ผลของเครื่องในปลาและแบคทีเรียในการหมักบูดู
Effects of Fish Viscera and Bacteria in Budu Fermentation

นงลักษณ์ เกียรติตันสกุล
Nongluk Kiattansakul

Order Key 20431
BIB Key 161228

ก
เลขหมู่ SH336.F45 น421
เลขทะเบียน 9542 ฉ.2
8 ต.ค. 2542

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
Master of Science Thesis in Biotechnology
Prince of Songkla University
2542

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของเครื่องในปลาและแบคทีเรียในการหมักบูดู
ผู้เขียน นางสาวนงลักษณ์ เกียรติตันสกุล
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ชูฤทธิ์)

กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล)

คณะกรรมการสอบ

ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ชูฤทธิ์)

กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล)

กรรมการ
(ดร.สุกัญญา จันทะชุม)

กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของเครื่องในปลาและแบคทีเรียในการหมักบูดู
ผู้เขียน นางสาวนงลักษณ์ เกียรติตันสกุล
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2541

บทคัดย่อ

หมักบูดูโดยใช้ปลาซาร์ดีนทั้งตัวและปลาซาร์ดีนที่ไม่มีเครื่องใน ในอัตราส่วนปลาต่อเกลือเท่ากับ 3 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก ในภาวะการหมักกลางแจ้ง เป็นระยะเวลา 200 วัน ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมี กายภาพ จุลชีววิทยา กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสในระหว่างการหมักและคุณค่าทางโภชนาการเมื่อหมักครบ 200 วัน

บูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและจากปลาไม่มีเครื่องในที่หมักครบ 200 วัน จะมีคุณสมบัติทางเคมี ได้แก่ ปริมาณน้ำอิสระ 0.774 และ 0.778, พีเอช 6.27 และ 6.65, ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติกร้อยละ 0.96 และ 0.62, ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด 146.80 และ 124.02 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม, ปริมาณไตรเมธิลเอมีน 7.26 และ 7.55 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม,การย่อยสลายโปรตีนเท่ากับ 6.640 และ 4.765, ปริมาณอะมิโนไนโตรเจน 8.63 และ 5.16 กรัมต่อกิโลกรัม, ปริมาณเกลือร้อยละ 20.62 และ 21.56 ตามลำดับ มีคุณสมบัติทางกายภาพคือปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดร้อยละ 32.36 และ 27.71 ปริมาณของแข็งที่ละลายไม่ได้ทั้งหมดร้อยละ 2.85 และ 5.62 ตามลำดับ ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 7.88 logCFU/g และ 8.33 logCFU/g ตามลำดับ ปริมาณแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกในอาหาร APT เท่ากับ 8.04 logCFU/g และ 7.86 logCFU/g ตามลำดับ และในอาหาร MRS เท่ากับ 8.14 logCFU/g และ 7.93 logCFU/g ตามลำดับ ปริมาณเอนไซม์โปรติเอส 32.07 และ 21.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและไลเปส 0.296 และ 0.232 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

บูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในจะมีคุณค่าทางโภชนาการคือมีดีเอชเอเท่ากับ 0.072 และ 0.052 กรัมต่อ 100 กรัม และอีพีเอเท่ากับ 0.026 และ 0.200 กรัมต่อ 100 กรัมตามลำดับ บูดูทั้งสองชุดการทดลองมีกรดอะมิโนที่จำเป็นครบทุกชนิด

เพื่อเร่งระยะเวลาหมักจึงแยกแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกจากอาหาร MRS และ APT โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกจะผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสในอาหารแข็งที่มีหางนมผงและอาหารที่มี Tributyrin ซึ่งเติมเกลือร้อยละ 10 เติม จากนั้นจึงเติมแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จำนวน 8 สายพันธุ์ลงในบูดูที่หมักจากปลาซาร์ดีนทั้งตัวนาน 50 วัน ตามวิธีที่กล่าวข้างต้นและหมักต่ออีก 30 วัน ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของการย่อยสลายและเอนไซม์โปรติเอสทุก 10 วัน และทดสอบทางประสาทสัมผัสเมื่อหมักครบ 30 วัน พบว่า บูดูที่หมักโดยการเติมกล้าเชื้อไม่แตกต่างกับการหมักในชุดควบคุม เมื่อจำแนกชนิดแบคทีเรียพบว่าทั้ง 8 สายพันธุ์จัดอยู่ในสกุล *Staphylococcus* ได้แก่ *S. equorum* 2 สายพันธุ์ *S. gallinarum* 5 สายพันธุ์ *S. xylosus* 1 สายพันธุ์

Thesis Title	Effects of Fish Viscera and Bacteria in Budu Fermentation
Author	Miss Nongluk Kiattansakul
Major Program	Biotechnology
Academic Year	1998

Abstract

Budu was prepared from whole sardine (*Sardinella gibbosa*), sardine without viscera and salt in a ratio of 3:1 by weight and allowed to ferment under the sun for 200 days. The samples were taken during fermentation for chemical, physical and microbiological analyses and protease and lipase determination. At day 200, nutrition values of Budu products were also evaluated.

At day 200, the chemical composition of Budu prepared from whole fish and fish without viscera were Aw of 0.774 and 0.778; pH of 6.27 and 6.65; lactic acid of 0.96 and 0.62%; total volatile base of 146.8 and 124.02 mg/100 g; trimethylamine of 7.26 and 7.55 mg/100 g ; degree of hydrolysis of 6.640 and 4.765; amino nitrogen of 8.63 and 5.16 g/kg and salt of 20.62 and 21.56%, respectively. At day 200, physical property of Budu prepared from whole fish and fish without viscera were total soluble solid of 32.36 and 27.71%; total nonsoluble of 2.85 and 5.62%, respectively. Protease activity of Budu prepared from whole fish and fish without viscera were 32.07 and 21.12 U/ml and lipase activity were 0.296 and 0.232 U/ml at the end of fermentation (200 days), respectively. The total viable count of bacteria in budu prepared from whole fish and fish without viscera at day 200 were 7.88 log CFU/g and 8.33 logCFU/g, respectively. The levels of lactic acid producing bacteria were 8.04 logCFU/g and 7.86 logCFU/g on APT medium and 8.18 logCFU/g and 7.93 logCFU/g on MRS medium, respectively. Nutrition value of Budu prepared from whole fish and fish without viscera were 0.072 and 0.052 g/100 g DHA and 0.026 and 0.200 g/100 g EPA, respectively. Essential amino acids were found in Budu products.

In order to acceleration of fermentation time, 8 strains of lactic acid producing bacteria from MRS and APT agar were isolated. They produced clear zone on skim milk and tributyrin agar media supplemented with 10% NaCl. The 8 strains were separately added to Budu which was fermented from whole sardine for 50 days under the same condition as described above. Fermentation was further carried out for 30 days. The degree of hydrolysis and protease activity of the Budu were inveatigated every 10 day. Sensory evaluation of the Budu products were performed after 30 days of fermentation.

At day 30, the result revealed that Budu products prepared by addition of the bacterial cells were not significantly different from control experiment ($P > 1$). The morphological, physiological and biochemical characteristics of the 8 isolates were examined and identified as *Staphylococcus equorum* 2 strains; *S. gallinarum* 5 strains; *and S. xylosus* 1 strain.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ชูฤทธิ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาเคี่ยวเข็ญ ให้คำปรึกษา คำแนะนำตลอดการทำวิจัยและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุลกรรมการที่ปรึกษาร่วม ดร.สุกัญญา จันทะชุม กรรมการผู้แทนคณะอุตสาหกรรมเกษตร และรองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาและวิจัยเป็นเวลา 1 ปีการศึกษา และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ พ่อ แม่ พี่และญาติๆ ด้วยความเคารพรักยิ่ง ที่ได้ให้กำลังใจและสนับสนุนการศึกษาของข้าพเจ้ามาโดยตลอด ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร ตลอดจนทุกท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัย และให้คำแนะนำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

นงลักษณ์ เกียรติตันสกุล

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อ (3)

Abstract (5)

กิตติกรรมประกาศ (7)

สารบาญ (8)

รายการตาราง (9)

รายการภาพประกอบ (11)

บทที่

1. บทนำ 1
   - บทนำต้นเรื่อง 1
   - ตรวจเอกสาร 2
   - วัตถุประสงค์ 28
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ 29
   - วัสดุ 29
   - อุปกรณ์ 30
   - วิธีการ 31
3. ผลและวิจารณ์ 36
4. สรุป 69

บรรณานุกรม 70

ภาคผนวก 87

- ภาคผนวก ก. อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ อาหารทดสอบเชื้อ และวิธีการทดสอบ 87
- ภาคผนวก ข. สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์ 94
- ภาคผนวก ค. แบบทดสอบดมแบบพรรณนาเชิงปริมาณ 111
- ภาคผนวก ง. กราฟมาตรฐาน 112
- ภาคผนวก จ. แผนภูมิแสดงการเทียบเคียงแบคทีเรีย 114

ประวัติผู้เขียน 115

รายการตาราง

ตารางที่ หน้า

1. อัตราการเกิดสารประกอบไนโตรเจนชนิดต่างๆในส่วนของของเหลวระหว่างการหมักบูดู 13
2. สารไนโตรเจน (ร้อยละ) ที่เกิดในส่วนของของเหลวระหว่างการหมักบูดู 14
3. เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบไนโตรเจนของบูดูกับน้ำปลา 15
4. คุณสมบัติทางเคมีของบูดูและน้ำปลา 16
5. ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ในบูดูและน้ำปลา 24
6. เปรียบเทียบองค์ประกอบของกรดอะมิโนในน้ำปลาชนิดต่างๆ (มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) 25
7. องค์ประกอบทางเคมีของปลาซาร์ดีน 36
8. กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสในระหว่างการหมักบูดูที่ทำจากปลาซาร์ดีนทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องใน 40
9. ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง) ที่ตรวจพบในบูดูแต่ละชนิด 56
10. คุณสมบัติทางเคมีของบูดูจากปลาซาร์ดีน 58
11. ชนิดและปริมาณกรดไขมัน (กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง) ในบูดูแต่ละชนิด 61
12. กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 8 สายพันธุ์ 63
13. กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 8 สายพันธุ์บนอาหารแข็ง Tributyrin 64

ตารางที่ หน้า

14. การย่อยสลายโปรตีนของบูดูที่หมักโดยวิธีธรรมชาติ เปรียบเทียบกับการเติมกล้าเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ 65

15. กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในบูดูหมักโดยวิธีดั้งเดิม เปรียบเทียบกับการเติมกล้าเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ 66

16. เปรียบเทียบการประเมินผลทางประสาทสัมผัสของบูดูที่หมักโดยวิธีเติมกล้าเชื้อและที่หมักตามธรรมชาติ 67

17. คุณสมบัติทางสัณฐาน และชีวเคมีสำหรับการเทียบเคียงแบคทีเรีย 68

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1.	การเปลี่ยนแปลงของน้ำอิสระในระหว่างการหมักบูดูจากปลาซาร์ดีนทั้งตัวและปลาที่ไม่มีเครื่องใน	38
2.	การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียทั้งหมดในระหว่างการหมักบูดูจากปลาซาร์ดีนทั้งตัวและปลาที่ไม่มีเครื่องใน	42
3.	การเปลี่ยนแปลงของพีเอช ปริมาณกรด และแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกในระหว่างการหมักบูดูจากปลาซาร์ดีนทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องใน	45
4.	เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของการย่อยสลายโปรตีนและปริมาณอะมิโนไนโตรเจนในระหว่างการหมักบูดูจากปลาซาร์ดีน	48
5.	เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดและปริมาณไตรเมธิลเอมีน ในบูดูที่หมักจากปลาซาร์ดีนทั้งตัวและปลาซาร์ดีนไม่มีเครื่องใน	51
6.	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณของแข็งที่ละลายได้และละลายไม่ได้ทั้งหมดในระหว่างการหมักบูดูจากปลาซาร์ดีนทั้งตัวและปลาที่ไม่มีเครื่องใน	54
ภาคผนวก ง1	กราฟมาตรฐานไทโรซีนที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร	112
ภาคผนวก ง2	กราฟมาตรฐานของกรดโอลิอิกในสารละลายไอโซออกเทนที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร ด้วยวิธี cupric acetate	113

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

บูดูเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมักดั้งเดิมซึ่งผลิตและบริโภคกันมากในประเทศมาเลเซียและทางภาคใต้ของประเทศไทย สำหรับประเทศไทยแหล่งผลิตที่มีชื่อเสียงอยู่ที่ อำเภอสายบุรี จังหวัดปัตตานี (อรพิน ภูมิภมร, 2526) บูดูนิยมใช้เป็นเครื่องปรุงรสเช่นเดียวกับน้ำปลา นอกจากนี้ยังเป็นเครื่องปรุงของอาหารที่เรียกว่า ข้าวยำอีกด้วย

บูดูที่ผลิตในภาคใต้จะมีองค์ประกอบทางเคมีคือ อะมิโนไนโตรเจน 5.59-24.13 กรัมต่อลิตร ปริมาณโปรตีนร้อยละ 3.00-11.43 ปริมาณเกลือร้อยละ 17.16-24.08 ปริมาณกรดแลคติกร้อยละ 0.041-0.144 และพีเอชอยู่ใน 4.75-6.80 (จักรี ทองเรือง และจงเกษม วณิชสุวรรณ, 2532) มีคุณค่าทางโภชนาการคือ ให้พลังงาน 24 แคลลอรี่ต่อบูดู 100 กรัม (กองโภชนาการ, 2530)

