลวในผลิตภัณฑ์มีความสัมพันธ์กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (Figure 10) หรืออีกนัยหนึ่งผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าความสามารถรีดิวส์ของของเหลวมีความสัมพันธ์กับการเกิดปฏิกิริยาสร้างสีน้ำตาล ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yoshimura และคณะ (1997) ที่พบว่าสมบัติการเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (reducing power) ของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาสร้างสีน้ำตาลเพิ่มขึ้นตามความเข้มของสีน้ำตาล (browning intensity) สำหรับผลของอุณหภูมินั้นพบว่าความสามารถรีดิวส์ของผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสูงกว่าในผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำๆ สอดคล้องกับการศึกษาในระบบจำลองของ Wijewarane และคณะ (1997) ที่พบว่าค่า reducing power ของสารละลายที่ประกอบด้วยสารละลายกลูโคส และไลซีน (lysine) และสารละลายฟรุกโตส (fructose) กับไลซีนเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิที่ใช้บ่มสารละลายสูงขึ้น เช่นเดียวกับ Yoshimura และคณะ (1997) พบว่าสารประกอบที่ได้จากปฏิกิริยาสร้างสีน้ำตาลที่สามารถให้อิเล็กตรอนโดยเฉพาะสารที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิของการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น

ผลของระยะเวลาเก็บรักษามีผลทำให้ค่า reducing power ของสารสกัดจากส่วนของแข็งของบุดูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ (Figure 13b) มีค่าลดลงเมื่อเก็บรักษาครบ 2 สัปดาห์ จากนั้นเพิ่มขึ้น และมีค่าสูงสุดเมื่อเก็บรักษานาน 8 สัปดาห์ ทั้งนี้อาจเป็นผลเช่นเดียวกับรายงานของ Shobana และ Naidu (2000) พบว่าการให้ความร้อนแก่สารสกัดกระเทียม จิง กานพลู อบเชยและพริกไทย ทำให้กิจกรรมการต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้น เนื่องจากความร้อนทำให้สารต้านออกซิเดชันที่จับอยู่กับสารอื่นถูกปลดปล่อยออกมา ทำให้มีกิจกรรมต้านออกซิเดชันสูงขึ้น เช่นเดียวกับ Jeong และคณะ (2004) ที่รายงานว่า การปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในโครงสร้างผนังเซลล์ของเปลือกส้ม โดยความร้อนมีผลให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และค่า reducing power เพิ่มขึ้น ส่วนงานวิจัยนี้เมื่อระยะเวลาเก็บรักษาเพิ่มขึ้นหลัง 8 สัปดาห์ พบว่าความสามารถรีดิวส์ของสารสกัดจากส่วนของแข็งลดลงอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการเก็บรักษา โดยอุณหภูมิของการเก็บรักษาที่ต่างกันไม่มีผลให้ค่า reducing power ของสารสกัดจากส่วนของแข็งของผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่เวลาเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ยกเว้นหลังการเก็บรักษานาน 8 สัปดาห์ ในชุดการทดลองที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะมีค่าดังกล่าวสูงกว่าทุกชุดทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งการลดลงของค่า reducing power หลังเก็บรักษานาน 8 สัปดาห์

อาจเป็นผลจากสารประกอบฟีนอลิกที่สลายตัวออกจากโครงสร้างของพืชสมุนไพรสูญเสียเข้าสู่ส่วนที่เป็นของเหลวของผลิตภัณฑ์ และอาจเป็นผลจากอุณหภูมิในระหว่างการเก็บรักษาที่นานขึ้นทำให้เกิดการสลาย (degradation) ของสารประกอบโพลีฟีนอลิกส่งผลให้ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดมีค่าลดลง (Katsube *et al.*, 2009) ซึ่งส่งผลให้ค่า reducing power ของสารสกัดจากส่วนของแข็งของผลิตภัณฑ์ลดลง

การวิเคราะห์ความสามารถจับอนุมูลอิสระของ DPPH ในส่วนของเหลวในผลิตภัณฑ์ (Figure 14a) แสดงให้เห็นว่ามีค่าคงที่ในช่วง 2 สัปดาห์แรกของการเก็บรักษา ก่อนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และสูงสุดเมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษา ในขณะที่อุณหภูมิของการเก็บรักษาที่ต่างกัน ไม่มีผลให้ค่าความสามารถจับอนุมูลอิสระของ DPPH ของส่วนของเหลวในผลิตภัณฑ์แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าสมบัติยับยั้งอนุมูลอิสระของ DPPH (Figure 14a) และค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (Figure 10) ของของเหลวในบรูคคิงเจอร์ไรซ์มีการเปลี่ยนแปลงที่สอดคล้องกัน ดังนั้นการเพิ่มความสามารถจับอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์เมื่อเวลาเก็บรักษาเพิ่มขึ้นนี้อาจเป็นผลจากการเกิดปฏิกิริยาสร้างสีน้ำตาลในผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งผลการศึกษาโดยนักวิจัยหลายคณะที่แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาสร้างสีน้ำตาลมีสมบัติยับยั้งอนุมูลอิสระของ DPPH (Jing and Kitts, 2002; Mura *et al.*, 2002; Morales and Jimenez-Perez, 2001)

สมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากของแข็งในบรูคคิงเจอร์ไรซ์ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิต่างๆ พบว่าลดลงอย่างรวดเร็วใน 6 สัปดาห์แรกของการเก็บรักษา จากนั้นมีค่าคงที่จนถึงสัปดาห์ที่ 12 (Figure 14b) ทั้งนี้อาจเป็นผลจากสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดจากของแข็งในบรูคคิงเจอร์ไรซ์เป็นชนิดที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ต่ำ หรือเป็นผลจากการสูญเสียสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่ฟีนอลิกซึ่งมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินซีที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในพริกจีหนู (Ching and Mohamed, 2001) และแคโรทีนอยด์ (Sioris *et al.* and Haard, 2007) ในระหว่างการเก็บรักษา นอกจากนี้อาจเป็นผลร่วมจากการสูญเสียสารประกอบฟีนอลิกที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ดีเข้าสู่ส่วนของเหลวของผลิตภัณฑ์จึงทำให้สารสกัดจากของแข็งมีสมบัตินี้ลดลง

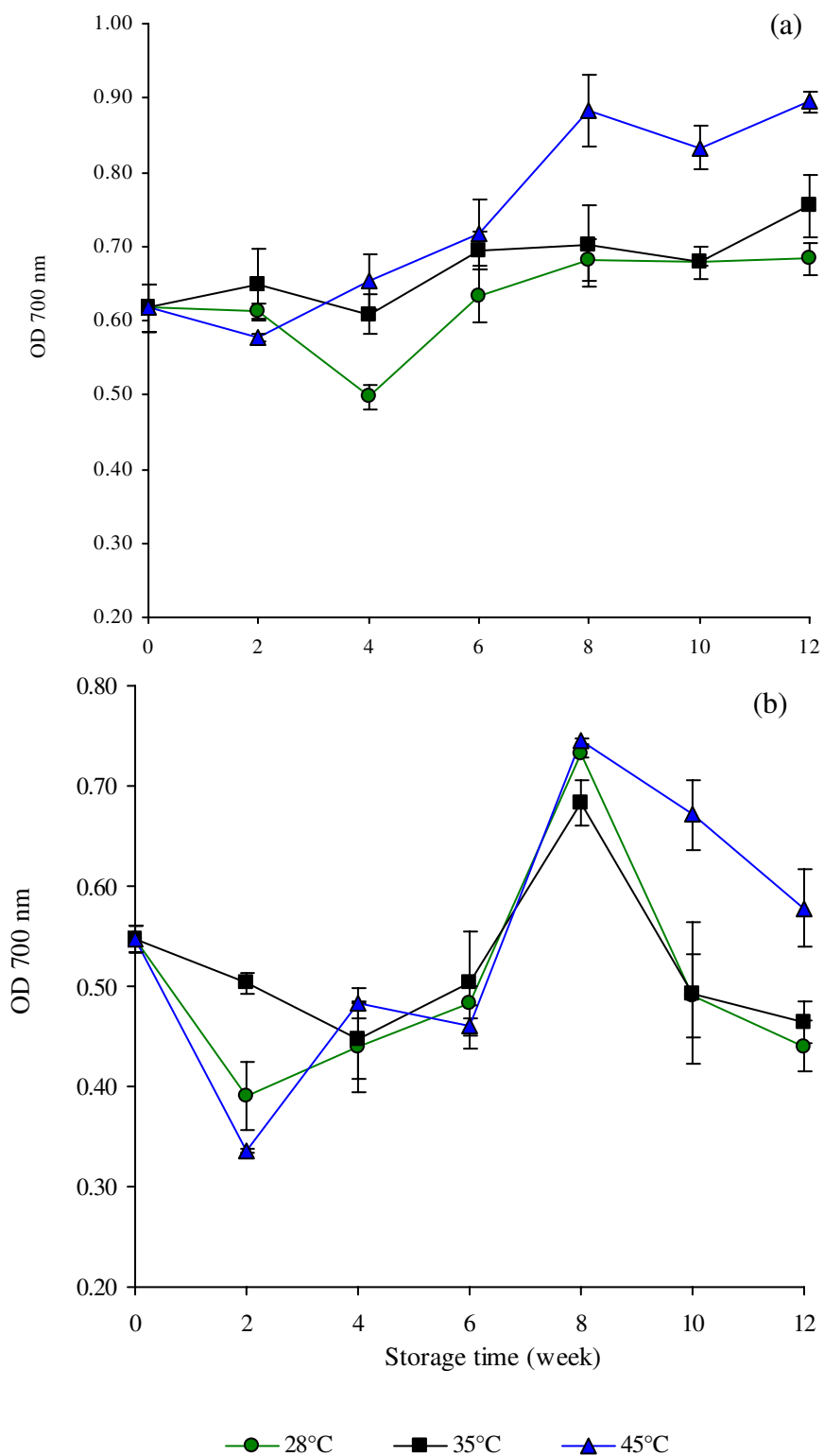


Figure 13. Reducing power in liquid phase (a) and solid phase (b) of pasteurized seasoning SPH during storage at 28, 35, and 45 °C