การทำบูดูเป็นการถนอมอาหารวิธีหนึ่งที่ทำได้ง่าย ประหยัด ช่วยรักษาคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร ป้องกันการเน่าเสีย และเป็นการแปรรูปอาหารทำให้อาหารมีลักษณะ สี กลิ่น รสเฉพาะตัว กรรมวิธีการหมักบูดูของไทย จะทำโดยนำปลาทั้งตัวมาล้างน้ำและปลาที่ใช้ควรเป็นปลาที่มีปริมาณไขมันสูง (Stansby, 1990) เช่นปลาไส้ตัน ปลากะตัก ปลาหลังเขียว และปลาแดง หรือในบางแห่งจะใช้ปลาที่มีราคาแพง เช่น ปลาทูแขก จากนั้นนำมาคลุกเคล้ากับเกลือเม็ดในอัตราส่วน ปลาต่อเกลือเท่ากับ 3 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก ปลาที่คลุกเคล้ากับเกลือแล้วจะบรรจุใส่โอ่งเคลือบ หรือบ่อซีเมนต์ที่ตากแดดจนแห้ง โดยบรรจุปลา 8 ใน 10 ส่วนของภาชนะ ใช้ไม้ไผ่ขัดปากภาชนะไว้แล้วปิดฝา ทิ้งให้เกิดการหมักโดยธรรมชาติโดยอาจวางตากแดดหรือวางไว้ในที่ร่ม (มาลี อมรทิพย์รัตน์, 2522) จากรายงานของพงษ์เทพ เกิดเนตร (2533) พบว่าบูดูที่หมักโดยวิธีนี้จะใช้เวลา 150 วัน ผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของเหลวข้นสีเทา ส่วนน้ำหมักปลาตอนบนมีสีน้ำตาลใส และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

เนื่องจากบูดูเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีเกลือในปริมาณสูง (ร้อยละ 20) จึงต้องใช้ระยะเวลาในการหมักนาน ในการทดลองครั้งนี้จึงทำการศึกษาบทบาทของเครื่องในปลาต่อการหมักบูดู โดยวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักและทำการแยกแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในการหมัก เพื่อคัดเลือกชนิดจุลินทรีย์ ที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดี หาวิธีการลดระยะเวลาในการหมักให้สั้นลง เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงและพัฒนาการผลิตบูดูต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. ความหมายของการหมัก

การหมัก หมายถึงกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของสารอินทรีย์โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ เพื่อทำให้สารอินทรีย์นั้นเปลี่ยนเป็นสารที่มีองค์ประกอบง่ายขึ้น หรือกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารที่มีองค์ประกอบต่างๆ ให้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน (นงนุช รักสกุลไทย, 2530) นอกจากนี้ Potter (1986) กล่าวว่าการหมัก คือการย่อยสลายสารภายใต้สภาวะไร้อากาศหรือมีอากาศโดยจุลินทรีย์ ซึ่งผลผลิตที่ได้จากการหมักจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค นอกจากนี้การหมักยังทำให้อาหารมีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้นกว่าเดิม โดยจุลินทรีย์จะย่อยสลายหรือผลิตสารเช่น วิตามิน และยังทำให้อาหารมีองค์ประกอบง่ายขึ้น แต่ Coombs (1988) ได้ให้คำจำกัดความของการหมักไว้ว่า การหมักคือ การย่อยสลายสารอินทรีย์โดยจุลินทรีย์หรือเซลล์ให้ได้เป็นพลังงานเคมี เช่น ATP โดยไม่ใช้ออกซิเจน

2. ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

2.1 จุดประสงค์ของการหมัก

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตขึ้น เพื่อวัตถุประสงค์ที่สำคัญ 2 ประการคือ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ที่ต้องการและเพื่อการถนอมอาหาร โดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนวัตถุดิบให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (วิลาวัณย์ เจริญจิระ

ตระกูล, 2536) และในอาหารหมักจะจัดสภาวะให้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ทำให้อาหารเสียและเป็นพิษ จึงสามารถบริโภคอาหารเหล่านี้ได้อย่างปลอดภัย (วิเชียร วรพุทธพร, 2526)

2.2 การแบ่งกลุ่มผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

ผลิตภัณฑ์ปลาหมักจะมีปลาและเกลือเป็นองค์ประกอบหลัก ผลิตภัณฑ์ที่ได้เกิดจากการย่อยสลายเนื้อปลาโดยเอนไซม์จากตัวปลาและจากจุลินทรีย์ให้เป็นสารที่มีองค์ประกอบง่ายขึ้น เช่น กรดอะมิโน แต่ในผลิตภัณฑ์ปลาหมักบางชนิดเช่น ปลาส้ม นอกจากจะเติมเกลือแล้วยังเติมแหล่งของคาร์โบไฮเดรตในรูปข้าวสุก โดยคาร์โบไฮเดรตที่เติมจะถูกย่อยสลาย และใช้โดยจุลินทรีย์ ส่งผลให้อาหารหมักมีสภาพเป็นกรดซึ่งจะทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดที่ไม่ทนกรด นอกจากชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักแล้ว ระยะเวลาในการหมักรวมทั้งสภาวะของการหมักจะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ปลาหมักแตกต่างกันด้วย (อรพิน ภูมิภมร, 2526 ; Prescott and Dunn, 1959 ; Amano, 1962 ; Rao, 1967) ดังนั้นอาจแบ่งผลิตภัณฑ์ปลาหมักเป็นชนิดต่างๆ ได้ดังนี้

ก. ตามลักษณะการหมักได้แก่ 1)ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่เกิดจากเอนไซม์ภายในตัวปลาโดยเติมเกลือเป็นองค์ประกอบเพียงอย่างเดียว 2)ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่เกิดจากเอนไซม์ภายในตัวปลาร่วมกับเอนไซม์จากจุลินทรีย์ซึ่งเติมในรูปกล้าเชื้อ 3)ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่ได้จากกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ (Amano, 1962)

ข. ตามลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้แก่ 1)ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่มีลักษณะปรากฏเป็นตัว เช่น ปลาส้ม ปลาเจ่า ปลาร้า 2)ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่มีลักษณะกึ่งเหลวกึ่งแข็ง (paste) เช่น กะปิ 3)ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่มีลักษณะเป็นของเหลว เช่น น้ำปลา บูดู (Rao, 1967)

ค. ตามวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักได้แก่ 1)ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่ใช้ปลาและเกลือเป็นส่วนผสม เช่น น้ำปลา บูดู ปลาเค็ม 2)ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่ใช้ปลา เกลือและคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนผสม เช่น ปลาร้า ปลาส้ม ปลาเจ่า (Adams, *et al.*, 1985)

ง. ตามความเข้มข้นของเกลือในผลิตภัณฑ์ได้แก่ 1)ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่มีเกลือสูง (ร้อยละ 20) เช่น น้ำปลา กะปิ บูดู 2)ผลิตภัณฑ์ที่มีเกลือต่ำ (ร้อยละ 6-8) เช่น

ปลาร้า ปลาเจ่า 3)ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่ไม่มีเกลือ เช่น katsuobushi (ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่ทำจากปลา bonito หมักร่วมกับเถ้าจากต้นไม้) (Lee, 1989)

จ. ตามประเภทของเอนไซม์ที่ใช้ในระหว่างการหมักและวัตถุดิบได้แก่ 1)ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่ได้จากการหมักปลาและเกลือ และอาศัยเอนไซม์จากตัวปลาและจุลินทรีย์ร่วมกันย่อยสลายเนื้อปลา เช่น กะปิ น้ำปลา บูดู ไตปลา 2)ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่ได้จากการหมักปลา เกลือ และคาร์โบไฮเดรตโดยอาศัยเอนไซม์จากตัวปลาและจุลินทรีย์ร่วมกันย่อยสลายเนื้อปลา 3)ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่ได้จากการหมักปลา เกลือ และคาร์โบไฮเดรตโดยอาศัยเอนไซม์จากตัวปลาและจุลินทรีย์ซึ่งเติมในรูปกล้าเชื้อร่วมกันย่อยสลายเนื้อปลา (Saisithi, 1987 a,b)

ผลิตภัณฑ์ปลาหมักของไทยสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทได้แก่

1) ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่มีปริมาณเกลือสูง ได้แก่ บูดู กะปิ และปลาทูเค็มเป็นต้น

2) ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่เติมแหล่งคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ ส้มฟัก ปลาร้า และปลาแป้งแดง

3) ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่เติมผักและผลไม้ ได้แก่ Khem-mak-nat (ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่เติมสับปะรด) และ Pla-num (ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่ทำจากปลาซ่อนที่เติมข้าวคั่วและมะละกอ) (Phithakpol, *et al.*, 1994)

3. กรรมวิธีการทำปลาหมักที่มีเกลือสูง

3.1 แบบธรรมชาติ

Cole (1963) กล่าวว่ากรรมวิธีการหมักบูดูในมาเลเซียมี 3 วิธีด้วยกัน ซึ่งจะได้บูดูที่มีความแตกต่างกันในด้านกลิ่น รส แม้จะใช้ปลาสกุลเดียวกัน Rao (1967) กล่าวว่าการหมักบูดูในประเทศมาเลเซียมี 3 วิธีเช่นเดียวกัน กรรมวิธีการหมักบูดูตามรายงานของ Cole มีดังนี้

วิธีที่1 ล้างปลาให้สะอาด คลุกเคล้ากับเกลือในอัตราส่วนปลา 30 ปอนด์ต่อเกลือ 6 ปอนด์หรือเท่ากับ 5 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก นำไปบรรจุในโอ่งดินที่มีมะขามบดละเอียด 1

ปอนด์ละลายน้ำ 1 ควอตอยู่ก่อนแล้ว (แต่ Rao (1967) รายงานว่าบูดูของมาเลเซียไม่เติมมะขาม) จากนั้นอัดปลาให้แน่นเพื่อไล่อากาศออก ราดด้วยน้ำตาลปีบหนัก 2 ปอนด์ แล้วปิดฝาโอ่งให้แน่นเก็บไว้ในที่เย็นประมาณ 6 สัปดาห์ ก็สามารถนำมาบริโภคได้ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักจะมีลักษณะเป็นของเหลวข้น ส่วนที่เป็นน้ำหมักปลาเป็นสีน้ำตาลใส กลิ่นหอม หวานและเค็ม เป็นน้ำบูดูชนิดที่ดีที่สุด น้ำบูดูชนิดนี้สามารถเก็บไว้บริโภคได้นานถึง 2 ปี

วิธีที่ 2 เป็นวิธีที่นิยมผลิตกันมากและง่ายกว่าวิธีแรก โดยใช้ปลาที่ล้างสะอาดแล้วผสมกับเกลือในอัตราส่วนปลาหนัก 100 ปอนด์ต่อเกลือหนัก 30 ปอนด์หรือเท่ากับ 3 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก บรรจุส่วนผสมนี้ลงในโอ่งดิน อัดปลาให้แน่น แล้วหมักไว้ในที่ร่มนานประมาณ 140 วัน

วิธีที่ 3 ใช้วิธีการเดียวกับวิธีที่ 2 แต่วางโอ่งไว้กลางแดดเฉยๆ หรือใช้ไม้กวนทุกวันหมักทิ้งไว้จนกระทั่งเนื้อปลาเปลี่ยนเป็นของเหลวข้น บูดูชนิดนี้มีกลิ่นรส คล้ายน้ำปลามาก

กรรมวิธีการหมักบูดูของไทยจะนำปลาทั้งตัวมาล้างน้ำโดยไม่ต้องเอาเครื่องในออก นำมาคลุกเคล้ากับเกลือเม็ดในอัตราปลา 3 ส่วนต่อเกลือ 1 ส่วนโดยน้ำหนัก โดยแบ่งเกลือไว้ส่วนหนึ่งเพื่อนำมากลบผิวหน้าปลาที่คลุกเคล้ากับเกลือ แล้วบรรจุใส่ในโอ่งเคลือบหรือบ่อซีเมนต์ที่ได้ตากแดดไว้จนแห้งสนิท อัดปลาให้แน่นเพื่อไล่อากาศออก ปริมาณปลาจะบรรจุเพียง 8 ใน 10 ส่วนของถังหมัก ขัดปลาด้วยไม้ไผ่สาน เพื่อป้องกันปลาลอยเหนือน้ำหมักปลา ปิดฝาวางตากแดดหรือในที่ร่ม ประมาณ 3-12 เดือน (มาลี อมรทิพย์รัตน์, 2522)

3.2 แบบเร่งรัด (Acceleration) : การใช้กล้าเชื้อ

Togano และคณะ (1978 อ้างโดย Beddows, 1985) ใช้โคจิ (koji) ในการหมักน้ำปลา โดยใช้อัตราส่วนปลาต่อเกลือต่อโคจิ เท่ากับ 3 ต่อ 1 ต่อ 1 พบว่าจะช่วยลด ระยะเวลาในการหมักน้ำปลา

Park และคณะ (1979 อ้างโดย Beddows, 1985) รายงานว่าเมื่อใช้โคจิที่ทำจากถั่วเหลืองในการหมักน้ำปลา จะช่วยลดระยะเวลาในการหมักได้