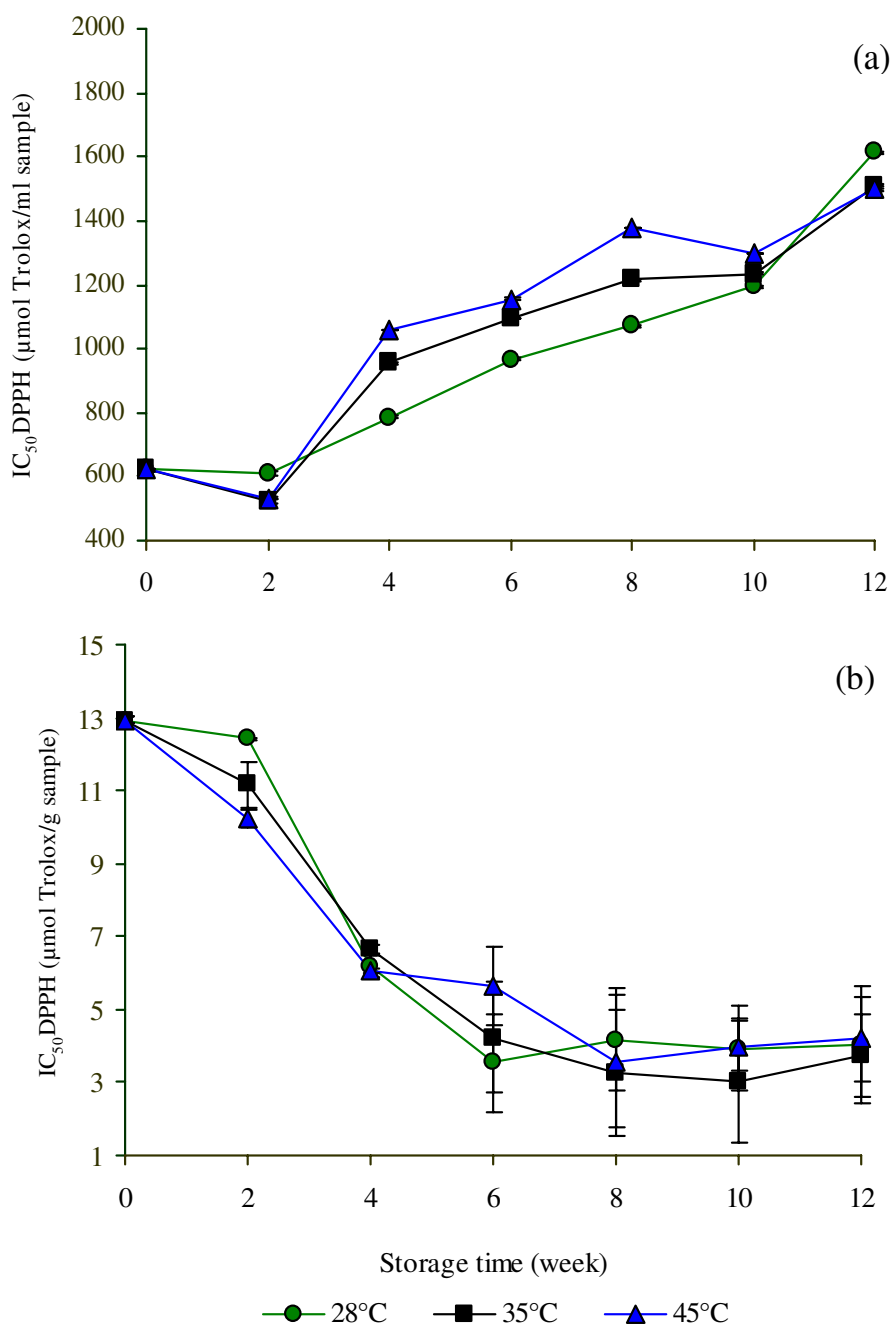


Figure 14. DPPH radical scavenging activity in liquid phase (a) and solid phase (b) of pasteurized seasoning SPH during storage at 28, 35, and 45 °C

2.3 คุณภาพด้านประสาทสัมผัส

การยอมรับทางประสาทสัมผัสของบุคคลผู้ปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์ในระหว่างการเก็บรักษาในลักษณะปรากฏ สี กลิ่น กลิ่นรส รสชาติ และความชอบโดยรวม แสดงดัง Figure 15 ผลการศึกษาพบว่าอุณหภูมิของการเก็บรักษาที่แตกต่างกันไม่ทำให้การยอมรับในผลิตภัณฑ์แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยการยอมรับในลักษณะปรากฏ และสีของผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ระหว่างการเก็บรักษา 8 ถึง 12 สัปดาห์ มีแนวโน้มสูงกว่าการยอมรับต่อผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำอื่น ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการเกิดปฏิกิริยารังสีน้ำตาลในผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำให้ลักษณะปรากฏและสีของผลิตภัณฑ์ดีขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Lan และคณะ (2010) ซึ่งพบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่เร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยารังสีน้ำตาล ทำให้อาหารมีสีและกลิ่นที่เป็นลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์ที่ทำให้ผู้บริโภคยอมรับ แม้ว่าข้อมูลที่แสดงใน Figure 15 จะแสดงให้เห็นว่าคะแนนการยอมรับผลิตภัณฑ์มีแนวโน้มลดลงเมื่อเก็บรักษานานขึ้น แต่อย่างไรก็ตามบุคคลผู้ปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ยังมีคะแนนในแต่ละคุณลักษณะสูงกว่า 6 ซึ่งหมายถึงผู้ทดสอบชิมยังคงชอบและให้การยอมรับผลิตภัณฑ์

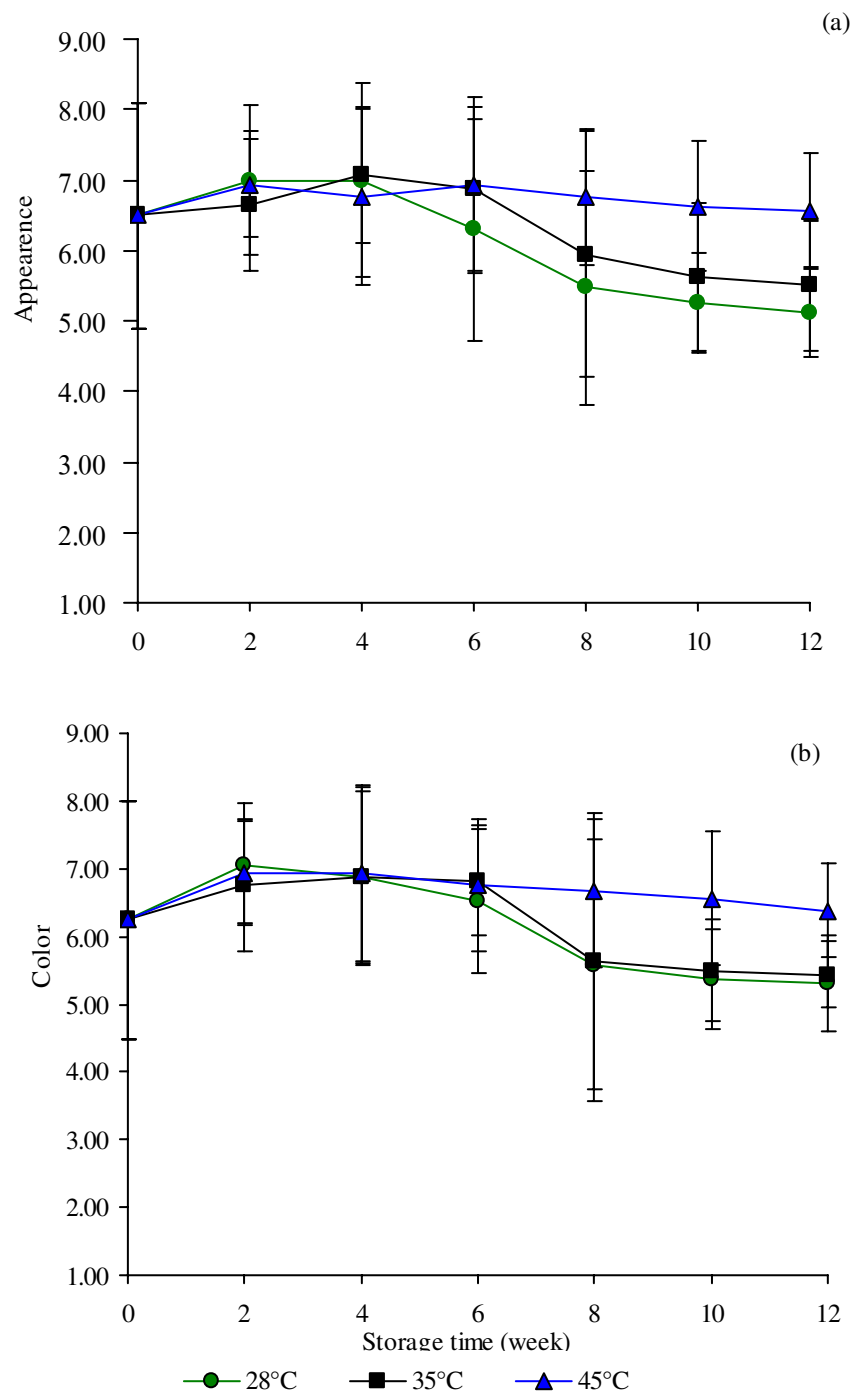


Figure 15. Sensory scores of pasteurized seasoning SPH during storage at 28, 35, and 45 °C

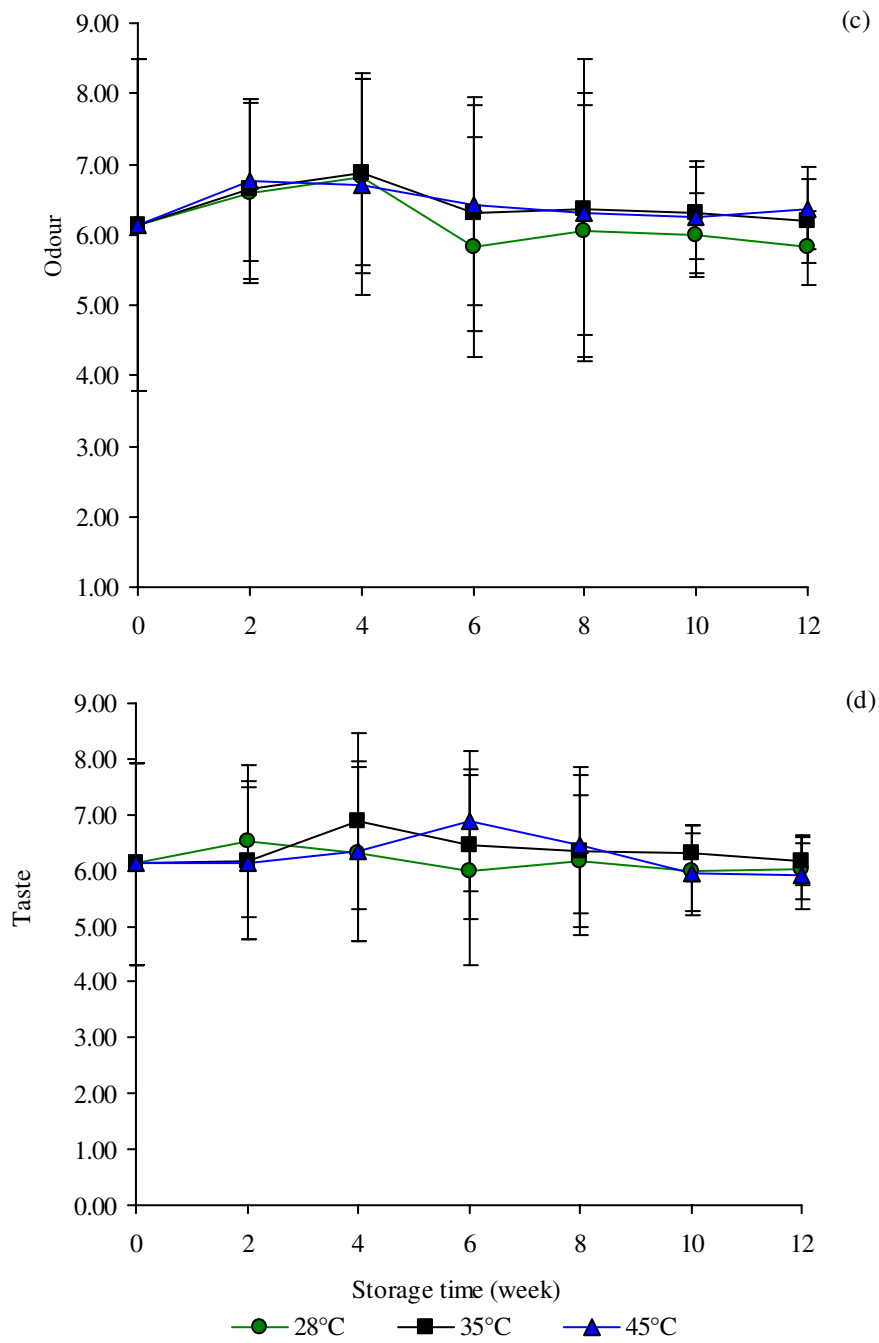


Figure 15. Sensory scores of pasteurized seasoning SPH during storage at 28, 35, and 45 °C

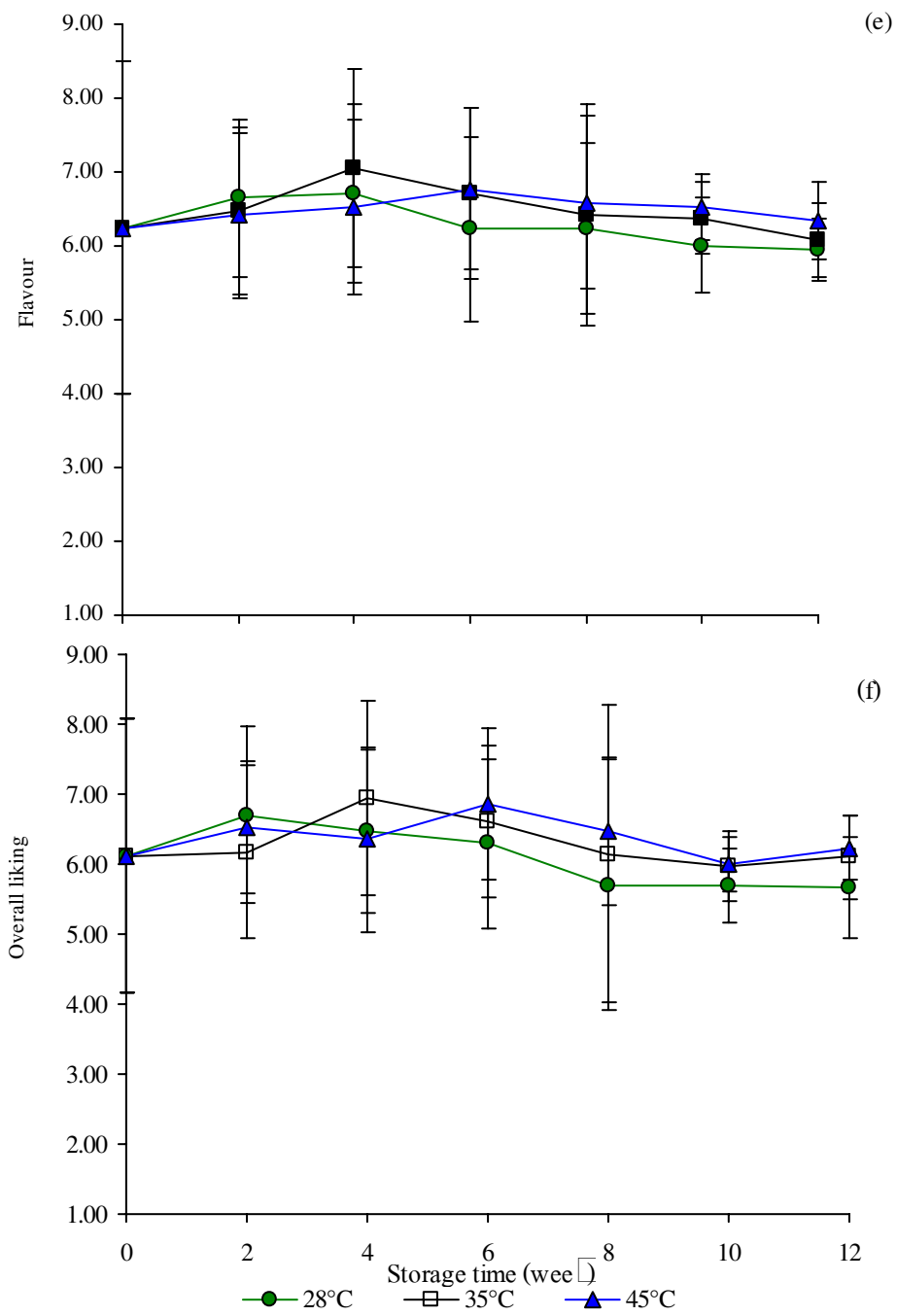


Figure 15. Sensory scores of pasteurized seasoning SPH during storage at 28, 35, and 45 °C

2.4 คุณภาพทางจุลินทรีย์

ผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์บูดูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์ในระหว่างการเก็บรักษา (Table 13) พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ มีค่าคงที่ในช่วง 4 สัปดาห์แรก แต่เมื่อระยะเวลาเก็บรักษาเพิ่มขึ้นพบว่ามีค่าลดลง ส่วนชุดทดลองที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเก็บรักษาครบ 12 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามไม่พบการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ในทุกชุดทดลองตลอดการเก็บรักษา การลดลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษาอาจเนื่องจากสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญมีน้อยลง (Thomas and O'Beirne, 2000) หรือเป็นผลมาจากสารต้านจุลินทรีย์ที่พบในเครื่องเทศที่เป็นองค์ประกอบในบูดูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์แสดงฤทธิ์จำกัดการเจริญของจุลินทรีย์ (Sacchetti *et al.*, 2005; Wannissorn *et al.*, 2005) ซึ่งบูดูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 12 สัปดาห์ยังคงมีคุณภาพและมีปริมาณจุลินทรีย์เป็นไปตามมาตรฐานของผลิตภัณฑ์บูดูปรุงรสที่กำหนดให้จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ต้องไม่เกิน 1.0×10^4 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม ปริมาณของ *Staphylococcus aureus* ต้องน้อยกว่า 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม และปริมาณของ *Escherichia coli* โดยวิธีเอ็มพีเอ็น ต้องน้อยกว่า 10 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำบูดูปรุงรส, 2548)

Table 13. Total viable counts, *Staphylococcus aureus* and *E. coli* of pasteurized seasoning SPH during storage at 28, 35, and 45 °C

Type of microbial	Treatment (°C)	Storage time (week)					
		0	2	4	6	8	12
Total viable counts (log cfu/g)	28	1.12 ± 0.07 ¹ a	1.24 ± 0.10b	1.19 ± 0.11c	0.10 ± 0.10b	0	0
	35	1.12 ± 0.07a	1.28 ± 0.09a	1.46 ± 0.09a	1.79 ± 0.10a	1.32 ± 0.05	3.89 ± 0.09
	45	1.12 ± 0.07a	0.89 ± 0.04c	1.36 ± 0.06b	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (MPN/g)	28	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	35	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	45	<3	<3	<3	<3	<3	<3
<i>E. coli</i> (MPN/g)	28	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	35	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	45	<3	<3	<3	<3	<3	<3

¹Values represent means ± standard deviation.; (a-c) Mean values in a column with different letters are significantly different at P < 0.05.

บทที่ 4

บทสรุป

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปอาหารทะเลแช่เยือกแข็งโดยกระบวนการหมักกับเกลือ พบว่าการย่อยโปรตีนกล้ำมเนื่องจากโครงปลาเกิดขึ้นได้ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 90 เมื่อใช้ระยะเวลาหมัก 6 เดือน การใช้หัวกุ้งขาว และ/หรือเครื่องในหมักกระดองหมักร่วมกับวัสดุเศษเหลือปลาตาโตในปริมาณร้อยละ 10 หรือ 20 ของน้ำหนักวัสดุเศษเหลือปลาตาโต ไม่มีผลให้คุณลักษณะทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซต แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการหมัก ได้รับคะแนนการยอมรับในด้านสี กลิ่น รสชาติ และความชอบรวมไม่แตกต่างกับבודูทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ยกเว้นโปรตีนไฮโดรไลเซตจากชุดหมักที่มีเครื่องในหมักร่วมหมักด้วย และพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากชุดหมักที่เติมหัวกุ้งขาวร้อยละ 20 มีค่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระของ DPPH และ ABTS สูงกว่าทุกชุดการทดลอง

בודูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์ที่เตรียมโดยใช้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีหัวกุ้งขาวร้อยละ 20 เป็นส่วนผสมหลัก เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 28, 35 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าอุณหภูมิการเก็บรักษาไม่มีผลให้ค่าการดูดกลืนแสง และค่าสีของของเหลวผลิตภัณฑ์แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) สำหรับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในส่วนของของเหลวมีค่าเพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาช่วง 2-4 สัปดาห์ ก่อนมีค่าลดลง ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากของแข็งของผลิตภัณฑ์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่ออายุการเก็บรักษานานขึ้น โดยที่อุณหภูมิเก็บรักษาที่ต่างกันไม่มีผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในผลิตภัณฑ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

สมบัติการเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (reducing power) และความสามารถจับอนุมูลอิสระของ DPPH ของส่วนของเหลวของבודูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์มีค่าเพิ่มขึ้นตามเวลาเก็บรักษาสำหรับสารสกัดจากส่วนของแข็งของผลิตภัณฑ์มีสมบัติการเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (reducing power) มีค่าสูงสุดเมื่อเก็บรักษานาน 8 สัปดาห์ ในขณะที่สมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากของแข็งของבודูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์ลดลง โดยอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาไม่มีผลให้ค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิของการเก็บรักษาที่แตกต่างกันไม่ทำให้การยอมรับผลิตภัณฑ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยการยอมรับในลักษณะปรากฏ

และสีของผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สูงกว่าการยอมรับในลักษณะดังกล่าว
ของผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิอื่น ($p < 0.05$)

เอกสารอ้างอิง

- กองโภชนาการ กรมอนามัย. 2530. ตารางแสดงคุณค่าอาหารไทยในส่วนของที่กินได้ 100 กรัม.
กรุงเทพฯ : กองโภชนาการ กรมอนามัย
- กฤษดา สมิตะศิริ. 2529. แบลกที่เรียชอบเกลือในการหมักน้ำปลา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์
มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กรมโรงงาน. 2551. อุตสาหกรรมเครื่องเทศเครื่องปรุงรส (ออนไลท์). สืบค้นจาก :
<http://fic.nfi.or.th/th/thaifood/product52-condiment.asp> (11 ต.ค. 2553).
- จริยา ภูเจริญ. 2542. การผลิตน้ำปลาโดยกระบวนการแบบต่อเนื่อง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์
มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ดวงทิพย์ อรุณไพโรจน์ และ ไพโรจน์ หลวงพิทักษ์. 2539. น้ำปลา..อย่างไรจึงมีคุณภาพ. วารสาร
เพื่อคุณภาพและเทคนิคการบริหารธุรกิจ. 3: 83-86.
- นิธิยา รัตนาปนนท์. 2545. เคมีอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.
- นงลักษณ์ เกียรติตันสกุล. 2541. ผลของเครื่องในปลาและแบคทีเรียในการหมักบูด. วิทยานิพนธ์
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. 2543. น้ำปลา. กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ. ฉบับ 203.
- ปราณีศา เชื้อโพธิ์หัก, นงนุช รักสกุลไทย และดวงเดือน กุลวิสัย. 2541. ผลการเพิ่มปริมาณ
ออกซิเจนต่อกระบวนการหมักน้ำปลา. วารสารอาหาร. 28: 22-30.
- มัทนา แสงจินดาวงษ์. 2545. ผลกระทบที่ประมงที่เกิดจากกระบวนการหมัก. ผลกระทบที่ประมงไทย
สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- มาลี อมรทิพย์รัตน์. 2522. การศึกษาจุลชีววิทยาของอาหารหมักพื้นเมือง “บูด”. วิทยานิพนธ์ วิทยา
ศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน. 2548. น้ำบูดปรุงรส. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน. (มผช.
๑๐๑๕) กรุงเทพฯ.
- พงษ์เทพ เกิดเนตร. 2533. การศึกษาผลของชนิดปลาและกรรมวิธีต่อการผลิตและคุณภาพของน้ำ
บูด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พูนสุข ประเสริฐสรรพ. 2542. การใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือ. รายงานการวิจัยภาควิชา
เทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