Nambudiry (1980) ใช้กล้าเชื้อในรูปโคจิ ซึ่งประกอบด้วยยีสต์ รา และแบคทีเรีย เป็นกล้าเชื้อในการผลิตน้ำปลา เมื่อตรวจหาชนิดของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์จะพบ *Lactobacillus plantarum* และ *L. pentoaceticus* ในปริมาณมาก

Ijong และ Ohta (1995c) ใช้กล้าเชื้อผสมของแบคทีเรียแลคติกซึ่งแยกได้จากการหมักปลาซาร์ดีนในการผลิตน้ำปลาอินโดนีเซีย พบว่าจะทำให้น้ำปลามีปริมาณของกรดอะมิโนมากกว่าน้ำปลาที่ไม่ได้ใช้กล้าเชื้อโคจิ

ในประเทศไทยได้มีการทดลองหมักผลิตภัณฑ์หลายชนิดด้วยเชื้อบริสุทธิ์ เช่น การเติม *Pediococcus cerevisiae* ในปลาเจ่า จะทำให้ปลาเจ่าที่หมักระยะเวลา 5 วันมีค่าพีเอช และเปอร์เซ็นต์กรดใกล้เคียงกับปลาเจ่าที่หมักโดยวิธีธรรมชาตินาน 10 วัน และการเติม *P. cerevisiae* และ *Lactobacillus brevis* ในปลาส้ม ทำให้หมักปลาส้มได้เร็วขึ้น (นาถสุดา วิศววงศ์, 2522 อ้างโดย นภา โล่ห์ทอง, 2534) ส่วนในไตปลา กุ้งจ่อม และหอยแมลงภู่ดอง ถ้าเติม *P. halophilus* ในการหมัก สามารถลดระยะเวลาหมักและได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นและรสเหมือนกับการหมักตามธรรมชาติ (จินดารัตน์ นิติวัฒนพงษ์, 2522 อ้างโดย นภา โล่ห์ทอง, 2534) ในการเติมเชื้อ *P. halophilus* ในการหมักบูดู พบว่าบูดูที่ได้มีกลิ่นหอมมากกว่าบูดูที่หมักตามธรรมชาติ แต่มีปริมาณกรดและพีเอชเหมือนกับการหมักบูดูตามธรรมชาติ (มาลี อมรทิพย์รัตน์, 2522)

Chaiyanan และคณะ (1988) สามารถลดระยะเวลาในการผลิตน้ำปลาจาก 1 ปี เหลือเพียง 30 วัน โดยใช้กล้าเชื้อ *P. halophilus*, Coryneform bacteria และ *Micrococcus* หมักปลา Mackeral, ปลา Anchovies และหมักหัวปลาร่วมกับเครื่องในจากปลาทูน่า โดยใช้ระบบหมุนเวียน

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตบูดู

4.1 ปัจจัยภายใน : วัตถุดิบ

4.1.1 ปลา

ปลาที่ใช้ในการทำบูดูและน้ำปลา ควรเป็นปลาที่มีขนาดไม่ใหญ่ และมีปริมาณไขมันมาก (Stansby, 1982 ; พิสิฐ กาญจนไพศิษฐ์, 2520) ในประเทศมาเลเซีย

ปลาที่นิยมใช้ในการทำบูดูจะอยู่ในสกุล *Stolephorus* ได้แก่ปลาไส้ตัน และปลากะตัก (Beddows, *et al.*, 1979) สำหรับประเทศไทยชนิดของปลาที่นิยมใช้ในการหมักบูดูได้แก่ ปลาไส้ตัน ปลากะตัก ปลาหลังเขียวและปลาแดง แต่ในบางแห่งจะใช้ปลาที่มีราคาแพง เช่น ปลาทูแขก (มาลี อมรทิพย์รัตน์, 2522 ; ละอองวรรณ เหมจินดา, 2526)

พงษ์เทพ เกิดเนตร (2533) รายงานว่าบูดูที่ทำจากปลาต่างชนิดกันจะให้การยอมรับต่างกัน โดยพบว่าบูดูที่ทำจากปลาหลังเขียว จะมีลักษณะทางกายภาพ ทางเคมีและการยอมรับมากกว่าบูดูที่ทำจากปลากะตัก Cole (1963) พบว่าแม้ว่าจะใช้ปลาชนิดเดียวกันแต่ถ้ากรรมวิธีในการหมักต่างกันก็จะให้รสชาติที่ไม่เหมือนกัน

4.1.2 เกลือ

เกลือเป็นวัตถุดิบหลักที่สำคัญในการหมักปลา เพราะมีส่วนสำคัญต่อกลิ่น รส และคุณสมบัติในการเก็บรักษาปลา (อรพิน ภูมิภมร, 2526) ปริมาณเกลือที่สูงจะไปเพิ่มแรงดันออสโมซีสและมีผลทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นพิษ และจุลินทรีย์บางชนิดที่ทำให้กลิ่นและรสของผลิตภัณฑ์เสียไป ซึ่งจะไม่พบจุลินทรีย์ดังกล่าวในผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่มีปริมาณเกลือมากกว่าร้อยละ 20 แต่ถ้าปริมาณเกลือต่ำกว่าร้อยละ 20 จะตรวจพบจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวได้ (Lee, 1989) และในขณะเดียวกันเกลือจะไปทำให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนทำงานช้าลงด้วย (Voskresensky, 1965) จึงทำให้ต้องใช้เวลานาน ดังนั้นการหมักน้ำปลาหรือบูดูจึงต้องเสียเวลาอย่างน้อย 8 เดือนถึง 1 ปี ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของปลาที่ใช้ Zung และ K' sev (1993) ศึกษาผลของเกลือต่อการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลา โดยใช้เกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 25 และ 35 หมักปลาเป็นเวลา 180 และ 360 วัน จากการทดลองพบว่า น้ำปลาที่ใช้เกลือร้อยละ 20 จะมีปริมาณกรดอะมิโน และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูงที่สุด

4.2 ปัจจัยภายนอก

4.2.1 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในอาหารหมักมีทั้ง แบคทีเรีย ยีสต์ และรา แต่ในอาหารหมักที่มีเกลือในปริมาณสูง จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญที่สุดคือ จุลินทรีย์ที่ชอบเกลือ (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536 ; Thongthai, *et al.*, 1992) ส่วน Thongthai และ

Siriwongpairat (1989 อ้างโดย Charabuddhanond and Thongthai, 1991) พบว่าจะมีจุลินทรีย์อย่างน้อย 2 ชนิดในกระบวนการหมักน้ำปลา จุลินทรีย์ที่มีบทบาทหลักในการหมักน้ำปลาคือ แบคทีเรียที่ชอบเกลือ (extremely halophilic bacteria) และจุลินทรีย์ที่มีบทบาทรองลงมาคือ แบคทีเรียที่ทนเกลือ หรือชอบเกลือปานกลาง (moderately halophilic bacteria) (Thongthai and Suntinanalert, 1991) ส่วนจุลินทรีย์ที่พบในผลิตภัณฑ์ปลาหมักจะมาจากตัวปลา เกลือ และสิ่งแวดล้อม (ประเสริฐ สายสิทธิ์, 2533) จำนวนของแบคทีเรียที่อยู่บนตัวปลาทะเลที่จับได้ใหม่ๆ มีตั้งแต่ 10^2 เซลล์ถึงหลายล้านเซลล์ต่อพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร น้ำจากลำไส้ของปลาจะมีแบคทีเรียจำนวน 10^3-10^8 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ที่บริเวณเหงือกอาจพบแบคทีเรียตั้งแต่ 10^3-10^6 เซลล์ต่อกรัม ความแตกต่างของจำนวนแบคทีเรียที่พบนั้นจะขึ้นอยู่กับ วิธีการจับปลา สถานที่ และฤดูกาล (สุมาลี เหลืองสกุล, 2527) จุลินทรีย์ที่พบในปลาทะเล ได้แก่ *Achromobacter Flavobacterium Pseudomonas* และ *Micrococcus* (นงลักษณ์ สุทธิวนิช, 2531) นอกจากนี้ยังตรวจพบ *Vibrio, Bacillus, Clostridium* และ *Escherichia* ด้วย (ศิวาพร ศิวเวชช, 2526) ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในเครื่องในปลามีความสำคัญมาก ถ้าเอาเครื่องในปลาออกไปจะทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ลดลง ส่งผลให้การย่อยสลายเนื้อปลาดำเนินไปอย่างช้าๆ (Lantz and Gunasekera, 1955 อ้างโดยมาลี อมรทิพย์รัตน์, 2522)

จุลินทรีย์ที่พบในเกลือสมุทรส่วนใหญ่จะเป็นสกุล *Bacillus* ได้แก่ *B. subtilis, B. megaterium* นอกนั้นเป็น *Micrococcus* sp., *Sarcina* sp. และ *Halobacterium* sp. (Bain, *et al.*, 1957 อ้างโดยพงษ์เทพ เกิดเนตร, 2533)

4.2.2 เอนไซม์

หลังจากปลาตาย เอนไซม์จากอวัยวะส่วนต่างๆของปลา โดยเฉพาะบริเวณลำไส้จะออกมาทางช่องท้อง แล้วไปยังกล้ามเนื้อปลา ทำให้เกิดการย่อยสลายเนื้อปลา (Autolysis) ได้อย่างรวดเร็ว (ประเสริฐ สายสิทธิ์, 2514) ระดับและชนิดของเอนไซม์โปรติเอสจะแตกต่างกันไปตามส่วนต่างๆของตัวปลา สำหรับเอนไซม์โปรติเอสภายในตัวปลาสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ

1) เอนไซม์ในเครื่องในปลาและทางเดินอาหารได้แก่ ทริปซิน ไคโมทริปซิน และเปปซิน เป็นต้น

2) เอนไซม์ในเนื้อเยื่อได้แก่ คาเทปซิน (Meinke, *et al.*, 1972)

ปลาซาร์ดีน (*Sardinella melanosticta*) จะมีปริมาณเอนไซม์โปรติเอสในไส้ติ่งมากกว่าในกระเพาะอาหาร (Fujii, 1951 อ้างโดยมาลี อมรทิพย์รัตน์, 2522) แต่โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ภายในระบบทางเดินอาหารจะมีประสิทธิภาพดีกว่าเอนไซม์โปรติเอสในกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะเอนไซม์ในกระเพาะอาหารซึ่งจะเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลและปริมาณอาหารด้วย (Amano, 1962) เอนไซม์ที่ได้จากการสกัดเครื่องในปลาคอด (cod) ประกอบด้วย ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) และอีลาสเทส (elastase) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ย่อยแป้งและย่อยไลเปสในปริมาณต่ำ (Asgeirsson และ Bjarnason, 1988 อ้างโดย Stefansson and Steingrimsdottir, 1989) เปปซิน (pepsin) เป็นเอนไซม์ที่ได้จากน้ำย่อยในกระเพาะปลา และทริปซินเป็นเอนไซม์ที่ได้จากไส้ติ่ง (pyloric caeca) ของปลา (Sulistiyani and Heruwati,1991) เอนไซม์คาเทปซิน (cathepsin) จะทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 4.3 (Seibert and Schmilt, 1965) เอนไซม์ทริปซินจะคงตัวในสภาพกรดมากกว่าด่างแต่ทำงานได้ดีที่สภาวะเป็นด่าง เช่น เอนไซม์ทริปซินจากไส้ติ่งของปลา grouper (*Epinephelus taviana* F.) จะมีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 8 (Sulistiyani and Heruwati,1991) ปลาช่อน (snakehead), snapper, macerel และ mullet จะมีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 8.6, 8.6-8.8, 8.8 และ 8.8 ตามลำดับ (Sukarsa, 1978 อ้างโดย Sulistiyani and Heruwati, 1991) เช่นเดียวกับเอนไซม์จากไส้ติ่งของปลาแอตแลนติกคอด (Atlantic cod) จะมีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 7.5 และคงตัวในสภาวะที่เป็นด่าง (Simpson, *et al.*, 1990)

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์จากเครื่องในปลาคือ 34-45 องศาเซลเซียส (Freeman and Hoogland, 1965 อ้างโดย Beddows, 1985) Gildberg และคณะ (1984) กล่าวว่าความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 5 สามารถยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสจากระบบทางเดินอาหารและจากตับอ่อนได้ (pancreatic enzymes) แต่ Voskresensky (1965) กล่าวว่าในสภาวะที่มีเกลือร้อยละ 15 เอนไซม์ย่อยโปรตีนจากเครื่องในปลายังมี

กิจกรรมอยู่ แต่เอนไซม์จากเนื้อเยื่อคือ คาเทปซินจะถูกยับยั้ง

เอนไซม์ที่พบในการทำน้ำปลาได้แก่ คาเทปซิน A, C และ trypsin like enzyme (Orejana and Liston, 1981 ; Raksakulthai, *et al.*, 1986 อ้างโดย Raksakulthai and Haard, 1992b) น้ำปลาของประเทศเวียดนาม (nuoc-mam) ที่หมักจากปลาที่เอาเครื่องในออกจะใช้ระยะเวลานานกว่าการหมักโดยใช้ปลาทั้งตัว (Van Veen, 1965)