- พันธ์รงค์ จันทร์แสงศรี. 2547. ปลาหมักและผลิตภัณฑ์ปลา. ใน อาหารจากการหมัก Food From Fermentation. (พันธ์รงค์ จันทร์แสงศรี, บรรณาธิการ). หน้า 85-102. แคนก้อบปี. กรุงเทพฯ.
- วิวัฒน์ หวังเจริญ. 2545. บทบาทของสารประกอบฟีนอลต่อสุขภาพ. วารสารอาหาร. 32: 245-253.
- สายพิน ไชยน์นันทน์ และ นิวัฒน์ ฉายโชติเจริญ. 2530. กิจกรรมย่อยสลายโปรตีนของแบคทีเรียที่ทนเกลือได้ 10 เปอร์เซ็นต์. วารสารครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์. 6: 115-125.
- สิทธิพันธุ์ ไชยน์นันทน์. 2522. การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำปลาไทย ซึ่งผลิตจากปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2526. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำปลาพื้นเมือง. มอก. 3-2526.
- อนันต์ บุญปาน. 2550. การศึกษาการผลิตและสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ชอบเกลือ. วิทยาศาสตร์ ดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อรพิน ภูมิภมร. 2526. น้ำปลาและผลิตภัณฑ์ปลาหมัก. ใน จุลินทรีย์ในเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ และอาหารหมักพื้นเมือง. หน้า 71-84. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- อารีย์ มีสวัสดิ์. 2542. การย่อยสลายโปรตีนในกระบวนการหมักน้ำปลาระดับอุตสาหกรรม. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- Adler-Nessen, J. 1986. Enzymatic hydrolysis of food protein. London *In* Elsevier Applied Science. p. 122–124. Publishers. London.
- Ajandouz, E.H., Tchiakpe, L.S., Ore, F.D., Benajiba, A. and Puigserver, A. 2001. Effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems. *J. Food Sci.* 66: 926–931.
- Ames, J. M. 1990. Control of the Maillard reaction in food systems. *Trends Food Sci Tech.* 1: 150–154.
- Amano, K. 1962. The Influence of Fermentation on The Nutritive Value of Fish with Special Reference to Fermented Fish Products of South-East Asia. *In* Symp. of Fish in Nutrition. p. 180-200. Fishing News. London.

- AOAC. 1984. Official Method of Analysis. 14th ed. Association of Official Analytical Chemists. Verginia. USA.
- AOAC. 1990. Official Method of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Verginia. USA.
- AOAC. 1995. Official Method of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists. Inc., USA.
- AOAC. 2000. Official Method of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington. DC. USA.
- Aquerreta, Y., Astiasaran, I. and Bello, J. 2001. Use of exogenous enzymes to elaborate the Roman fish sauce "garum". *J. Sci. Food Agric.* 82:107-112.
- Arnao, M.B., Cano, A. and Acosta, M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.* 73: 239-244.
- Bain, N., Hodgkiss, W., and Shewan, J.M. 1957. Bacteriology of salt used in fish curing, *Int. J. Food Microbiol.* 1: 1-11.
- Beddows, C.G., Ardeshir, A.G. and Daud, W.J.b. 1979. Biochemical changes occurring during the manufacture of budu. *J. Sci. Food Agric.* 30 : 1097-1103.
- Beddows, C. G. 1998. Fermented Fish and Fish Products. *In Microbiology of Fermented Food.* (Wood, B. J. B., ed.) Vol. I. p. 416–429. Elsevier Applied Science Publishers. London.
- Betts, G.D. 1998. Critical Factors Affecting the Safety of Minimally Processed Chilled Foods. *In Sous Vide and Cook-Chill Processing for the Food Industry.* (Ghazala, S., ed.) p. 131-159. Aspen Publishers. Maryland.
- Binsan, W. 2007. Antioxidative Activity of Mungoong, an Extract Paste, from White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Cephalothorax. Degree of master of science in food technology. Prince of Songkla University.
- 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. p. 320-325. Bangkok.

- Chaveesuk, R. Smith, J. and Simpson, B. 1993. Production of fish sauce and acceleration of sauce fermentation using proteolytic enzymes. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 2: 59-77.
- Ching, L. S. and Mohamed, S. 2001. Alpha-tocopherol content in 62 edible tropical plants. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3101-3105.
- Cole, R.C. 1963. Preservation of fish in the tropics. *Fishing News International.* 2: 385-390.
- Cao, W., Chaohua, Z. Pengzhi, H. and Ji, H. 2008. Response surface methodology for autolysis parameters optimization of shrimp head and amino acids released during autolysis. *Food Chem.* 109: 176-183.
- Del Toro, M.A.N. and Garcia-carreno, F.L. 2002. Evaluation of the progress of protein hydrolysis. *In Current Protocols in Food Analytical Chemistry.* Wiley, New York.
- Disaraphong, S., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Kishimura, H. 2005. The Influence of storage conditions of tuna viscera before fermentation on the chemical, physical and microbiological changes in fish sauce during fermentation. *Bioresour. Technol.* 97: 2032-2040.
- Dougan, J. and Howard, G.E. 1975. Some flavouring constituents of fermented fish sauces. *J. Sci. Food Agric.* 26 : 887-894.
- Friedman, M. and Jürgens, H. S. 2000. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2101-2110.
- Fujii, T., Basuki, S.B. and Tozawa, H. 1980. Microbiological studies on ripening of fish sauce, Chemical composition and microflora of fish sauce (Patis). *Nippon Suisan Gakkaishi.* 46(10) : 1235-1240
- Gildberg, A. 1993. Enzymic processing of marine raw materials. *Process Biochem.* 28: 1-15.
- Gildberg, A. and Thongthai, C., 2001. The effect of reduced salt content and addition of halophilic lactic bacteria on quality and composition of fish sauce made from sprat. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 10: 77-88.
- Greig, R.W. and Estrella, D.C. 1988. A Study of the Acceleration of Fish Sauce Production Using Enzymes. *In Food Science and Technology in Industrial Development.* Vol. I. p. 24-26. Bangkok.

- Hall, G. M. and Ahmad, N. H. 1992. Functional Properties of Fish protein Hydrolysates. *In* Fish Processing Technology. 2nd ed. (Hall, G. M. ed). p. 249-270. Blackie. London.
- Hamm, W.S. and Clauge, J.A. 1950. Temperature and salt purity effects on the manufacture of fish paste and sauce. Reserch Rept. Fish and Wildlife Service. US Dept. Interior. 24:11.
- Hasegawa, H. 1987. Laboratory manual on analytical methods and procedures for fish products. Marine Fisheries Research Department. SEAFDEC. Singapore.
- Hebard, C. E., Flick, G. J. and Martin, R. E., 1982. Occurrence and Significance of Trimethylamine Oxide and Its Derivatives in Fish and Shellfish. *In* Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products. (Martin, R. E., Flick, G. J., Hebard, C. E., Ward, D. R. eds.), p. 149-304. AVI Publishing. Westport Connecticut. USA.
- Hjalmarsson, G. H. 2001. Fish Sauce from Capelin (*Mallotur villosus*) as Affected by Harvest Season. M.Sc. thesis. University of Iceland Reykjavik. Iceland.
- Ho, K.L., Chung, Y.C., Lin, Y.H. and Tseng, C.P. 2000. Biofiltration of trimethylamine, dimethylamine, and methylamine by immobilized *Paracoccus* sp. CP2 and *Arthrobacter* sp. CP1. *Chemosphere*. 72: 250–256
- Hultmann, L. and Rustad, T. 2004. Iced storage of Atlantic samon (*Salmo salar*) effect on endogenous enzymes and their impact on muscle proteins and texture. *Food Chem*. 87: 31-41.
- Jackman, R. L. and Smith, J. L. 1996. Anthocyanins and Betalains. *In* Natural Food Colorants. 2nd ed. (Hendry, G. A. F. and Houghton, J. D., eds.). p. 244-309. Blackie Academic and Professional. UK.
- Jaswal, A. S. 1990. Amino acid hydrolysate from crab processing waste. *J. Food Sci*. 55: 379-380.
- Jeong, S. M., Kim, S. Y., Kim, D. R., Jo, S. C., Nam, K. C., Ahn, D. U. and Lee, S. C. 2004. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *J. Agric. Food Chem*. 52: 3389-3393.
- Jing, H. and Kitts, D. 2002. Chemical and biochemical properties of casein–sugar Maillard reaction products, *Food and Chem. Toxicol*. 40: 1007–1015.

- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. and Heinonen, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3954-3962.
- Katina, K., Liukkonen, K. H., Kaukovirta-Norja, A., Adlercreutz, H., Heinonen, S. M., Lampi, A. M., Pihlavad, J. M. and Poutanen, K. 2007. Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *J. Cereal Sci.* 46: 348-355.
- Katsube, T., Tsurunaga, Y., Sugiyama, M., Furuno, T. and Yamasaki, Y. 2009. Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Food Chem.* 113: 964-969.
- Kim, M. C. and Pratt, D. E. 1992. Thermal Degradation of Phenolic Antioxidants. *In Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II: Antioxidation & Cancer Prevention.* (Huang, M. T., Ho, C. T. and Lee, C. Y., eds.). p. 200-218. American Chemical Society, Washington, D. C.
- Kim, S.G., Bae, H.S., Oh, H.M. and Lee, S.T. 2003. Isolation and characterization of novel halotolerant and/or halophilic denitrifying bacteria with versatile metabolic pathways for the degradation of trimethylamine. *FEMS Microbiol. Lett.* 225: 263-269.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T. and Tanaka, M. 2004. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chem.* 89: 363-372
- Klomklao, S. Benjakul, S. Visessanguan, W. Kishimura, H. Simpson, K. B. 2006. Effects of the addition of spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) on the liquefaction and characteristics of fish sauce made from sardine (*Sardinella gibbosa*). *Food Chem.* 98: 440-452.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and Shahidi, F. 2007. Antioxidantive activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chem.* 102: 1317-1323.
- Labuza, P.T. and W.M. Baisier. 1992. The Kinetic of Nonenzymatic Browning. *In Physical Chemistry of Foods.* (G.H. Schwartzberg and R.W. Hartel. ed). p. 596-649. Marcel Dekker. New York.

- Lan, X., Liu, P., Xia, S., Jia, C., Mukunzi, D., Zhang, X., Xia, W., Tian, H. and Xiao, Z. 2010. Temperature effect on the non-volatile compounds of Maillard reaction products derived from xylose–soybean peptide system: Further insights into thermal degradation and cross-linking. *Food Chem.* 120: 967–972.
- 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 Park, J. W. 2002. Characteristics of fish sauce made from pacific whiting and surimi by-products during fermentation stage. *J. Food Sci.* 67: 511-516.
- Matches, J.R. 1982. Effects of temperature on the decomposition of Pacific coast shrimp (*Pandalus jordani*). *J. Food Sci.* 47: 1044-1047.
- McIver, R.C., R.J. Brodes and G.A. Reineccus. 1982. Flavor of fermented fish sauce. *J. Agr. Food Chem.* 30: 1017-1020.
- Meinke, W. W., Rahman, M. A. and Matti, K. K. F. 1972. Some factors influencing in production of protein isolate from whole fish. *J. Food Sci.* 137: 195-198.
- Miean, K. H. and Mohamed, S. 2001. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3106-3112.
- Morales, F.J. and Jimenez-Perez, S. 2001. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to color and fluorescence. *Food Chem.* 72: 119–125.
- [Murakami](#), M., Shigeeda, A., Danjo, K., Yamagushi, T., Takamura, H. and Matoba, T. 2002. Radical-scavenging activity and brightly colored pigments in the early stage of the Maillard reaction, *J. Food Sci.* 67: 93–96.
- Naranjo, B.G., Malec, L.S. and Vigo, M.S. 1998. Reducing sugars effect on available lysine loss of casein by moderate heat treatment. *Food Chem.* 62: 309-313.
- Orejana F.M. and Liston J. 1981. Agents of proteolysis and its inhibition in Patis fermentation. *J. Food Sci.* 47:198–209.
- Oyaizu, M. 1988. Antioxidant activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 35: 771-775.

- Park, N. J., Fukumoto, Y., Fujita, E., Tanaka, T., Washio, T., Otsuka, S., Shimizu, T., Watanabe, K. and Abe, H. 2001. Chemical composition of fish sauce produced in southeast and east asian countries. *J. Food Compos. Anal.* 14: 113-125.
- Prior, R. L., Xianli, W. and Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4290-4302.
- Prasertsan, P., Wuttijumnong, P., Sophanodora, P. and Choorit, W. 1988. Seafood processing industries within Songkla-Hat yai region : The survey of basic data emphasis on wastes. *Songklanakarin. J. Sci. Technol.* 10:447-451.
- Rao, S. 1967. Fish processing in the Indo pacific-Area. Indo pacific fisheries Council Regional Studies. No. 4. FAO Regional office for Asia and the Far East. Bangkok. Thailand.
- Recamales, A. F., Sayago, A., Gonzalez-Miret, M. L. and Hernanz, D. 2006. The effect of time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine. *Food Res. Int.* 39: 220–229.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M. and Bruni, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 91: 621-632.
- Sakaguchi, M. Murata, M. and Kawai, A. 1982. Changes in free amino acids and creatine contents in Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) Muscle during Ice Storage. *J. Food Sci.* 47: 1662-1666.
- Saisithi, P., Kasemsarn, B., Liston, J. And Dollar, A.M. 1966. Microbiology and chemistry of fermented fish. *J. Food Sci.* 31: 105-110.
- Saisithi, P. 1987. Traditional fermented fish products with special reference to Thai products. *ASEAN Food J.* 3: 3-10.
- Sanceda, N.G., Kurata, T. and Arakawa, N. 1990. Overall quality and sensory acceptance of a lysine- fortified fish sauce. *J. Food Sci.* 55: 983-988.
- Sanceda, N.G., Kurata, T., Suzuki, Y. and Arakawa, N. 1992. Oxygen effect on volatile acids formation during fermentation in manufacture of fish sauce. *J. Food Sci.* 57: 1120-1122.

- Shin, I-L., Chen, L-G., Yu, T-S, Chang, W-T. and Wang, S-L. 2003. Microbial reclamation of fish processing wastes for the production of fish sauce. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 154-162.
- Shobana, S. and Naidu, K. A. 2000. Antioxidant activity of selected Indian spices. *Prostag Leukotr Ess.* 62: 107-110.
- Sikorski, Z. E. and Haard, N. F. 2007. Interactions of Food Components. *In Chemical and Functional Properties of Food Components*. 3rd ed. (Sikorski, Z. E., ed.). p. 330-353. Taylor & Francis Group, LLC. USA.
- Somero, G. N. and Childress, J. J. 1989. Scaling of ATP-supplying enzymes, myofibrillar proteins and buffering capacity in fish muscle: relationship to locomotory habit. *J. exp. Biol.* 149: 319-333.
- Suntinanalerts, P. 1979. Role of Microorganisms in the Fermentation of Nam-pla in Thailand: Relationship of The Bacteria Isolated from Nam-pla Produced from Different Geographical Localities in Thailand. Degree of master of science. Mahidol University.
- Tahvonen, R., Aro1, T., Nurmi, J. and Heikki, K. 2000. Mineral content in baltic herring and baltic herring products. *J. Food Compos. Anal.* 13: 893-903.
- Taylor, S. L., Guthertz, L. S., Leatherwood, M., Tillman, F. and Lieber, E. R. 1978. Histamine production by food-borne bacterial species. *J. Food Safety.* 1: 173.
- Thaiansilakul, Y., Benjakul, S. and Shahidi, F. 2007. Antioxidative activityb of protein hydrolysate from round scad muscle using Alcalase and flavourzyme. *J. Food Biochem.* 31: 266-287.
- Thomas, C. and O'Beirne, D. 2000. Evaluation of the impact of short-term temperature abuse on the microbiology and shelf life of a model ready-to-use vegetable combination product. *Int. J. Food Microbiol.* 59: 47-57.
- Tungkawachara, S., Parkm, J.W., Choi, Y.J. 2003. Biochemical properties and consumer acceptance of Pacific whiting fish sauce. *J. Food Sci.* 68: 855–860.
- Van Boekel, M.A.J.S. 1998. Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chem.* 62: 403-414.

- Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.F. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3rd Ed. American Public Health Association. Washington.
- Virulhakul, P. 2000. The processing of Thai fish sauce. INFOFISH Int. 5:49–53.
- Wang, S.L. and Hwang, J.R. 2001. Microbial reclamation of shellfish wastes chitinases. Enzyme Microb. Technol.; 28:376-382.
- Wannissorn, B., Jarikasem, S., Siriwangchai, T. and Thubthimthed, S. 2005. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. Fitoterapia. 76: 233-236.
- Wijewickreme, A.N., Kitts, D.D. and Durance, T.D. 1997. Reaction conditions influence the elementary composition and metal chelating affinity of nondialyzable model Maillard reaction products. J. Agric. Food Chem. 45: 4577-4583.
- Wijewickreme, A. N., Krejpcio, Z., and Kitts, D. D. 1999. Hydroxyl scavenging activity of glucose, fructose, and ribose–lysine model Maillard products. J. Food Science. 64(3): 457–461.
- Wilaipan, P. 1990. Halophilic Bacteria Producing Lipase in Fish Sauce. Degree of master of science. Chulalongkorn University.
- Wu, H.C., Chen, H.M., and Shiau, C.Y. 2003. Free amino acid and peptide as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food Research International. 36: 949-957.
- Xu, G., Ye, X., Chen, J. and Liu, D. 2007. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. J. Agric. Food Chem. 55: 330-335.
- Yeboah, F.K., Alli, I. and Yaylayan, V.A., 1999. Reactivities of D-glucose and D-fructose during glycation of bovine serum albumin. J. Agricul. Food Chem. 47: 3146-3172.
- Yen, G.C. and Hsieh, C.L. 1997. Antioxidant effects on dopamine and relate compounds. Biosci. Biotech. Bioch. 61: 1646-1649
- Yoshimura, Y., Iijima, T., Watanabe, T. and Nakzawa, H. 1997. Antioxidantive effect of Maillard reaction products using glucose-glycine model system. J. Agric. Food 4109.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ทางกายภาพ

ก1. การวัดค่าสีของของเหลวที่ได้จากการหมักวัสดุเศษเหลือของปลาตาโต และของเหลวของผลิตภัณฑ์บูดูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์

อุปกรณ์

เครื่องวัดค่าสี ยี่ห้อ Hunter Lab รุ่น Quest xT ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีการ

นำของเหลวที่ได้จากการหมักวัสดุเศษเหลือของปลาตาโต และของเหลวของผลิตภัณฑ์บูดูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์มากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1

โดย L^* บ่งบอกถึงความสว่างของสี (lightness) โดยมีค่าตั้งแต่ 0 (สีดำ) ถึง 100 (สีขาว)

a^* บ่งบอกถึงสีแดงและสีเขียว โดยค่าเป็นบวกก็จะเป็นสีแดงมากขึ้น และถ้าค่าเป็นลบก็จะเป็นสีเขียวมาก

b^* บ่งบอกถึงสีเหลืองและสีน้ำเงิน โดยค่าเป็นบวกก็จะเป็นสีเหลือง และถ้าค่าเป็นลบก็จะเป็นสีน้ำเงินมากขึ้น

ก2. การวิเคราะห์ค่าพีเอช (A.O.A.C., 1990)

อุปกรณ์

เครื่องวัดพีเอช pH meter ยี่ห้อ Schott รุ่น SevenGo SG2 ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีการวิเคราะห์

1. นำของเหลวที่ได้จากการหมัก และผลิตภัณฑ์บูดูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์ซึ่งปั่นละเอียดแล้ว ชั่ง 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่มีพีเอชเท่ากับ 7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมโดยใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน

2. นำไปวัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอชที่ผ่านการสอบเทียบโดยใช้บัฟเฟอร์ที่มีพีเอชเท่ากับ 4.00 และ 7.00

ก3. การวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (Hjalmarsson *et al.*, 2007)

วิธีการวิเคราะห์

1. ปิเปิดส่วนของเหลวของบุดูปรุงรสปาสเจอร์ไรซ์ที่กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 แล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดสำหรับใช้หมุนเหวี่ยงเจือจางด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

3. ปิเปิดตัวอย่างความเข้มข้นที่เหมาะสมลงใน 96-well microplate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader (PowerWaveX, Biotek, U.S.A.) โดยใช้เอทานอลร้อยละ 95 เป็น blank control

ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางเคมี

ข1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นโดยวิธีของ A. O. A. C. (1990)

อุปกรณ์

1. ภาชนะอลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น
2. ตู้อบไฟฟ้า (Electric oven)
3. โถดูดความชื้น (Desiccator)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีวิเคราะห์

1. ล้างภาชนะสำหรับหาความชื้นให้สะอาด อบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105°ซ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก

2. กระทำเช่นเดียวกับข้อ 1 ช้า จนได้น้ำหนักคงที่ ซึ่งผลต่างของน้ำหนักที่ชั่ง 2 ครั้ง ติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างข้าว ตะไคร้ พริกชี้หนู ใบมะกรูดและเครื่องดัดฆ่าที่ต้องการวิเคราะห์ ปริมาณความชื้นให้มีความละเอียดของน้ำหนักอยู่ในช่วง 1--3 กรัม ในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแล้ว

4. นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105°ซ เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง

5. นำออกจากตู้อบปล่อยให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้นแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก

6. อบซ้ำ และกระทำเช่นเดิมจนได้น้ำหนักคงที่ ซึ่งผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

7. คำนวณหาปริมาณความชื้นของตัวอย่าง จากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้นคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักก่อนและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}} \times 100$$

ข2. การวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยวิธีของ A. O. A. C. (1990)

อุปกรณ์

1. ขวดก้นกลม
2. ตู้อบไฟฟ้า (Electric oven)
3. โถดูดความชื้น (Desiccator)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. ชุดสกัดไขมัน