การเติม hepatopancreas tissue จากปลา Atlantic short finned squid (*Illex illecebrosus*) ในการทำน้ำปลาจากปลาหมึก หรือปลาเฮอร์ริ่ง (herring) จะทำให้น้ำปลามีการพัฒนาทางด้านรสชาติ (taste) เพิ่มขึ้น (Lee, *et al.*, 1982)

การเติม squid hepatopancreas ลงไปในการหมักน้ำปลาซึ่งทำจากปลา capelin (*Mallotus villosus*) พบว่าจะไปช่วยเพิ่มอัตราการหมักและผลิตภัณฑ์ที่ได้มีการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูง (Raksakulthai, *et al.*, 1986 อ้างโดย Raksakulthai and Haard, 1992b)

Gildberg และ Xian-Quan (1994) ผลิตน้ำปลาโดยใช้เครื่องในปลาแอตแลนติกคอด (*Gadus morhua*) ที่เอาตับและอวัยวะเพศออก พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินจะสูงมากในระยะแรก แต่จะมีกิจกรรมน้อยกว่าเอนไซม์ไคโมทริปซินในวันที่ 5 ของการหมักส่วนเอนไซม์อีลาสเทสจะมีปริมาณและกิจกรรมน้อยมาก

Yamashita และคณะ (1991) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในการทำน้ำปลา shottsuru เอนไซม์ที่พบส่วนใหญ่จะเป็น aspartic และ serine protease ซึ่งมีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 5.5 และ 9.5 ตามลำดับ เอนไซม์จะมีกิจกรรมสูงสุดในสภาวะที่มีพีเอช 5.5 และมีความเข้มข้นของเกลือต่ำกว่า 1 โมลาร์ แต่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ 5 โมลาร์ซึ่งเป็นสภาวะที่ใกล้เคียงกับการหมักน้ำปลาเอนไซม์จะถูกยับยั้งถึงร้อยละ 92

Thongthai และคณะ (1992) รายงานว่า *Halobacterium salinarium* สายพันธุ์ ORE จะผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่คงตัวในสภาวะที่มีเกลือ (salt-stable extracellular proteases) ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการผลิตน้ำปลา

5. การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยาขณะหมัก

5.1 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

บูดูที่หมักเป็นเวลา 7 วันและมีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 25-27 จะมีเนื้อปลาที่แข็งและเหนียว เนื่องจากในระยะแรกที่ปลาสัมผัสกับเกลือของเหลวที่มีอยู่ในตัวปลาประมาณร้อยละ 80 จะค่อยๆซึมออกมาข้างนอก ขณะเดียวกันเกลือจะซึมเข้าไปในตัวปลาทำให้ปลามีลักษณะเหมือนปลาดองน้ำเกลือซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการออสโมซิส ทำให้เนื้อปลามีลักษณะหดตัว แข็งและมีความเค็มจัด สีของปลาซีดลง มีกลิ่นคาวปลามาก น้ำหมักปลาจะมีสีเหลือง และมีไขมันปลาสีเหลืองเข้มลอยที่บริเวณผิวน้ำ (ดนัย ลิมปดนัย, 2511)

บูดูที่หมักนาน 15-60 วันจะมีลักษณะคือ เนื้อปลานิ่มลงแต่ยังเป็นตัวปลาอยู่ ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์จากปลาและแบคทีเรียร่วมกันย่อยสลายให้เนื้อปลานิ่มลง (Saisithi, *et al.*, 1966) สีของเนื้อปลาซีดลง กลิ่นคาวปลาลดลง เมื่อกวน น้ำหมักปลาจะขุ่นกว่าน้ำหมักปลาในระยะแรก ไขมันของปลาเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลและลอยอยู่บนผิวน้ำมากขึ้น (Saisithi, 1967 อ้างโดยพงษ์เทพ เกิดเนตร, 2533)

บูดูที่หมักนาน 3-4 เดือนจะมีลักษณะคือเนื้อปลาเริ่มเปื่อยหลุดออกจากก้างปลากลายเป็นของเหลวข้นสีเทาอมแดง กลิ่นคาวปลาจะหายไป แต่จะมีกลิ่นคล้ายน้ำปลาเกิดขึ้นมาแทน บูดูช่วงนี้สามารถนำมาบริโภคได้ (Cutting, 1962 อ้างโดยพงษ์เทพ เกิดเนตร, 2533)

บูดูที่หมักนาน 8-12 เดือนจัดเป็นบูดูที่มีคุณภาพดี บูดูที่ได้จะมีกลิ่นหอมกว่าบูดูที่หมักนาน 3-4 เดือน เนื้อปลาจะละเอียดเพิ่มขึ้น น้ำหมักปลาจะมีสีน้ำตาลเข้มและใสขึ้น

Beddows และคณะ (1979) รายงานว่าถ้าใช้ปลา 1 กิโลกรัมและหมักเป็นเวลา 140 วันจะได้บูดูปริมาตรสูงสุด 760 มิลลิลิตร

5.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมี

Beddows และคณะ (1979) ได้แบ่งระยะของการหมักบูดูตามระยะเวลาในการย่อยสลายโปรตีนออกเป็น 3 ระยะคือ ในช่วง 25 วันแรกของการหมัก เกลือจะดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อของปลาเนื่องจากกระบวนการออสโมซิส ระยะที่สอง ช่วง 80-120 วันของการ

หมักจะเป็นช่วงการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อปลา ทำให้ได้ของเหลวที่มีปริมาณโปรตีนสูง ซึ่งโดยปกติแล้วเนื้อปลาจะถูกย่อยสลายหมดภายใน 80-120 วัน และระยะที่สาม ระหว่าง 140 -200 วันเป็นช่วงที่ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ละลายได้มีปริมาณเพิ่มขึ้น สำหรับอัตราการเกิดสารประกอบไนโตรเจน การกระจายตัวของสารประกอบไนโตรเจน การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบไนโตรเจนในผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ และคุณสมบัติทางเคมีของบูดูและน้ำปลาแสดงในตารางที่ 1, 2, 3 และ 4

ตารางที่ 1 อัตราการเกิดสารประกอบไนโตรเจนชนิดต่างๆในส่วนของของเหลวระหว่างการหมักบูดู

เวลา (วัน)	ไนโตรเจนทั้งหมด (ก.%)	อะมิโนไนโตรเจน (ก./กก.)	แอมโมเนียไนโตรเจน (ก./กก.)	ไตรเมธิลเอมีน (มก./100ก.)	โปรตีน (%)	โพลีเปปไทด์ไนโตรเจน (กรัม%)
1	1.44	0.040	0.0100	20.0	14.0	0.59
2	1.02	0.040	0.0081	18.0	13.0	0.49
3	1.20	0.047	0.0090	31.0	14.0	0.59
4	1.12	0.049	0.0090	30.0	11.0	0.56
5	1.06	0.050	0.0094	24.0	13.0	0.44
6	1.07	0.051	0.0094	19.0	8.0	0.44
7	1.09	0.053	0.0095	13.0	11.0	0.46
14	1.26	0.065	0.0093	21.0	12.0	0.48
30	1.34	0.075	0.0098	30.0	11.0	0.45
62	1.42	0.085	0.0070	31.0	9.0	0.46
92	1.63	0.101	0.0087	20.0	8.0	0.50
154	1.77	0.117	0.0090	28.0	10.0	0.48

ที่มา : Beddows และคณะ (1979)

ตารางที่ 2 สารไนโตรเจน (ร้อยละ) ที่เกิดในส่วนของของเหลวระหว่างการหมักบูดู

เวลา(วัน)	ไนโตรเจนทั้งหมด (ร้อยละ) ในส่วนของของเหลว			
	อะมิโนไนโตรเจน	ไนโตรเจนที่ระเหยได้	โปรตีนไนโตรเจน	โพลีเปปไทด์ไนโตรเจน
1	36.3	10.5	1.23	52.0
2	40.8	8.9	1.26	49.0
3	39.1	10.1	1.17	49.6
4	44.6	10.7	0.92	43.8
5	47.1	11.1	1.22	41.6
6	47.2	11.3	0.75	40.7
7	47.3	9.9	1.01	41.8
14	51.9	9.1	0.95	36.2
30	56.6	8.9	0.79	33.7
62	60.1	7.1	0.80	32.0
92	62.1	6.6	0.50	30.8
154	66.3	6.6	0.56	26.5

ที่มา : Beddows และคณะ (1979)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบไนโตรเจนของบูดูกับน้ำปลา

ชนิด	ไนโตรเจนทั้งหมด(%)	อะมิโนไนโตรเจน (ก./กก.)	ไนโตรเจนที่ระเหยได้ (ก.%)	ฟอร์มอลไนโตรเจน (ก./กก.%)	โพลีเปปไทด์ไนโตรเจน (ก.%)
บูดู⁽¹⁾	1.77	0.117	0.12	0.185	0.48
บูดู(ห้องปฏิบัติการ)⁽¹⁾	1.98	0.116	0.19	0.151	0.68
น้ำปลาไทย⁽²⁾	1.96	-	0.21	-	-
น้ำปลาเวียดนาม⁽³⁾	1.90	0.105	0.40	0.145	0.45
น้ำปลาเวียดนาม⁽⁴⁾	2.00	0.094	0.48	0.141	0.47
น้ำปลาเวียดนาม⁽⁵⁾	-	0.020-0.100	0.2-0.7	-	-
น้ำปลาเวียดนาม⁽⁶⁾	3.20	-	0.25	0.132	-
น้ำปลาเวียดนาม⁽⁶⁾	2.10	-	0.5	0.108	-
น้ำปลาฟิลิปปินส์⁽⁴⁾	2.02	0.099	0.18	0.118	0.84
น้ำปลาฟิลิปปินส์⁽⁷⁾	1.55	-	0.15	-	-

- : ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

(1) : Beddows และคณะ (1979)

(2) : Saisithi และคณะ (1966)

(3) : Rose (1919a)

(4) : Uyenco และคณะ (1953)

(5) : Truong van Chom (1957)

(6) : Nguyen Nhu Nghi (1960)

(7) : Fujii และคณะ (1980)

ที่มา : Beddows (1985)

ตารางที่ 4 คุณสมบัติทางเคมีของบูดูและน้ำปลา

ชนิด	โปรตีน (%)	อะมิโนไนโตรเจน (ก./กก.)	ด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (ก./100 ก.)	ไตรเมธิลเอมีน (ก./100 ก.)	อัตราการย่อยสลายโปรตีน
บูดูที่เติมเอนไซม์โบรมิเลน (150 วัน)(1)	12.92	10.73	1.5987	0.1707	9.07
บูดูที่เติมเอนไซม์โบรมิเลน (70 วัน)(1)	-	8.33	1.5335	0.1370	7.84
บูดูที่เติมเอนไซม์โปรเนส-อี(150วัน)(1)	11.17	8.08	1.3755	0.1427	7.86
บูดูที่เติมเอนไซม์โปรเนส-อี(90วัน)(1)	-	6.04	1.3257	0.1272	7.08
บูดูที่ไม่เติมเอนไซม์ (150 วัน)(1)	9.78	5.75	1.2666	0.1260	6.27
บูดู(2)	7.02	12.50	-	-	-
บูดู(3)	11.06	11.70	-	0.0280	-
บูดู(3)	13.81	15.10	-	0.0360	-
น้ำปลา(4)	14.13	10.00	-	0.2610	-
น้ำปลา(5)	11.75	11.20	1.0000	0.3000	-
น้ำปลา(6)	6.13	4.67	68.00	0.1300	-

- : ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

(1) พงษ์เทพ เกิดเนตร (2533)

(2) จักรี ทองเรือง และ จงเกษม วณิชสุวรรณ (2532)

(3) Beddows และ Ardeshir (1979)

(4) Sanchez และ Klitsaneephiboon (1983)

(5) Riaz และคณะ (1986)

(6) Hiremath และคณะ (1985)

ที่มา : พงษ์เทพ เกิดเนตร (2533)

มาลี อมรทิพย์รัตน์ (2522) ศึกษาบูดูที่เก็บรวบรวมได้จากแหล่งผลิตและแหล่งตลาดซึ่งมีอายุการหมักตั้งแต่ 7 วันถึง 2 ปี พบว่ามีคุณลักษณะดังนี้คือ มีพีเอชอยู่ในช่วง 5.3-6.6 ปริมาณกรดแลคติกอยู่ในช่วงร้อยละ 0.22-1.29 ปริมาณเกลืออยู่ในช่วงร้อยละ 19.87-27.55 นอกจากนี้ยังได้ทำการหมักบูดูเองในห้องปฏิบัติการโดยใช้ปลากะตักพบว่าในช่วง 1-7 วันแรกของการหมักมีพีเอชเป็น 5.56-5.84 ปริมาณกรดอยู่ในช่วงร้อยละ 0.28-1.00 เมื่อหมักได้ 10-13 วัน ปริมาณกรดจะเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 1.26-1.29 และพีเอชลดลงเป็น 5.48-5.82 และเมื่อหมักได้ 90 วัน พบว่าจะมีปริมาณกรดอยู่ในช่วงร้อยละ 0.98-1.29 และมีพีเอช 5.48-5.62