วิธีวิเคราะห์

1. อบขวดก้นกลมสำหรับหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้าที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำออกจากตู้อบไฟฟ้าใส่ไว้ในโถดูดความชื้นปล่อยให้เย็นอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่าอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

2. กระทำเช่นเดียวกับข้อ 1 ซ้ำ จนได้น้ำหนักคงที่ ซึ่งผลต่างของน้ำหนักที่ชั่ง 2 ครั้ง ติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างหัวกุ้งขาว เครื่องในหมึก และเศษเหลือใช้ปลาตาโตที่บดละเอียดแล้วให้น้ำหนักที่แน่นอนลงบนกระดาษกรอง ชั่งตัวอย่าง 1-2 กรัม แล้วห่อให้มีชนิดใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยสำลีเพื่อให้สารละลายกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ

4. เติมน้ำทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ประมาณ 150 มิลลิลิตรลงในขวดหาไขมัน แล้ววางบนเตา

5. ประกอบชุดสกัดไขมัน (ชอคเลตและเครื่องควบแน่น) พร้อมเปิดน้ำหล่อเย็น อุปกรณ์ควบแน่น และเปิดสวิทซ์ให้ความร้อน

6. สกัดไขมันนาน 14 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที

7. เมื่อครบ 14 ชั่วโมง นำหลอดตัวอย่างออกจากชอคเลต และกลั่นเก็บสารทำละลายที่เหลือสารละลายในขวดกลมเพียงเล็กน้อย

8. อบอุ่นหาไขมันในตู้อบไฟฟ้าที่ 105 องศาเซลเซียส จนแห้งนำออกจากตู้ใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่าอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

9. กระทำเช่นเดียวกับข้อ 8 ซ้ำ จนได้น้ำหนักคงที่ ซึ่งผลต่างของน้ำหนักที่ชั่ง 2 ครั้ง คิดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

10. กำหนดหาปริมาณไขมันของตัวอย่าง จากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้นคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักขูดรวมไขมัน} - \text{น้ำหนักขูด} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

ข3. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl (A.O.A.C., 2000)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก
2. สารช่วยเร่งการย่อย (catalyst) ประกอบด้วย CuSO_4 1 ส่วนและ K_2SO_4 10 ส่วน
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 40
4. กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4
5. mixed indicator

ซึ่งเมทิลเรด 0.125 กรัม และเมทิลลิ้นบลู 0.082 กรัม ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 100 มิลลิตร

ซึ่งโบโมกลีซอลกรีน 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิตร ผสมสารละลายข้อ 5.1 และข้อ 5.2 ในอัตราส่วนข้อ 5.1 ต่อข้อ 5.2 เท่ากับ 5:1

6. โซเดียมคาร์บอเนต (NaCO_3)

วิธีวิเคราะห์

การย่อยตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อย จดน้ำหนักที่แน่นอน
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา 5 กรัม เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาณ 15 มิลลิตร
3. นำไปให้ความร้อนบนเตาย่อยอุณหภูมิที่ 200 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จนได้สารละลายใส
4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ดูดควัน (ประมาณ 1 ชั่วโมง) แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น 60 มิลลิตร
5. นำหลอดย่อยเข้าเครื่องกลั่น ปลายสายของเครื่องสายหนึ่งจุ่มลงในถังน้ำกลั่นอีกสายหนึ่งจุ่มลงในถังโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยา เปิดน้ำหล่อเย็นในอัตราการใช้ประมาณ 3-4 ลิตรต่อนาที

6. วางขวดชมพูขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีสารละลายกรดบอริก 25 มิลลิลิตรและอินดิเคเตอร์ (mixed indicator) ไว้ตรงปลายสายส่วนควบแน่น (condenser) โดยให้ปลายท่อจุ่มลงในสารละลายเพื่อเก็บก๊าซแอมโมเนียม ใช้เวลากลั่นประมาณ 4 นาที หรือกลั่นจนได้ condensate ประมาณ 100-150 มิลลิลิตร

7. นำขวดชมพูไปไต่เตรทกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 หรือ 0.1 นอร์มัล จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรที่ใช้

8. กำหนดหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของตัวอย่าง จากสูตร

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด} = \frac{\text{ปริมาตรกรด HCl} \times \text{ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก} \times 14}{\text{น้ำหนักหรือปริมาตรตัวอย่าง}}$$

ข4. การวิเคราะห์ปริมาณอะมิโนไนโตรเจน ตามวิธีการของ (A.O.A.C, 1984)

ปริมาณอะมิโนไนโตรเจนเป็นผลต่างระหว่างปริมาณฟอร์มัลไนโตรเจนกับปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน

ข4.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มัลไนโตรเจน

สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐาน โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
2. ฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 38

วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างของเหลวที่ได้จากการหมัก 1 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร
2. ไต่เตรทจนมีพีเอช 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ต่อมาเติมสารละลาย formalin 38 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร

3. ไต่เตรทต่อจนได้พีเอชเป็น 8.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

4. กำหนดหาปริมาณฟอร์มอลไนโตรเจนของตัวอย่าง จากสูตร

$$\text{ปริมาณฟอร์มอลไนโตรเจน (กรัม/กิโลกรัม)} = \frac{\text{ความเข้มข้น NaOH} \times \text{ปริมาตร NaOH ที่ใช้} \times 75}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง}}$$

ข4.2 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียในโตรเจน

สารเคมี

1. สารแมกนีเซียมออกไซด์
2. สารละลายกรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 4
3. mixed indicator
 - a. ชั่งเมทิลเรด 0.125 กรัม และเมทิลลีนบลู 0.082 กรัม ละลายในเอทริลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
 - b. ชั่งโบโมกลีซอลกรีน 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
 - c. ผสมสารละลายข้อ a และข้อ b ในอัตราส่วนข้อ a ต่อข้อ b เท่ากับ 5:1
4. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

วิธีวิเคราะห์

1. ปิเปตตัวอย่างประมาณ 4 มิลลิลิตร ในหลอดกลั่น
2. เติมแมกนีเซียมออกไซด์ 3 กรัม และน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร
3. วางขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายกรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และอินดิเคเตอร์ (mixed indicator) กลั่นจนได้ condensate ประมาณ 100-150 มิลลิลิตร
4. นำขวดรูปชมพู่ไปไตเตรทกับสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรที่ใช้
5. คำนวณหาปริมาณแอมโมเนียในโตรเจนของตัวอย่าง จากสูตร

$$\text{ปริมาณแอมโมเนียในโตรเจน} = \frac{\text{ปริมาตรกรดซัลฟูริก} \times \text{ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก} \times 14}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง}}$$

ข5. การวิเคราะห์ปริมาณต่างที่ระเหยได้ทั้งหมดและปริมาณไตรเมทิลามีนโดยวิธี (Hasegawa, 1987)

สารเคมี

1. วาสลีน
2. mixed indicator : ละลายโบโมครีซอลกรีน 0.01 กรัม และเมทิลเรด 0.02 กรัม ละลายในเอทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3. สารละลายวงแหวนชั้นใน : ละลายกรดบอริก 10 กรัม ในเอทานอลปริมาตร 200 มิลลิลิตร เติม mixed indicator ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

4. สารละลายอิมตัวของโปตัสเซียมคาร์บอเนต เตรียมโดยละลายโปตัสเซียมคาร์บอเนต 60 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดประมาณ 10 นาที ทำให้เย็น แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง

5. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) เข้มข้นร้อยละ 4

6. สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 นอร์มอล

7. สารละลาย neutralize formaldehyde ความเข้มข้นร้อยละ 10 เตรียมโดยละลายแมกนีเซียมคาร์บอเนต 10 กรัม ในฟอร์มัลดีไฮด์ แล้วปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 กรองด้วยกระดาษกรอง นำส่วนที่กรองได้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 3 เท่า

การสกัดตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม เติม TCA เข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร บดผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ที่

อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

2. กรองผ่านกระดาษกรอง หรือหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

3. ถ้าไม่ได้วิเคราะห์ทันทีให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ข5.1 ปริมาณต่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVBN)

วิธีวิเคราะห์

1. ทาวาสลีนที่ขอบจานคอนเวเยอร์
2. ปิเปตสารละลาย inner ring ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในวงแหวนชั้นใน
3. ปิเปตสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในวงแหวนชั้นนอก
4. ปิดฝาคอนเวเยอร์แล้วเอียงจานคอนเวเยอร์
5. ปิเปตสารละลายโปแทสเซียมคาร์บอเนตอิมตัวปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในวงแหวนชั้นนอกแล้วปิดฝาคอนเวเยอร์
6. แล้วเอียงจานคอนเวเยอร์เบาๆ ให้สารละลายในวงแหวนชั้นนอกผสมเข้าด้วยกัน
7. บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง

8. ไตเตรตสารละลาย inner ring ด้วยสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.02 นอร์มอล จนเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพู

9. การทำ blank ให้ใช้ TCA เข้มข้นร้อยละ 4 แทนสารสกัดจากตัวอย่าง

ข5.2 ปริมาณไตรเมธิลามีน (TMA-N)

วิธีวิเคราะห์

1. ทาวาสลีนที่ขอบจานคอนเวย์
2. เปิดสารละลาย inner ring ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในวงแหวนชั้นใน
3. เปิดสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในวงแหวนชั้นนอก
4. ปิดฝาคอนเวย์แล้วเอียงจานคอนเวย์
5. เปิดฟอรัมัลดีไฮด์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในวงแหวนชั้นนอกแล้วปิดฝาคอนเวย์
6. แล้วเอียงจานคอนเวย์เบาๆ ให้สารละลายในวงแหวนชั้นนอกผสมเข้าด้วยกัน
7. บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1-2 ชั่วโมง
8. ไตเตรตสารละลาย inner ring ด้วยสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.02 นอร์มอล จนเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพู
9. การทำ blank ให้ใช้ TCA เข้มข้นร้อยละ 4 แทนสารสกัดจากตัวอย่าง
10. คำนวณหาปริมาณ TVBN และ TMA ของตัวอย่าง จากสูตร

$$\text{ปริมาณ TVBN และ TMA} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ HCl (นอร์มอล)} \times (A-B) \times V \times 14 \times 100}{\text{น้ำหนักหรือปริมาตรตัวอย่าง}}$$

A คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรต blank (มิลลิลิตร)

V คือ ปริมาตรรวมของกรดไตรคลอโรอะซิติกที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

ข6. การวิเคราะห์ปริมาณเกลือตามวิธีการของ (A.O.A.C, 1995)

สารเคมี

- ซิลเวอร์ไนเตรท (AgNO_3) มาตรฐาน ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล: อบ AgNO_3 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่ง AgNO_3 16.9870 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา
- กรดไนตริก (HNO_3) ความเข้มข้น 6 นอร์มัล
- โพแทสเซียมไทโอไซยาเนต (KSCN) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล: ชั่ง KSCN 9.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา นำไปเทียบมาตรฐานกับ AgNO_3 ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัลเพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอนของ KSCN
- สารละลายอินดิเคเตอร์ (ferric aium): ละลายแอมโมเนียมเพอร์ริกซัลเฟต ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$) 40 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วหยดไนตริกความเข้มข้น 2 นอร์มัล ลงไป 2-3 หยด