สมศักดิ์ ไชยจิตต์ และอโนชา ขจัดภัย (2524) วิเคราะห์หาปริมาณสารอาหารในบูดูโดยทำการหมักบูดูจากปลาข้างเหลือง (*Caranx leptolepsis*) กับเกลือแกง แล้วเก็บตัวอย่างทุกๆ 10 วันจนถึง 150 วันของการหมัก พบว่า ความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 67.46-71.32 ปริมาณเถ้าอยู่ในช่วงร้อยละ 19.25-22.92 ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 5.67 เป็นร้อยละ 11.92 ปริมาณไขมันอยู่ในช่วงร้อยละ 0.26-1.33 และปริมาณคาร์โบไฮเดรตอยู่ในช่วงร้อยละ 0-0.82

จักรี ทองเรือง และจงเกษม วณิชสุวรรณ (2532) ศึกษาการแบ่งระดับชั้นของบูดูในท้องตลาดพบว่า บูดูระดับชั้นที่ 1 มีคุณลักษณะทางเคมีดังนี้ พีเอช 4.75-6.80 ปริมาณกรดแลคติกร้อยละ 0.041-0.144 ปริมาณเกลือร้อยละ 17.16-24.08 ปริมาณอะมิโนไนโตรเจน 5.59-24.13 กรัมต่อลิตร และปริมาณโปรตีนร้อยละ 3.000-11.431 สำหรับบูดูระดับชั้นที่ 2 มีคุณลักษณะทางเคมีดังนี้คือ พีเอช 5.85-5.90 ปริมาณกรดแลคติกร้อยละ 0.050-0.097 ปริมาณเกลือร้อยละ 21.33-22.80 ปริมาณอะมิโนไนโตรเจน 8.99-17.34 กรัมต่อลิตร และปริมาณโปรตีนร้อยละ 4.694-9.073

Dougan และ Howard (1975) รายงานว่าน้ำปลาจะมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบถึง 20 กรัมต่อลิตรและจะอยู่ในรูปของกรดอะมิโนถึง 16 กรัม

Thongthai และ Siriwongpairat (1978) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของพีเอช และความเข้มข้นของเกลือในช่วง 1 เดือนแรกของการหมักน้ำปลา พบว่าวันแรกของการหมักน้ำปลาจะมีพีเอชและความเข้มข้นของเกลือเท่ากับร้อยละ 5.5 และร้อยละ 33.1 ตาม

ลำดับ ตลอดการหมักพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก แต่ความเข้มข้นของเกลือจะลดลงร้อยละ 5 หลังจากหมักเป็นเวลา 4 วัน

Fujii และคณะ (1980) รายงานว่าน้ำปลาฟิลิปปินส์มีองค์ประกอบทางเคมีดังนี้คือ พีเอช 5.1 ปริมาณเถ้าร้อยละ 22.5 ปริมาณความชื้นร้อยละ 66.2 ปริมาณเกลือร้อยละ 29.1 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 155 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ปริมาณด่างที่ระเหยได้ 150 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ไตรเมธิลเอมีน 14.9 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และไฮโดรเจนซัลไฟด์ 130 มิลลิกรัม

Fujii และ Sakai (1984a) ศึกษาองค์ประกอบทางด้านเคมีของน้ำปลาญี่ปุ่นพบว่าจะมีพีเอช 6 ปริมาณเกลือร้อยละ 27.5-27.8 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 644-735 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ปริมาณด่างที่ระเหยได้ 74.4-82.0 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ไตรเมธิลเอมีน 8.4-12.4 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ 100 มิลลิลิตร

Itoh และคณะ (1985) รายงานว่าองค์ประกอบทางเคมีของน้ำปลาจากประเทศไทย ญี่ปุ่น และสิงคโปร์ ประกอบด้วยเกลือร้อยละ 26.8-30.7 กรดกลูทามิก (glutamic acid) 486-1179 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด 23-516 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ไตรเมธิลเอมีน 0-7.5 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม พีเอช 4.67-6.69 กรดอินทรีย์ที่พบได้แก่ กรดแลคติก (lactic acid) กรดอะซิติก (acetic acid) กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดโพรไพโอนิก (propionic acid) กรดซิตริก (citric acid) กรดซัคซินิก (succinic acid) กรดบิวทิริก (butyric acid) และกรดไอโซ-วาเลอริก (iso-valeric acid)

Lalitha และคณะ (1994) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในระหว่างการหมักน้ำปลาพบว่า น้ำปลาจะมีพีเอชลดลง แต่มีค่าของของแข็งทั้งหมด (total solid) ไตรเมธิลเอมีนและด่างที่ระเหยได้เพิ่มขึ้น

Gasaluck และคณะ (1996b) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำปลาจากประเทศไทยและญี่ปุ่น พบว่าน้ำปลาจากประเทศไทยจะมีพีเอชอยู่ในช่วง 5.1-5.6 ปริมาณเกลือร้อยละ 23.5-24.7 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1034-1505 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดอยู่ในช่วง 31.0-57.6 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ส่วนน้ำปลาจากประเทศญี่ปุ่นจะมีพีเอชอยู่ในช่วงระหว่าง 4.8-5.7 ปริมาณเกลือ

ร้อยละ 14.7--29.0 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1667-1864 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรและปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดเท่ากับ 56.8-113.6 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

Ijong และ Ohta (1995a) พบว่าน้ำปลาของอินโดนีเซีย มีกรดอะมิโน กรดกลูทามิก (glutamic acid) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) และไอโซลูซีน (Iso-leucine)ในปริมาณสูง

Ijong และ Ohta (1996) ทำการหมักน้ำปลาอินโดนีเซีย จากปลา *Engraulis japonicus* พบว่า จะมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดและกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้นนอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโนได้แก่ กรดกลูทามิก อะลานีน (alanine) ไอโซลูซีน และไลซีน (lysine) ในปริมาณสูง

5.3 การเปลี่ยนแปลงทางจุลชีววิทยา

Sanchez และ Klitsaneephaiboon (1983) ตรวจพบจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Bacillus, Micrococcus* และ *Staphylococcus* ในน้ำปลาของฟิลิปปินส์ ซึ่งทำจากปลา *Stolephorus* sp. โดยเฉพาะ *Bacillus* จะพบตลอดการหมักน้ำปลา

สายพิณ ไชยนันทน์ และสิทธิพันธุ์ ไชยนันทน์ (2526) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากโรงงานน้ำปลาที่ทำจากปลาน้ำจืดและปลาทะเล สามารถจำแนกแบคทีเรียได้ 2 สายพันธุ์คือ *Pediococcus halophilus* และ *Bacillus* sp. โดยพบว่า *P. halophilus* เป็นประชากรหลักในตัวอย่างน้ำปลาที่นำมาศึกษา

สมพงษ์ คุ้มภัย (2534) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของชนิดและปริมาณของแบคทีเรียแลคติกในระยะต้นของการหมักน้ำปลา สามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ 4 ชนิดคือ ในช่วงสัปดาห์ที่ 1-4 จะพบ *Streptococcus lactis* ในปริมาณสูง หลังจากนั้นจะตรวจไม่พบอีกเลย แต่จะพบ *Pediococcus halophilus* ขึ้นมามีบทบาทแทนในสัปดาห์ที่ 3 และพบ *Lactobacillus brevis* ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 7-12

Thongthai และ Siriwongpairat (1989 อ้างโดย Charabuddhanond and Thongthai, 1991) กล่าวว่าจะมีจุลินทรีย์หลัก 2 ชนิดในกระบวนการหมักน้ำปลาได้แก่จุลินทรีย์ที่ชอบเกลือและจุลินทรีย์ที่ทนเกลือ สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ชอบเกลือที่พบคือ *Halobacterium salinarium* นอกจากนี้ Lalitha และคณะ (1994) ยังตรวจพบยีสต์ที่

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

ชอบเกลือคือ *Debaryomyces hensenii* ในการหมักน้ำปลาอีกด้วย

Ijong และ Ohta (1995b) ศึกษาจุลินทรีย์ในน้ำปลาอินโดนีเซีย พบว่าตลอดการหมักจะไม่พบ coliform แต่จะพบ staphylococcal ในปริมาณสูงถึง 4.7-5.59 log CFU/ml สายพันธุ์แบคทีเรียที่พบมากที่สุดคือ *Staphylococcus* sp. และ *Lactobacillus* sp.

Ijong และ Ohta (1996) หมักน้ำปลาโดยใช้ปลา *Engraulis japonicus* พบว่าในช่วง 40 วันแรกของการหมักจะตรวจพบ *Micrococcus*, *Streptococcus* และ *Pediococcus* ในปริมาณสูง

Lalitha และคณะ (1994) ตรวจหาจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักน้ำปลาพบว่าแบคทีเรียแกรมลบจะถูกยับยั้งหลังจากการหมัก 2 อาทิตย์ และ *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุด และไม่พบแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการหมัก

สายสมร ลิปตะสิริ (2518 อ้างโดยมาลี อมรทิพย์รัตน์, 2522) ตรวจพบ *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* และกลุ่มของ Coryneform ในการหมักน้ำปลา

Ohhira และคณะ (1990) ตรวจพบแบคทีเรียแลคติกในอาหารหมักประเภท sauce ต่างๆ ของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แบคทีเรียแลคติกที่พบได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteriodes*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Leuconostoc coryniformis* subsp. *coryniformis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium* และ *Staphylococcus galinaum*

Suntinanalerts (1979 อ้างโดยพงษ์เทพ เกิดเนตร, 2533) รายงานว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำปลาไทย ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียพวก *Halobacterium* spp., *Halococcus* spp. และ coryneform นอกจากนี้ยังพบ *Micrococcus* spp. และ *Staphylococcus* spp.

Sangjindavon และ Vinitnantharat (1984) ศึกษาชนิดของแบคทีเรียในระยะต้นของการทำน้ำปลาพบว่า ในช่วง 15-55 วันจะพบแบคทีเรียรูปกลมประกอบด้วย

Pediococcus spp. และ *Micrococcus* spp. เป็นส่วนมาก และในช่วง 50-120 วัน แบคทีเรียที่พบส่วนมากจะเป็นแบคทีเรียรูปท่อนคือ *Bacillus* spp.

Itoh และคณะ (1985) ตรวจพบแบคทีเรียชอบเกลือและสร้างกรดพวก *Pediococcus halophilus*, *Staphylococcus saprophyticus* และ *Micrococcus varians* ในตัวอย่างน้ำปลาจากประเทศไทยและญี่ปุ่นส่วน *Parococcus halodenitrificans* พบเฉพาะในตัวอย่างน้ำปลาจากประเทศไทยเท่านั้น

Mabesa และคณะ (1986) รายงานว่าพบแบคทีเรียที่ทนเกลือปานกลาง พวก *Bacillus* และ *Staphylococcus* ในน้ำปลาที่เสียแล้ว

Fujii และ Sakai (1984a,b) ศึกษาชนิดแบคทีเรียในน้ำปลา (shotturu) ที่ดีและเสีย โดยใช้อาหารที่เติมเกลือแกง 2 ระดับคือ ร้อยละ 2.5 และ 20 ตรวจพบแบคทีเรียพวก *Vibrionaceae* และ *Bacillus* ในน้ำปลาที่ดีและ *Streptococcus* ในน้ำปลาที่เสียเมื่อใช้อาหารที่มีเกลือแกงร้อยละ 2.5 ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเกลือแกงร้อยละ 20 จะตรวจพบ *Halobacterium*, *Bacillus* และแบคทีเรียรูปกลมที่จำแนกชนิดไม่ได้ในน้ำปลาที่ดี และพบ *Halobacterium*, *Micrococcus* และแบคทีเรียรูปกลมที่จำแนกชนิดไม่ได้ในน้ำปลาที่เสีย

Gasaluck และคณะ (1996a,b) ตรวจพบ *Bacillus*, *Staphylococcus* และ *Micrococcus* ในระหว่างการหมักน้ำปลา แต่พบว่าในผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะพบเฉพาะ *Bacillus* เท่านั้น

Saisithi (1987b) รายงานว่าพบ *Pediococcus halophilus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* และ *Micrococcus* ในบูดูและน้ำปลา นอกจากนี้ยังพบ *Halobacterium* ในน้ำปลาอีกด้วย

มาลี อมรทิพย์รัตน์ (2522) ตรวจพบแบคทีเรียแกรมบวกพวก *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Pediococcus halophilus*, *Micrococcus* sp.และ *Sarcina* sp. ประมาณร้อยละ 60 แบคทีเรียรูปท่อนแกรมบวกและสร้างสปอร์พวก *Bacillus. subtilis* และ *B. teterosporus* ประมาณร้อยละ 15 แบคทีเรียแกรมบวกแต่ไม่สร้างสปอร์พวก coryneform ประมาณร้อยละ 10 ส่วนแบคทีเรียรูปท่อนแกรมลบพวก *Proteus* sp. พบ

ปริมาณน้อยมากในการหมักบูดู

Ohhira และคณะ (1990) ตรวจพบในแบคทีเรียแลคติกพวก *Lactobacillus plantarum* และ *Streptococcus faecalis* ในบูดู

6. การเกิดสี กลิ่น และรส

6.1 การเกิดสีของบูดู

การเกิดสีน้ำตาลในผลิตภัณฑ์ปลาหมักนั้นเกิดขึ้นได้ 2 วิธี ได้แก่ ปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลกับสารประกอบอะมิโน และปฏิกิริยาระหว่างไขมันกับสารประกอบอะมิโนซึ่งจะเปลี่ยนสีของของเหลวจากเหลืองหรือน้ำตาลอ่อนเป็นน้ำตาลเข้ม ซึ่งความเข้มของสีจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับอุณหภูมิและปริมาณออกซิเจนที่เพิ่มขึ้น แต่แสงจะไม่มีผลทำให้สีเข้มขึ้น (สิทธิพันธุ์ ไชยนันทน์, 2522)