วิธีการวิเคราะห์

- เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า ดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
- เติม AgNO_3 ลงไป 10 มิลลิลิตร (ให้ปริมาณมากเกินไปในการทำปฏิกิริยากับ NaCl เกิดเป็นตะกอนของ AgCl ได้หมด) เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม HNO_3 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เพื่อป้องกัน AgNO_3 ไปทำปฏิกิริยากับ anion ชนิดอื่นที่มีอยู่ในน้ำปลา
- นำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนเดือดประมาณ 15 นาที เพื่อให้ตะกอนที่ไม่ใช่ AgCl ละลายได้หมด
- ใส่สารละลายอินดิเคเตอร์ลงไป 2-3 มิลลิลิตร แล้วไตเตรทกับ KSCN ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ AgNO_3 ส่วนที่เหลือ เมื่อถึงจุดยุติจะมีสีแดงอิฐเกิดขึ้น บันทึกปริมาตร KSCN ที่ใช้
- การคำนวณปริมาณเกลือของตัวอย่าง จากสูตร

$$\text{ปริมาณเกลือร้อยละ} = \frac{0.0058 (Y-X) \times 100}{W}$$

Y คือ ปริมาตรของ AgNO_3 (มิลลิลิตร) \times ความเข้มข้น AgNO_3

X คือ ปริมาตรของ KSCN (มิลลิลิตร) \times ความเข้มข้น KSCN

W คือ ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

ข6. การวิเคราะห์หาปริมาณถั่ว (A.O.A.C., 1990)

อุปกรณ์

- 1.เตาเผา
- 2.ถ้วยเผา
3. โถดูดความชื้น

วิธีการ

1.หาน้ำหนักที่แน่นอนของถ้วยเผา โดยการล้างถ้วยเผาให้สะอาดนำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 -600 องศาเซลเซียส แล้วเอาใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนัก ทำจนน้ำหนักคงที่

2. ชั่งตัวอย่าง 2-5 กรัมใส่ในถ้วยเผา
- 3.นำไปเผาให้หมดควัน (ในตู้ดูดควัน)
- 4.นำถ้วยเผาเข้าเผาต่อในเตาเผา ที่อุณหภูมิ 550 -600 องศาเซลเซียส นานประมาณ 5-12 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะได้ถั่วที่สมบูรณ์ ไม่มีส่วนที่เป็นสีดำเหลืออยู่
- 5.นำถ้วยเผาแล้วเอาใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนัก
6. การคำนวณปริมาณถั่วของตัวอย่าง จากสูตร

$$\text{ปริมาณถั่วร้อยละ} = \frac{\text{น้ำหนักของถั่ว} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

ข7.. วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Kahkonen *et al.*, 1999)

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องวัดไมโครเพลท (microplate reader, PowerWaveX, Biotek, U.S.A.)
2. ไมโครเพลท (microplate)
3. ไมโครปิเปต (micropipette)

สารเคมี

1. กรดแกลลิก (gallic acid)
2. Folin-Ciocalteu's reagent
3. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ร้อยละ 7.5

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

เตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิกให้มีความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 0.02, 0.05, 0.10, 0.2, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 5 มิลลิลิตร โดยใช้ น้ำกลั่น เป็นตัวทำละลาย

การเตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent

ปีเปต Folin reagent มา 10 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร แล้วปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์

การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนตมา 7.5 กรัม ถ่ายลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

การเตรียมตัวอย่าง

1. นำบดรูป รสพาสเจอร์ไรซ์กรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อแยกส่วนของแข็ง และของเหลวของบดรูป รสพาสเจอร์ไรซ์
2. ของเหลวที่แยกได้นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 แล้วนำไปบรรจุขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
3. ส่วนของแข็งนำไปตำจนเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปสกัดโดยชั่งตัวอย่างใส่ขวดรูปชมพู่ และเติมน้ำกลั่นปริมาตรเป็น 4 เท่าของตัวอย่าง จากนั้นนำไปบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 แล้วนำไปบรรจุขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิดสนิทเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ดัดแปลงจาก Yen and Hsieh, 1997)

การทดสอบ

ปีเปตตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well microplate ปีเปตสารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent ลงในสารตัวอย่าง หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นปีเปตสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตลงในสารตัวอย่าง หลุมละ 80 ไมโครลิตร พักไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader (PowerWaveX, Biotek, U.S.A.) โดยใช้ น้ำกลั่น 180 ไมโครลิตรผสมกับสารสกัดหยาบจำนวน 20 ไมโครลิตร เป็น blank sample

วิธีแปลผล

คำนวณความเข้มข้นของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในรูปของสมมูลกรดแกลลิก โดยใช้กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก สำหรับส่วนของแข็งของบดรูป รสพาสเจอร์ไรซ์ ดังสมการ

$$C = c \times V/m$$

โดยที่ C = ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด คิดเป็นกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมของน้ำหนักเปียกของตัวอย่าง

c = ความเข้มข้นของกรดแกลลิกเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร (OD 765 nm) ของตัวอย่างลบค่าการดูดกลืนแสงของ blank sample ออก แล้วแทนค่าเป็นค่า y ในสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก คำนวณค่า x

V = ปริมาตรของสารสกัด (มิลลิลิตร)

m = น้ำหนักเปียกของตัวอย่าง (กรัม)

คำนวณความเข้มข้นของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในรูปของสมมูลกรดแกลลิก โดยใช้กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก สำหรับส่วนของเหลวของบวคูปรงรสพาสเจอร์ไรซ์ ดังสมการ

$$C = c / v$$

v = ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

ข8. วิเคราะห์คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

การเตรียมตัวอย่างสำหรับบวคูปรงรสพาสเจอร์ไรซ์

1. นำบวคูปรงรสพาสเจอร์ไรซ์กรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อแยกส่วนของแข็ง และของเหลวของบวคูปรงรสพาสเจอร์ไรซ์

2. ของเหลวที่แยกได้นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 แล้วนำไปบรรจุขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. ส่วนของแข็งนำไปค้ำจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปสกัดโดยชั่งตัวอย่างใส่ขวดรูปชมพู่ และเติมน้ำกลั่นปริมาตรเป็น 4 เท่าของตัวอย่าง จากนั้นนำไปบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 แล้วนำไปบรรจุขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ดัดแปลงจาก Yen and Hsieh, 1997)

การเตรียมตัวอย่างสำหรับของเหลวที่ได้จากการหมัก

นำของเหลวที่ได้จากการหมักมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 ก่อนนำไปใช้วิเคราะห์

ข8.1 DPPH radical scavenging assay (ดัดแปลงจาก Wu *et al.*, 2003)

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องวัดไมโครเพลท
2. ไมโครเพลท
3. ไมโครปิเปต

สารเคมี

1. DPPH ความเข้มข้น 0.15 มิลลิโมลต่อลิตร
2. absolute ethanol

การเตรียม DPPH stock solution ใน Absolute ethanol

เตรียมสารละลาย DPPH ให้มีความเข้มข้น 0.15 มิลลิโมลต่อลิตร โดยการชั่ง DPPH 0.0024 กรัม ละลายและปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร ให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วย absolute ethanol เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ควรเตรียมก่อนใช้ 2-3 ชั่วโมง)

การเตรียมสารมาตรฐาน

สารมาตรฐานที่ใช้คือ โทรลอกซ์ ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ละลายน้ำได้ เตรียมให้มีความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ไมโครโมลต่อลิตร ความเข้มข้นละ 5 มิลลิลิตร โดยใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย

การทดสอบ

ปิเปตตัวอย่างความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงใน 96-well microplate แล้วเติมสารละลาย DPPH ที่มีความเข้มข้น 0.15 มิลลิโมลต่อลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในสารตัวอย่างผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า พักไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 518 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader (PowerWaveX, Biotek, U.S.A.)

หมายเหตุ

Blank sample คือ สารตัวอย่างปริมาตร 150 ไมโครลิตร + น้ำกลั่นปริมาตร 150 ไมโครลิตร

Control คือ สารละลาย DPPH ปริมาตร 150 ไมโครลิตร + ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 75 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร

วิธีแปลผล

คำนวณความสามารถจับอนุมูลอิสระของ DPPH ในรูปของสมมูลโทรลอกซ์ โดยใช้กราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ สำหรับส่วนของแข็งของบุดูปรงรสพาสเจอร์ไรซ์ ดังสมการ

$$C = c \times V / m$$

โดยที่ C = ความสามารถจับอนุมูลอิสระของ DPPH เทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (ไมโครโมลสมมูลย์ของโทรลอกซ์ต่อกรัมของน้ำหนักเปียกของตัวอย่าง)

c = ความสามารถจับอนุมูลอิสระของ DPPH เปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ (ไมโครโมลต่อลิตร) โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 518 นาโนเมตร (OD 518 nm) ของ control ลบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างและ blank sample ออก แล้วแทนค่าเป็นค่า y ในสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ คำนวณหาค่า x

V = ปริมาตรของสารสกัด (มิลลิลิตร)

m = น้ำหนักเปียกของตัวอย่าง (กรัม)

คำนวณค่าความสามารถจับอนุมูลอิสระของ DPPH เทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (ไมโครโมลสมมูลย์ของโทรลอกซ์ต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง) สำหรับส่วนของเหลวของบุดูปรงรสพาสเจอร์ไรซ์ และของเหลวที่ได้จากการหมัก ดังสมการ

$$C = c / v$$

v = ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

ข8.2 ABTS radical cation scavenging assay (ดัดแปลงจาก Arnao *et al.*, 2001)

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องวัดไมโครเพลท (microplate reader, PowerWaveX, Biotek, U.S.A.)
2. ไมโครเพลท (microplate)
3. ไมโครปิเปต (micropipette)

สารเคมี

1. ABTS ความเข้มข้น 7.4 มิลลิโมล/ลิตร
2. potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) ความเข้มข้น 2.6 มิลลิโมล/ลิตร
3. absolute ethanol

การเตรียมสารละลายอนุโมลิสระ ABTS

เตรียม ABTS ความเข้มข้น 0.014 โมลต่อลิตร โดยชั่ง ABTS มา 0.7682 กรัม ละลายและปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร ให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นเก็บไว้ในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

เตรียมโพแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ความเข้มข้น 4.8 มิลลิโมลต่อลิตร โดยชั่ง $K_2S_2O_8$ มา 0.1324 กรัม ละลายและปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร ให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

เตรียมสารละลายอนุโมลิสระ ABTS โดยนำ ABTS ความเข้มข้น 0.014 โมลต่อลิตร ทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 4.8 มิลลิโมลต่อลิตร ในอัตราส่วน 1:1 (ความเข้มข้นสุดท้ายของ ABTS และโพแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต คือ 7.0 และ 2.4 มิลลิโมลาร์) เก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาเจือจางด้วย absolute ethanol เพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.1 ± 0.02 ที่ 734 นาโนเมตร ควรเตรียมทันทีก่อนใช้

การเตรียมสารมาตรฐาน

สารมาตรฐานที่ใช้คือโทรลอกซ์ เตรียมให้มีความเข้มข้น 8 ระดับ คือ 50, 60, 100, 300, 400 และ 500 ไมโครโมลต่อลิตร ความเข้มข้นละ 5 มิลลิลิตร โดยใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย

การทดสอบ

ปิเปตตัวอย่างความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 15 ไมโครลิตร ลงใน 96-well microplate ปิเปตสารละลายอนุโมลิสระ ABTS ลงในสารตัวอย่างหลุมละ 285 ไมโครลิตร พักไว้ในที่มืดเป็นเวลา 120 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader (PowerWaveX, Biotek, U.S.A.)