ประเสริฐ สายสิทธิ์ (2511) กล่าวว่าน้ำตาลเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล และพบเสมอในขณะที่ปลาตายใหม่ๆคือ น้ำตาลไรโบสและไรโบฟอสเฟต (ribophosphate) ซึ่งจะได้จากการย่อยสลายของกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid) จากการศึกษาการเกิดสีน้ำตาลโดยปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลไรโบสกับกรดอะมิโนแบบจำลองพบว่า ความเข้มของสีน้ำตาลเป็นปฏิภาคโดยตรงกับสารประกอบอนินทรีย์ฟอสเฟตและทอรีน (taurine) ความเข้มของสีน้ำตาลมีความสัมพันธ์กับโครงสร้างของอนุภาคของกรดอะมิโน และเกลือโซเดียมคลอไรด์ทำปฏิกิริยาผกผันกับความเข้มของสีน้ำตาล ถ้าปริมาณเกลือสูงจะทำให้ความเข้มของสีน้ำตาลน้อยลง

สำหรับฟอสโฟลิปิด (phospholipid) และลิโปโปรตีน (lipoprotein) เมื่อมีน้ำตาลและออกซิเจนอยู่จะเกิดปฏิกิริยาระหว่างกลุ่มอะมิโนกับอัลดีไฮด์ทำให้เกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลขึ้นได้ (Reynolds, 1965) ส่วนไขมันที่ถูกออกซิไดซ์แล้วจะเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลอย่างรวดเร็วเมื่อทำปฏิกิริยากับเอมีน (amine) (Olcott, 1962)

6.2 การเกิดกลิ่นรสของบูดู

กลิ่นรส เป็นองค์ประกอบที่สำคัญต่อการยอมรับของผู้บริโภคผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (Beddows, 1985) กรดไขมันน่าจะมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติของน้ำปลา เพราะว่าน้ำปลาที่มีคุณภาพดีนั้นต้องทำมาจากปลาที่มีไขมันสูง (Stansby, 1990) ไขมันในตัวปลาจะประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์เป็นส่วนใหญ่และจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ไลเปสจากตัวปลาและจุลินทรีย์ เมื่อไขมันถูกย่อยสลายจะทำให้เกิดกรดไขมันชนิดที่ระเหยได้และระเหยไม่ได้ รวมทั้งคีโตนและอัลดีไฮด์ นอกจากนี้กรดไขมันที่ระเหยได้ยังเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของอากาศและไขมัน แต่เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสทำงานได้ดีกว่าเอนไซม์ไลเปสดังนั้นกลิ่นและรสต่างๆที่เกิดขึ้นจากการย่อยโปรตีนจึงเด่นกว่ากลิ่นรสที่ได้จากการย่อยไขมัน (ประเสริฐ สายสิทธิ์, 2514 ; Dougan and Howard, 1975) ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ในบูดูและน้ำปลาแสดงในตารางที่ 5

การเกิดกลิ่นรสในน้ำปลามีความสัมพันธ์กับแบคทีเรีย (Amano,1962 ; Saisithi, *et al.*,1966 ; Beddows, *et al.*,1976 ; Steinkraus, *et al.*, 1983 อ้างโดย Adnan and Owens, 1984) โดยเฉพาะแบคทีเรียที่ชอบเกลือ (Van Veen, 1965 ; Saisithi, *et al.*, 1966) Kasemsarn (1963 อ้างโดย Raksakulthai and Haard, 1992a) กล่าวว่ากลิ่นรสของน้ำปลาน่าจะเกิดจากการที่จุลินทรีย์ไปย่อยโปรตีน

อำนวย โชติญาณวงษ์ (2524) กล่าวว่า แบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดกลิ่นรสในน้ำปลามี 3 พวกคือ พวกแรกจะสร้างกลิ่นหอมคล้ายกุหลาบ แบคทีเรียพวกนี้มีลักษณะเป็นท่อน แกรมบวก พวกที่สองสร้างกลิ่นคล้ายกลิ่นเนื้อ รูปร่างท่อน แกรมลบเคลื่อนที่ไม่ได้ และพวกที่สาม สร้างกลิ่นที่เป็นกรดใกล้เคียงกับกลิ่นน้ำปลา รูปร่างกลมอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม

นอกจากนี้กลิ่นรสของน้ำปลายังเกิดจากกรดอะมิโนอิสระ เปปไทด์ (Raksakulthai and Haard, 1992a ; Kasermsarn, 1963 อ้างโดย Raksakulthai and Haard, 1992a ; Shahidi and Botta, 1994) นิวคลีโอไทด์ (nucleotides) และปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้ (Saisithi, *et al.*, 1966) รสชาติของน้ำปลาจะเกิดจากกรดอะมิโนหลายชนิด ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้จะมีรสเฉพาะตัว ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในน้ำปลาชนิดต่างๆ แสดง

ตารางที่ 5 ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ในบูดูและน้ำปลา

ชนิด	น้ำปลา(ไทย(1))	น้ำปลาเวียดนาม(2)	บูดู(3)	บูดูที่ได้จากห้องปฏิบัติการ(3)
	(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)			
กรดอะซิติก (acetic acid)	0.25-1.40	0.70-1.40	2.10	0.21
กรดโพรไพโอนิก (propionic acid)	0.05-0.67	-	0.12	0.11
กรดไอโซบิวทิริก (Iso-butyric)	0.06-0.12	-	0	0.015
กรดบิวทิริก (n-butyric acid)	0.06-0.42	0.35-0.70	0.23	0.03
กรดไอโซวาเลอริก (Iso-valeric acid)	0.03-0.31	-	0.07	0.11

-: ไม่ได้วิเคราะห์

(1) : Dougan และHoward (1975)

(2) : Fujii และSakai (1984)

(3) : Beddows และคณะ (1979)

ที่มา : Beddows และคณะ (1979)

ในตารางที่ 6 กรดอะมิโนที่พบเกือบทุกระยะของการหมักคือ ไลซีน กรดแอสปาร์ทิก (aspartic acid) กรดกลูทามิก ไกลซีน (glycine) ฮีสติดีน (histidine) ลูซีน (leucine) หรือ ไอโซ-ลูซีน และฟีนิลอะลานีน (ประเสริฐ สายสิทธิ์, 2511 ; อรพิน ภูมิภมร, 2526) เช่นเดียวกับ Chayovan และคณะ (1983) พบว่าสารที่ทำให้เกิดรสชาติในน้ำปลาคือ กรดอะมิโนอิสระ Ijong และ Ohta (1995b) พบว่าน้ำปลาอินโดนีเซีย มีกรดอะมิโนได้แก่ กรดกลูทามิก ฟีนิลอะลานีน และไอโซลูซีนในปริมาณสูง Ijong และ Ohta (1996) ทำการหมักน้ำปลาอินโดนีเซียจากปลา *Engraulis japonicus* พบว่ามีกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้น นอกจากนี้

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบองค์ประกอบของกรดอะมิโนในน้ำปลาชนิดต่างๆ(มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)

ชนิด	น้ำปลาไทย[1]	น้ำปลาฟิลิปปินส์[2]	บูดู[1]	น้ำปลาฟิลิปปินส์จากปลา *Stolephorous*[3]		น้ำปลาฟิลลิปปินส์ที่ทำจากปลาหลายชนิด[3]	
กรดอะมิโน				9 เดือน	12 เดือน	9 เดือน	12 เดือน
กรดแอสพาร์ทิก	276	672	110	93	490	221	364
ทรีโอนีน	161	401	70	256	612	242	374
เซรีน	74	292	16	57	431	142	192
กรดกลูทามิก	582	1097	178	555	960	458	694
โพรลีน	688	244	26	0	0	0	0
ไกลซีน	110	351	44	156	322	126	228
อะลานีน	284	456	152	301	625	268	412
ซิสตีน	24	17	42	0	0	0	0
วาลีน	182	331	100	292	770	335	447
เมทิโอนีน	74	190	48	176	339	144	207
ไอโซลูซีน	182	245	98	264	600	370	412
ลูซีน	202	462	164	478	601	474	470
ไทโรซีน	14	ND	32	25	54	39	42
ฟีนิลอะลานีน	116	148	66	140	365	143	227
ฮิสติดีน	306	425	166	307	976	397	475
ไลซีน	72	665	40	509	1083	450	653
อาร์จินีน	-	335	-	0	431	145	78

ที่มา [1]: Beddows และคณะ (1976) [2]: Sanceda และคณะ(1990) [3]: Sanchez และ Klitsaneephaiboon (1983)

ยังพบว่าน้ำปลามีกรดอะมิโนได้แก่ กรดกลูทามิก อะลานีน ไอโซลูซีน และไลซีน ในปริมาณสูง

เอนไซม์โปรติเอสจะย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโน ซึ่งกรดอะมิโนจะถูกเปลี่ยนเป็นสารที่ทำให้เกิดกลิ่นรส ได้แก่ α-dicarbonyls หรือ conjugated dicarbonyl อื่นๆการย่อยสลายกรดอะมิโนให้เป็นสารที่ให้กลิ่นรสจะเกิดจากปฏิกิริยา decarboxylation และ deamination (Kasemsarn, 1963 อ้างโดยพงษ์เทพ เกิดเนตร, 2533) แต่เอนไซม์ amino acid decarboxylase จะทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด (พีเอช 3-6) ในขณะที่ ปฏิกิริยา deamination จะเกิดได้ดีที่สุดในสภาวะที่เป็นด่าง ดังนั้นในการหมักน้ำปลาจึงเกิดจากปฏิกิริยา deamination มากกว่า decarboxylation

Dougan และ Howard (1975) แบ่งกลิ่นในน้ำปลาออกเป็น 3 กลุ่มคือ พวกแรกให้กลิ่นแอมโมเนียซึ่งได้จากสารประกอบแอมโมเนียและไตรเมธิลเอมีน พวกที่สองให้กลิ่นเนยแข็งซึ่งเกิดจากกรดไขมันที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ กรดไขมันที่ระเหยได้ที่พบในปริมาณสูงได้แก่ กรดอะซิติก และกรดบิวทีริก นอกจากนี้ยังพบกรดโพรไพโอนิก กรดไอโซบิวทีริก และกรดไอโซวาเลอริกอีกด้วย และพวกที่สามให้กลิ่นเนื้อซึ่งเกิดจากสารที่ระเหยได้แต่ยังระบุชนิดไม่ได้แต่เชื่อกันว่าเกิดจากสารประกอบพวกคีโตนและกรดคีโต

Truong-van-Chom (1957 อ้างโดย Dougan and Howard, 1975) รายงานว่า กลิ่นรสของน้ำปลาเกิดจากกรดไขมันที่ระเหยได้พวก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก กรดโพรไพโอนิก และกรดบิวทีริก ต่อมา Saisithi และคณะ (1966) ได้ทำการทดลองแต่พบ กรดไอโซ-บิวทีริกแทนกรดบิวทีริก

Sanceda และคณะ (1984) รายงานว่า กรดฟอร์มิก กรดโพรไพโอนิก กรดไอโซเพนทาโนอิก กรดอะซิติก และกรดบิวทีริกเป็นกลุ่มกรดไขมันที่ระเหยได้ซึ่งมีส่วนช่วยให้เกิดกลิ่นหอมในน้ำปลาฟิลิปปินส์ แต่ Mclver และคณะ (1982) พบว่ากรดอะซิติกเป็นกรดที่พบมากที่สุดในน้ำปลาของไทย

Sanceda และคณะ (1986) ตรวจพบ กรดบิวทีริกร้อยละ 51.3 กรดโพรพิโอนิก ร้อยละ 22.2 กรดไอโซเพนทาโนอิกร้อยละ 17.4 กรดอะซิติกร้อยละ 3.8 และกรดไอโซ-บิวทีริกร้อยละ 3.3 ของกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้งหมด

Sanceda และคณะ (1996) ผลิตน้ำปลาโดยการเติมฮีสทิดีน (histidine) เพื่อเร่งการหมักพบว่าจะมีกรดไขมันที่ระเหยได้พวก กรดอะซิติก กรดบิวทีริก กรดไอโซบิวไทริก และกรดวาลเลอริกในปริมาณสูง

Lee และคณะ (1982) รายงานว่าการเติม hepatopancreas tissue จากปลาหมึก Atlantic short finned squid (*Illex illecebrosus*) ในการทำน้ำปลาจากปลาหมึก หรือปลาเฮอร์ริ่ง (herring) จะทำให้น้ำปลามีการพัฒนาทางด้านรสชาติ (taste) เพิ่มขึ้น

การเติม squid hepatopancreas ในการหมักน้ำปลาซึ่งทำจากปลา capelin (*Mallotus villosus*) พบว่า จะช่วยเร่งอัตราการหมักและผลิตภัณฑ์ที่ได้มีการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูง (Raksakulthai, *et al.*, 1986 อ้างโดย Raksakulthai and Haard, 1992b) เนื่องจากมีกรดอะมิโนอิสระและเปปไทด์ในปริมาณสูง กรดอะมิโนหลักที่ตรวจพบได้แก่ กรดแอสพาร์ทิก เซรีน (serine) กรดกลูทามิก และลูซีน (Raksakulthai and Haard, 1992a)

Chung และ Lee (1976) รายงานว่าองค์ประกอบที่ทำให้เกิดรสชาติในกุ้งหมักคือกรดอะมิโนอิสระได้แก่ ไลซีน โพรลีน อะลานีน ไกลซีน เซรีน กรดกลูทามิก และลูซีน

7. คุณสมบัติทางโภชนาการของบูดู

ดนัย ลิมปดนัย (2511) รายงานคุณค่าทางโภชนาการของบูดู 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย โปรตีน 9.17-11.01 กรัม ปริมาณด่างที่ระเหยได้ 121.87-197.37 มิลลิกรัม ปริมาณกรดที่ระเหยได้ 176.7-191.3 มิลลิกรัมของสารละลายมาตรฐานโซเดียม 0.1 นอร์มอล และมีความเข้มข้นของเกลือในช่วงร้อยละ 18.88-26.84 กองโภชนาการ กรมอนามัย (2530) รายงานว่าบูดู 100 มิลลิลิตรจะประกอบด้วยปริมาณความชื้น 71.1 กรัม ปริมาณไขมัน 0.4 กรัม คาร์โบไฮเดรต 0.5 กรัม ปริมาณโปรตีน 4.6 กรัม แคลเซียม 42 มิลลิกรัม โปแทสเซียม 31 มิลลิกรัม เหล็ก 4.3 มิลลิกรัม วิตามินบีหนึ่งเล็กน้อย วิตามินบีสอง 0.17 มิลลิกรัม และได้พลังงานจากการบริโภค 24 แคลลอรี่ต่อ 100 กรัม

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของเครื่องในปลาต่อการหมักบูดู แยก เทียบเคียงและใช้แบคทีเรียที่แยกได้เป็นกล้าเชื้อในการหมักบูดู

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. ปลาซาร์ดีน (*Sardinella gibbosa*) ขนาดความยาวลำตัวมาตรฐาน 14±1.5 เซนติเมตรและน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวเท่ากับ 26±5 กรัมจากท่าเทียบเรือประมงจังหวัดสงขลาและสตูล
2. เกลือสมุทรเม็ดใหญ่จากตลาดอำเภอหาดใหญ่
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ
    3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS (De, Man Rogosa and Sharpe) บริษัท Difco
    3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ APT (All Purpose Tween) บริษัท Difco
    3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ BHI (Brain Heart Infusion) บริษัท Difco
    3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA (Plate Count Agar) บริษัท Difco
    3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ NA (Nutrient Agar) บริษัท Difco
    3.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar บริษัท Merck
    3.7 อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (Tryptic soy agar) บริษัท OXIOD
    3.8 อาหารเลี้ยงเชื้อ CA (Tsuchida, *et. al.*, 1986)

4. อาหารที่ใช้ในการทดสอบทางชีวเคมี เพื่อการเทียบเคียงจุลินทรีย์
    4.1 อาหารทดสอบการเจริญแบบออกซิเดชันและฟอร์เมนเตชัน
    4.2 อาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส บริษัท Difco
    4.3 อาหารทดสอบความสามารถในการใช้สารคาร์โบไฮเดรตบางชนิด เช่น ซูโครส (Sucrose) ไซโลส (Xylose) ราฟฟิโนส (Raffinose) และเซลลูไบโอส (Cellobiose)

5. สารเคมีเกรดวิเคราะห์(Analytical grade)สำหรับ
    5.1 วิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก
    5.2 วิเคราะห์ปริมาณเกลือ

5.3 วิเคราะห์ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดและปริมาณไตรเมธิลามีน

5.4 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน

5.5 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

5.6 วิเคราะห์ปริมาณไขมัน

5.7 วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

5.8 วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

5.9 วิเคราะห์อัตราการย่อยสลายโปรตีน

5.10 การย้อมแกรม

5.11 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา ประกอบด้วย

1.1 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น A&D บริษัท A&D Co., Ltd

1.2 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น BP 210 S บริษัท Sartorius

1.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-320 บริษัท Tomy Seiko Co., Ltd

1.4 กล้องจุลทรรศน์ยี่ห้อ Olympus Optical Co., Ltd

1.5 เครื่องสเปกโตรโฟโตรมิเตอร์ รุ่น U-2000 บริษัท Hitachi, Ltd

1.6 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น himac SCR 20 B บริษัท Hitachi Koki Co., Ltd ขนาดโรเตอร์ R14A2

1.7 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น 320 บริษัท Denver Instrument

1.8 อุปกรณ์เขี่ยเชื้อ ได้แก่ลูปและเข็มเขี่ย

1.9 ตู้อบอากาศร้อน (Hot air oven) รุ่น 350 บริษัท Memmert

1.10 เครื่องผสม (Vortex mixer) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries, Inc.

1.11 ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ รุ่น 1B-H3 บริษัท K.S.L. Engineering Co., Ltd.

2. อุปกรณ์สำหรับการหมักบูดู ได้แก่ โอ่งดินเผาขนาดกลางความจุประมาณ 40 ลิตร

3. อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี ประกอบด้วย
    3.1 ชุดคอนเวย์ (Conway unit)
    3.2 ชุดเครื่องมือย่อยโปรตีนรุ่น DK6 VELP Scientifica
    3.3 ชุดเครื่องมือกลั่นโปรตีน รุ่น 1002 Kjeltec system
    3.4 ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณไขมัน รุ่น EME6 0250CE Electrothermal
    3,5 ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ค่าน้ำอิสระ (Water activity) รุ่น Thermoconstanter บริษัท NOVASINA
    3.6 ตู้อบอากาศร้อน (Hot air oven) รุ่น 350 บริษัท Memmert
    3.7 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น 350 บริษัท Mettler-Toledo Ltd.
    3.8 เครื่องสเปกโตรโฟโตรมิเตอร์ รุ่น U-2000 บริษัท Hitachi, Ltd
    3.9 เครื่องหมุนเหวี่ยงรุ่น Centrifuge 5415C บริษัท eppendorf
    3.10 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น BP 210 S บริษัท Sartorius
    3.11 เครื่องปั่นผสม (Blender) รุ่น 34 BL 99 (8012) บริษัท WARING
    3.12 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี รุ่น GC-14A บริษัท Shimadzu
    3.13 เครื่อง HPLC รุ่น LC-6A บริษัท Shimadzu

4. เครื่องแก้วสำหรับการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาและทางเคมี

วิธีการ

1.ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลาซาร์ดีน

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีได้แก่ ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl ความชื้น และปริมาณไขมัน (A.O.A.C., 1990) ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดและไตรเมธิลเอมีน ตามวิธีของ Hasegawa (1987) (ภาคผนวก ข) ในปลาซาร์ดีนทั้งตัวและปลาซาร์ดีนที่ไม่มี

เครื่องใน

2. การหมักบูดู

2.1 การเตรียมวัตถุดิบ แบ่งปลาซาร์ดีนเป็นสองส่วน ส่วนละประมาณ 90 กิโลกรัมส่วนแรกนำปลามาผ่าเอาเครื่องในออก ล้างน้ำให้สะอาดวางให้สะเด็ดน้ำ ส่วนที่สองนำปลาทั้งตัวมาล้างน้ำให้สะอาด ทิ้งให้สะเด็ดน้ำ

2.2 การหมัก นำปลาซาร์ดีนผสมกับเกลือในอัตราส่วนปลาต่อเกลือเท่ากับ 3 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก ชุดแรกใช้ปลาซาร์ดีนทั้งตัว 30 กิโลกรัมและเกลือ 10 กิโลกรัม ชุดที่สองใช้ปลาซาร์ดีนที่ไม่มีเครื่องใน 30 กิโลกรัมและเกลือ 10 กิโลกรัม ในการหมักจะแบ่งเกลือไว้ประมาณ 1 ส่วนใน 10 ส่วนของประมาณเกลือทั้งหมดเพื่อกลบผิวหน้า เกลือส่วนที่เหลือนำมาคลุกกับปลาให้กระจายอย่างสม่ำเสมอ บรรจุลงโอ่ง อัดให้แน่น และกลบผิวหน้าด้วยเกลือที่แยกไว้ ใช้ไม้ไผ่ที่ผ่านการลวกขัดปิดผิวหน้า ปิดปากโอ่งด้วยพลาสติกและรัดด้วยเชือกให้แน่น ปิดฝา นำโอ่งไปหมักไว้กลางแจ้ง (พงษ์เทพ เกิดเนตร, 2533) ทำการทดลองหมัก 2 โอ่งต่อ 1 ชุดการทดลอง

2.3 การเก็บตัวอย่าง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ (โดยเทคนิคปลอดเชื้อ) เคมี กายภาพ และกิจกรรมของเอนไซม์ในระหว่างการหมักบูดู ในการสุ่มตัวอย่างจะใช้ทัพพีที่ปลอดเชื้อตักปลาที่บริเวณก้นโอ่ง กลางโอ่ง และผิวหน้าส่วนละ 100 กรัมแล้วจึงนำทุกจุดมาผสมกัน

3. การวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตบูดูจากปลาซาร์ดีนทั้งตัวและปลาซาร์ดีนที่ไม่มีเครื่องใน

3.1 ปริมาณเกลือ น้ำอิสระ พีเอช และปริมาณกรดแลคติก

ตรวจปริมาณเกลือ (A.O.A.C., 1990) ในวันที่ 0 และ 200 ของการหมักและตรวจการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำอิสระโดยเครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ พีเอช โดยใช้พีเอชมิเตอร์ ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก (A.O.A.C., 1990) (ภาคผนวก ข) ในระหว่างการหมักบูดูที่วันที่ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170 และ 200

3.2 ปริมาณเอนไซม์

ตรวจปริมาณเอนไซม์โปรติเอส ดัดแปลงจากวิธีของ Hagiharaและคณะ (1958) และเอนไซม์ไลเปส (Kwon and Khee, 1986) (ภาคผนวก ข) ในบูดูที่หมัก 0, 30, 50, 90, 130, 150 และ 200 วัน

3.3 ตรวจชนิดและจำนวนจุลินทรีย์

สุ่มตัวอย่างบูดูที่หมักนาน 0, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170 และ 200 วันเพื่อตรวจนับจุลินทรีย์ โดยชั่งบูดูหนัก 10 กรัมใส่โถปั่น เติมสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยปั่นที่ระดับความเร็วสูงนาน 2 นาที ทำตัวอย่างบูดูเจือจางเป็น 10 เท่าตามลำดับ ด้วยสารละลายน้ำเกลือร้อยละ 10 นำระดับความเจือจางที่เหมาะสม (คาดว่ามีโคโลนี 30-300 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) มาตรวจหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในอาหารแข็ง PCA ที่เติมเกลือร้อยละ 10 แบคทีเรียที่ผลิตกรดในอาหารแข็ง MRS และ APT ที่เติมเกลือร้อยละ 10 และแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 ด้วยวิธีเขย่าจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน ให้ตรวจนับแบคทีเรียที่สร้างวงใส (clear zone)ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแบคทีเรียที่ผลิตที่ผลิตกรดแลคติก

4. ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพบูดูที่หมักจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องใน

ตรวจหาปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน (A.O.A.C., 1984) ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด ปริมาณไตรเมธิลเอมีน (Hasegawa, 1987) การย่อยสลายโปรตีน (Beddows, *et al.*, 1976) และปริมาณและชนิดของกรดอะมิโน (ภาคผนวก ข) ในระหว่างการหมักบูดูที่วันที่ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170 และ 200

ตรวจหาปริมาณของแข็งที่ละลายได้และละลายไม่ได้ทั้งหมดตามวิธีการของ Beddows และคณะ(1976) (ภาคผนวก ข) ในบูดูที่หมัก 0, 30, 50, 90, 130, 150 และ 200 วัน

5. การวิเคราะห์ค่าทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์บูดู

ในบูดูที่หมักครบ 200 วัน ตรวจปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl (A.O.A.C., 1990) ตรวจชนิดของกรดอะมิโนโดยใช้เครื่อง HPLC และชนิดของกรดไขมันโดยใช้เครื่องแก๊สโตรมาโตกราฟ

6. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักบูดู

สุ่มโคโลนีที่สร้างวงใส (clear zone) จากจานเลี้ยงเชื้ออาหาร MRS และ APT ที่เวลา 0, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170 และ 200 วันของการหมัก ในการสุ่มจะเลือกโดยแบ่งจานเลี้ยงเชื้อเป็น 4 ส่วน สุ่มแบคทีเรียมาส่วนละ 2 โคโลนี ทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสในอาหาร NA ที่มี casein (บริษัท Sigma(G8654)) ร้อยละ 2 และ อาหาร Tributyrin agar ตามลำดับโดยที่อาหารที่ใช้ทดสอบจะเติมเกลือร้อยละ 10 และไม่เติมเกลือ แล้วคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างวงใสในอาหารทั้ง 4 ชนิดได้กว้างที่สุดจำนวน 8 เชื้อเพื่อใช้ทดสอบต่อไปในข้อ 7 สำหรับการทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส นอกจากจะทดสอบในอาหารแข็งแล้วได้ทำการทดสอบกิจกรรมจำเพาะในอาหารเหลว CA ด้วย

7. ศึกษาผลของการเติมกล้าเชื้อจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ต่อการหมักบูดู