หมายเหตุ

Blank sample คือ สารตัวอย่างปริมาตร 15 ไมโครลิตร + น้ำกลั่นปริมาตร 285 ไมโครลิตร

Control คือ ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 75 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร + สารละลายอนุโมลิสระ ABTS ปริมาตร 285 ไมโครลิตร

วิธีแปลผล

คำนวณความสามารถจับอนุมูลอิสระของ ABTS ในรูปของสมมูลย์ โทรลอกซ์ (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; TEAC) โดยใช้กราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ ดังสมการ

$$C = c / v$$

โดยที่ C = ความสามารถจับอนุมูลอิสระของ ABTS เทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (ไมโครโมลสมมูลย์ของโทรลอกซ์ต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง)

c = ความสามารถจับอนุมูลอิสระของ ABTS เปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ (ไมโครโมลต่อลิตร) โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร (OD 734 nm) ของ control ลบค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างและ blank sample ออก แล้วแทนค่าเป็นค่า y ในสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ คำนวณหาค่า x

v = ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

ข8.3 การวิเคราะห์สมบัติการเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (reducing power) (Oyaizu, 1988)

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องวัดไมโครเพลท (microplate reader, PowerWaveX, Biotek, U.S.A.)
2. ไมโครเพลท (microplate)
3. ไมโครปิเปต (micropipette)

สารเคมี

1. โซเดียมฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 6.6 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์
2. potassium ferricyanide ร้อยละ 1
3. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) เข้มข้นร้อยละ 10
4. สารละลาย Ferric chloride เข้มข้นร้อยละ 0.1

การทดสอบ

1. ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางด้วยโซเดียมฟอสเฟสบัฟเฟอร์แล้ว 200 ไมโครลิตร
2. เติมโซเดียมฟอสเฟสบัฟเฟอร์และ potassium ferricyanide อย่างละ 200 ไมโครลิตร
3. เติม TCA 200 ไมโครลิตร

4. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
5. ปิเปตของเหลวที่ได้ 200 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well microplate
6. เติม Ferric chloride 40 ไมโครลิตร
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate

Reader (PowerWaveX, Biotek, U.S.A.)

หมายเหตุ

1. สำหรับตัวอย่างของเหลวที่ได้จากการหมักใช้ปริมาตรตัวอย่างอยู่ที่ 0.25 มิลลิลิตร
2. สำหรับตัวอย่างบวคูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์ในส่วนที่เป็นของเหลวใช้ปริมาตรตัวอย่างอยู่ที่ 0.25 มิลลิลิตร ส่วนที่เป็นของแข็งใช้ตัวอย่าง 0.5 กรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

ค1. การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Viable Count) ได้แก่ จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง และจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ ด้วยเทคนิค pour plate (Vaanderzant and Splittstoesser, 1992)

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Plate count agar (PCA)
2. peptone water ร้อยละ 0.1

วิธีการ

1. ชั่งหรือปิเปตตัวอย่าง 15 กรัมหรือมิลลิลิตร ลงในถุงที่มี peptone water ร้อยละ 0.1 ที่ปลอดเชื้อจำนวน 135 มิลลิลิตร แล้วทำให้เข้ากันโดยการเขย่าเป็นเวลา 1 นาที
2. ทำการเจือจางให้ 10^{-1} - 10^{-6} โดยใช้ peptone water ร้อยละ 0.1
3. คูดตัวอย่างความเจือจางที่เหมาะสมจากข้อ 2 อย่างละ 1.0 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ) ลงในงานเพาะเชื้อ ที่ฆ่าเชื้อแล้ว
4. เทอาหาร PCA ซึ่งกำลังหลอมเหลวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในงานเพาะเชื้องานละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร

5. เขย่าจานเพาะเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับตัวอย่างเครื่องดัดฆ่าที่เจือจางโดยการหมุนจานเพาะเชื้อในทิศตามเข็มนาฬิกา 5 ครั้ง ทวนเข็มนาฬิกา 5 ครั้ง ทำอย่างระมัดระวังและรวดเร็วเพื่อไม่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวก่อน

6. ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว

7. บ่มเพาะเชื้อที่ 35-37 องศาเซลเซียส (จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง และจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ) ในลักษณะคว่ำจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8. ตรวจสอบจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อประมาณ 30-300 โคโลนี รายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัมหรือมิลลิลิตรของตัวอย่าง

โคโลนีต่อกรัมหรือมิลลิลิตรของตัวอย่าง = ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี \times ระดับความเจือจาง

ค2. การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ Halophilic bacteria (Chaveesuk *et al.*, 1993)

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Trypticase soy agar (TSA)
2. peptone water ร้อยละ 0.1
3. โซเดียมคลอไรด์ NaCl

วิธีการ

1. ปิเปตตัวอย่าง 15 มิลลิลิตร ลงในถุงที่มี peptone water ร้อยละ 0.1 ที่ปลอดเชื้อจำนวน 135 มิลลิลิตร แล้วทำให้เข้ากันโดยการเขย่าเป็นเวลา 1 นาที

2. ทำการเจือจางให้ 10^{-1} - 10^{-6} โดยใช้ peptone water ร้อยละ 0.1

3. คูดตัวอย่างความเจือจางที่เหมาะสมจากข้อ 2 อย่างละ 1.0 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ) ลงในจานเพาะเชื้อ ที่ฆ่าเชื้อแล้ว

4. เทอาหาร TSA ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10 ซึ่งกำลังหลอมเหลวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร

5. เขย่าจานเพาะเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับตัวอย่างเครื่องดัดฆ่าที่เจือจางโดยการหมุนจานเพาะเชื้อในทิศตามเข็มนาฬิกา 5 ครั้ง ทวนเข็มนาฬิกา 5 ครั้ง ทำอย่างระมัดระวังและรวดเร็วเพื่อไม่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวก่อน

6. ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว

7. สำหรับจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ นำไปใส่ใน anaerobic jar แล้ว
กำจัดอากาศออก

8. บ่มเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส ในลักษณะคว่ำงานเพาะเชื้อเป็นเวลา 72
ชั่วโมง

9. ตรวจสอบจำนวนโคโลนีจากงานเพาะเชื้อประมาณ 30- 300 โคโลนี รายงานผล
เป็นจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง

$$\text{โคโลนีต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง} = \text{ค่าเฉลี่ยของจำนวน โคโลนี} \times \text{ระดับความเจือจาง}$$

ค3. การวิเคราะห์ปริมาณ Coliforms และ *E. coli* (Hasegawa, 1987)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. EC broth (พร้อม Durham)
2. Lauryl sulphate tryptose broth (LST)
3. peptone water ร้อยละ 0.1

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 15 กรัม ลงในถุงที่มี peptone water ร้อยละ 0.1 ที่ปลอดเชื้อจำนวน
135 มิลลิลิตร แล้วทำให้เข้ากันโดยการเขย่าเป็นเวลา 1 นาที

2. ทำการเจือจางให้เป็น 10^{-1} - 10^{-3} โดยใช้ 0.1% peptone water

3. คุดตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} - 10^{-3} อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบที่
มี durham tube และ LST 10 มิลลิลิตร ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ความเจือจางละ 3 หลอด

4. บ่มเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

5. ตรวจสอบผลครั้งแรกเมื่อครบ 24 ชั่วโมง โดยสังเกตฟองอากาศใน durham tube
สำหรับหลอดที่ยังไม่ให้ผล ทำการบ่มเพาะเชื้อต่อไปจนครบ 48 ชั่วโมง รายงานผลเป็น MPN
โคลิฟอร์มแบคทีเรียขั้นแรก (presumptive)

6. เลือกหลอดที่เกิดแก๊สมาทำ Confirmed test โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ลงไฟมาเชื้อ
แล้วจุ่มลงในหลอดที่เลือกไว้ แล้วเขี่ยลงในหลอดเลี้ยงเชื้อที่มี EC broth พร้อม Durham tube

7. บ่มเพาะเชื้อ EC broth ที่ 44.5 ± 0.2 เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง

8. คำนวณหา MPN ของ *E. coli* ต่อกรัมอาหาร โดยดูจากจำนวนหลอด LST ที่
ผลิตแก๊ส

ค4. การวิเคราะห์ *S. aureus* (Hasegawa, 1987)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Baird parker medium (BP)
2. potassium tellurite ร้อยละ 0.1
3. peptone water ร้อยละ 0.1

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 15 กรัม ลงในถุงที่มี peptone water ร้อยละ 0.1 ที่ปลอดเชื้อจำนวน 135 มิลลิลิตร แล้วทำให้เข้ากันโดยการเขย่าเป็นเวลา 1 นาที
 2. ทำการเจือจางให้เป็น 10^{-1} - 10^{-3} โดยใช้ peptone water ร้อยละ 0.1
 3. คัดเลือกตัวอย่างที่มีระดับความเจือจางที่เหมาะสมจำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงบน BP agar plate จำนวน 3 ซ้ำ
 4. ใช้แท่งแก้งปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วจาน
 5. บ่มเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
 6. ตรวจสอบลักษณะโคโลนี เลือกนับโคโลนีที่มีสีดำ ขอบขาว และแฉวยใส รอบโคโลนีมีบริเวณใส (clear zone) รายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง
- โคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง = ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี \times ระดับความเจือจาง

ภาคผนวก จ การทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส

จ1. แบบทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส ด้วยวิธี 9-point hedonic scale

เรื่อง การให้คะแนนความชอบ

ผลิตภัณฑ์ บลูปรุงรสพาสเจอร์ไรซ์

ชื่อผู้ตัดสินใจ..... วันที่.....เวลา.....

ข้อแนะนำ กรุณาทดสอบตัวอย่างที่เสนอให้จากซ้ายไปขวา แล้วให้คะแนนความชอบตัวอย่างในแต่ละปัจจัยที่ตรงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด โดยกำหนดให้

- | | | |
|------------------|-------------------------------|---------------------|
| 9 = ชอบมากที่สุด | 6 = ชอบน้อยที่สุด | 3 = ไม่ชอบปานกลาง |
| 8 = ชอบมาก | 5 = บอกไม่ได้ว่าชอบหรือไม่ชอบ | 2 = ไม่ชอบมาก |
| 7 = ชอบปานกลาง | 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย | 1 = ไม่ชอบมากที่สุด |

คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส	คะแนนความชอบ			
	รหัส.....	รหัส.....	รหัส.....	รหัส.....
ลักษณะปรากฏ				
สี				
กลิ่น				
รสชาติ				
ความชอบรวม				

ข้อเสนอแนะ.....

ขอบคุณค่ะ

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวกาญจนารัตน์ อรุณรัตน์	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	4911020003	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2542
สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป		
เอกวิชาเคมี-ชีววิทยา		

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนการศึกษาระดับปริญญาโทในโครงการทักษะนักอุตสาหกรรมเกษตร จากศูนย์
พันธูวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
แห่งชาติ

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Arunrat, K., Thongraung, C., Siripongvutikorn, S. 2008. Chemical quality and antioxidative activity of fish protein hydrolysate produced from by-products. Food for Health and Wellbeing: Tradition Meets the Future. The auspices of International Union of Food Science and Technology (IUFoST). The venue of Congress 14th. Shanghai. 19-23 Oct 2008.

Arunrat, K., Thongraung, C., Siripongvutikorn, S. 2010. Total phenolic content and antioxidative activity in seasoning protein hydrolysate as affected by pasteurization and storage. Int. J. Food Sci. Technol. Submitted manuscript.