7.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

ถ่ายเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 6 จำนวน 8 เชื้อจากหลอดอาหารแข็ง BHI ที่มีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 10 ลงในอาหารเหลว BHI ที่มีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 10 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 5 มิลลิลิตรลงในอาหารเดียวกันปริมาตร 100 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 2 ฟลาสก์ บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์แบคทีเรียที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อโดยการปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายน้ำเกลือร้อยละ 10 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร 1 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายน้ำเกลือร้อยละ 10 ปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงในตะกอนเซลล์ทั้งหมด ผสมให้เซลล์

กระจายในสารละลาย แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ก่อนนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อ

การปรับปริมาณเซลล์ทำโดย วัดความเข้มข้นของเซลล์ให้เท่ากันทุกชุดการทดลอง โดยเจือจางเซลล์ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.35-0.40 ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3}

7.2 การใช้กล้าเชื้อในอาหารหมัก

เติมกล้าเชื้อ 5 มิลลิลิตร ลงในบูดูที่บรรจุในโอ่งขนาด 2 ลิตร ซึ่งหมักมานาน 50 วัน (ใช้ปลาซาร์ดีนทั้งตัวผสมกับเกลือในอัตราส่วน 3:1 โดยน้ำหนัก โดยใช้ปลา 900 กรัมและเกลือสมุทรเม็ดใหญ่ 300 กรัมและหมักตามวิธีการที่ 2 หน้า32) คลุกเคล้ากล้าเชื้อให้ผสมกับบูดูแล้วหมักอีก 30 วัน ทำการทดลอง 3 ชุดต่อกล้าเชื้อ 1 ชนิดและในชุดควบคุมใช้สารละลายน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 10 แทนกล้าเชื้อ สุ่มตัวอย่างหลังหมักนาน 0, 10, 20 และ 30 วันเพื่อวิเคราะห์ ปริมาณเอนไซม์โปรติเอส (Hagihara,*et. al.*,1958) และอัตราการย่อยสลายโปรตีน (Beddows , *et. al.,* 1976) (*ภาคผนวก ข*) และเมื่อหมักครบ 30 วันจึงทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยมีผู้ร่วมทดสอบจำนวน 18 คน ใช้การทดสอบวิธีพรรณนาเชิงปริมาณ (Quantitative Descriptive Analysis:QDA) (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2535) เพื่อคัดเลือกชุดการทดลองที่สร้างกลิ่นบูดูที่ได้รับการยอมรับมากที่สุด 5 อันดับแรก

8. การเทียบเคียงแบคทีเรียที่ผลิตกลิ่นบูดูได้ดีที่สุด 5 อันดับแรก

ทำการเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตกลิ่นบูดูได้ดีที่สุด 5 อันดับแรก ทางกายภาพและทางชีวเคมี ตามแผนภูมิซึ่งดัดแปลงจาก Koneman และคณะ(1988) และ Balowsและคณะ (1992) (*ภาคผนวก จ*)

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ : ปลาซาร์ดีน

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของปลาซาร์ดีนทั้งตัว และปลาซาร์ดีนที่ไม่มีเครื่องในซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักบูดู ดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่าปลาซาร์ดีนทั้งตัว และปลาซาร์ดีนที่ไม่มีเครื่องใน มีความชื้นร้อยละ 74.82 และ 76.20 ตามลำดับ ปริมาณไขมันร้อยละ 9.12 และ 2.25 เทียบต่อน้ำหนักแห้งตามลำดับ และปริมาณโปรตีนร้อยละ 21.29 และ 25.17 ตามลำดับ โดยค่าที่วิเคราะห์ได้ใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ของ Clucas (1981 อ้างโดยอังคณา พูลดำ, 2533) ซึ่งพบว่า ปลาซาร์ดีนที่อาศัยบริเวณเขตร้อน, *Sardinella longiceps* มีปริมาณความชื้นร้อยละ 75.3-76.0 และปริมาณไขมันร้อยละ 7.8-18.9 เทียบต่อน้ำหนักแห้ง

ตารางที่ 7 องค์ประกอบทางเคมีของปลาซาร์ดีน

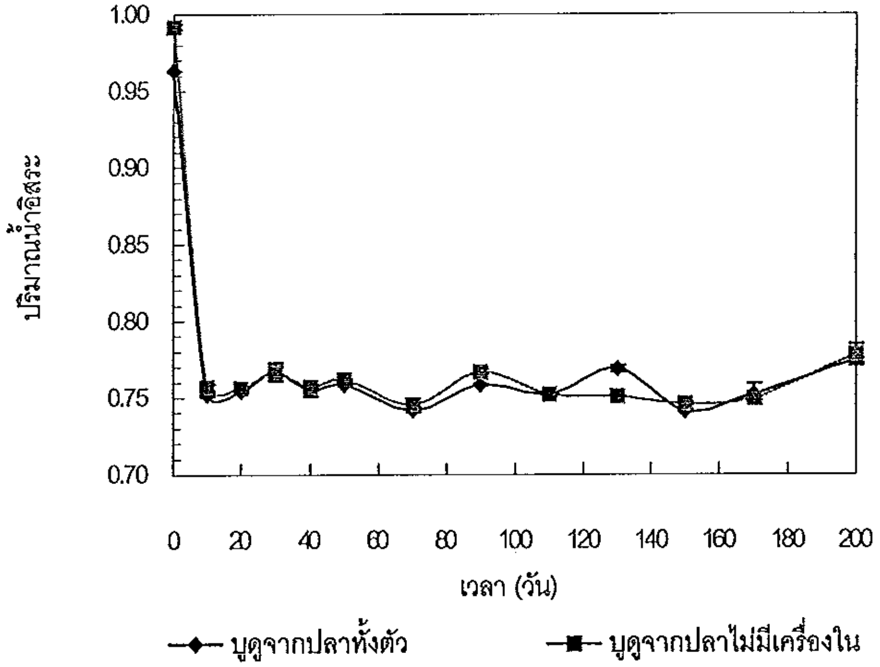
องค์ประกอบทางเคมี	ปลาซาร์ดีนทั้งตัว	ปลาซาร์ดีนไม่มีเครื่องใน
โปรตีน (ร้อยละคิดเทียบต่อน้ำหนักเปียก)	21.29	25.17
ความชื้น (ร้อยละ)	74.82	76.20
ไขมัน (ร้อยละ คิดเทียบต่อน้ำหนักแห้ง)	9.12	2.25
ด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (มก./100 ก.)	14.18	17.33
ไตรเมธิลเอมีน (มก./100 ก)	6.62	8.04

Hasegawa (1987) รายงานว่าปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดสามารถใช้เป็นดัชนีบอกความสดของปลาได้ โดยปลาที่มีปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดต่ำกว่า 20 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ถือว่ามีความสดมาก แต่ถ้าเกินกว่า 30 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมจะเริ่มไม่สด และถ้ามีปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดถึง 40 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม จัดเป็นคุณภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการบริโภค จากการวิเคราะห์พบว่าปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดของปลาซาร์ดีนทั้งตัวเท่ากับ 14.18 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และปลาซาร์ดีนที่ไม่มีเครื่องในเท่ากับ 17.33 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม นอกจากปริมาณด่างที่ระเหยได้บ่งชี้ความสดของปลาแล้ว ปริมาณไตรเมธิลเอมีนก็เป็นดัชนีบอกความสดของปลาเช่นกัน แต่ปริมาณของสารที่จะใช้เป็นดัชนีบอกความสดจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปลา Martin และคณะ (1982) พบว่าในปลาสดที่เพิ่งจับใหม่ๆ จะมีปริมาณไตรเมธิลเอมีนน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งนักวิทยาศาสตร์บางท่านกล่าวว่า ปลาที่มีปริมาณไตรเมธิลเอมีน 0.4-2.0 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม จัดเป็นปลาที่ไม่สด และถ้ามีปริมาณไตรเมธิลเอมีนเท่ากับ 4.0-10.0 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมแสดงว่าปลาเน่าแล้ว แต่บางรายงานกล่าวว่าปลาที่มีไตรเมธิลเอมีนน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมจัดเป็นปลาที่สด (วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร, 2529) จากการทดลองพบว่าปริมาณไตรเมธิลเอมีนของปลาซาร์ดีนทั้งตัวและปลาซาร์ดีนที่ไม่มีเครื่องในเท่ากับ 6.62 และ 8.04 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตามลำดับ จากการทดลองของ Tokunaka (1970 อ้างโดย Martin, *et al.*, 1982) พบว่าปลาซาร์ดีนญี่ปุ่น (Japanese sardine) จะมีปริมาณไตรเมธิลเอมีนโดยเฉลี่ยเท่ากับ 14.29 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ในขณะที่ปลาจาระเม็ดและปลาเก๋าซึ่งมีปริมาณไตรเมธิลเอมีน 2-3 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมก็จะเริ่มมีกลิ่นคาวจัด ดังนั้นจากคุณสมบัติทางเคมีดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าปลาซาร์ดีนซึ่งเป็นวัตถุดิบที่นำมาทดลองครั้งนี้มีความสด

2. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตบูดูจากปลาซาร์ดีนทั้งตัวและปลาที่ไม่มีเครื่องใน

2.1 น้ำอิสระ (Water activity; Aw)

ปริมาณน้ำอิสระของบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในหลังจากผสมปลากับเกลือ (วันแรกของการหมัก) มีค่าเท่ากับ 0.963 และ 0.992 ตามลำดับ (ภาพที่ 1) โดยมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองของ Frazier และ Westhoff (1988) ซึ่งพบว่าเนื้อปลาสด โดยทั่วไปจะมีปริมาณน้ำอิสระอยู่ในช่วง 0.98 หรือมากกว่า 0.98 สาเหตุที่วันแรกของการหมักมีปริมาณน้ำอิสระสูงเนื่องจาก เกลือที่เติมลงไปยังไม่ได้ซึมเข้าไปในตัวปลา จากนั้นในวันที่ 10 ของการหมักปริมาณน้ำอิสระจะลดลงอย่างรวดเร็วมีค่าเท่ากับ 0.752 ในบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและ 0.757 ในบูดูที่ทำจากปลาไม่มีเครื่องใน จากนั้นปริมาณน้ำอิสระในช่วง 10-200 วันของการทดลองหมักบูดูจากปลาทั้งตัวมีค่าอยู่ในช่วง 5.81-6.27 และบูดูที่หมักจากปลาไม่มีเครื่องในมีปริมาณน้ำอิสระอยู่ในช่วง 6.10-6.65 จากผลการวิเคราะห์



ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของน้ำอิสระในระหว่างการหมักบูดูจากปลาซาร์ดีนทั้งตัวและปลาที่ไม่มีเครื่องใน

ความเข้มข้นของเกลือในบูดู พบว่าในวันแรกของการหมักจะเท่ากับร้อยละ 10.97 ในบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและร้อยละ 11.23 ในบูดูที่ทำจากปลาไม่มีเครื่องในและวันสุดท้ายของการหมักจะมีค่าเท่ากับร้อยละ 20.62 และร้อยละ 21.59 ตามลำดับให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Troller และ Christian (1978) รายงานว่าผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 0-8, 8-14 และ 19-จุดอิ่มตัว จะมีปริมาณน้ำอิสระประมาณ 1-0.95, 0.95-0.90 และ 0.80-0.70 ตามลำดับ

นอกจากนี้ปริมาณน้ำอิสระมีผลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ โดย Beddows และ Ardeshir (1979) รายงานว่า จุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่เป็นพิษส่วนมากจะถูกยับยั้งเมื่อมีปริมาณน้ำอิสระต่ำกว่า 0.91 หรือมีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 13 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เช่น *Clostridium botulinum* จะถูกยับยั้งเมื่อมีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 10 แต่ *Staphylococcus aureus* จะถูกยับยั้งเมื่อมีปริมาณน้ำอิสระเท่ากับ 0.86 (Weiser,*et al.*, 1976) ดังนั้นจากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อปริมาณน้ำอิสระ โดยเมื่อมีความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นจะทำให้มีปริมาณน้ำอิสระต่ำลง และเมื่อยิ่งมีปริมาณน้ำอิสระต่ำลงก็จะทำให้อาหารหมักมีความปลอดภัยสูงขึ้น

2.2 ปริมาณเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส

ในวันแรกของการหมักปริมาณเอนไซม์โปรติเอสในบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในมีค่าเท่ากับ 17.04 และ 6.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และมีปริมาณเอนไซม์ไลเปสในบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในเท่ากับ 0.0322 และ 0.0065 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 8) จากปริมาณเริ่มต้นของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดสามารถบ่งชี้ได้ว่าเครื่องในปลาเป็นแหล่งของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสมากกว่าในตัวปลา สอดคล้องกับการทดลองของ Amano (1962), Alm (1965) และ Voskresensky (1965) จากนั้นในวันที่ 30 ของการหมักปริมาณเอนไซม์โปรติเอสของบูดูที่ทำจากปลาไม่มีเครื่องในจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เป็น 10.96 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่ปริมาณเอนไซม์โปรติเอสของบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวค่อนข้างคงที่มีค่าเท่ากับ 16.84 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เอนไซม์ไลเปสของบูดูทั้งสองชนิดก็เพิ่มปริมาณขึ้นมาอย่างรวดเร็วเช่นกัน โดยบูดูที่ทำ

จากปลาไม่มีเครื่องในจะเพิ่มเป็น 0.1540 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวจะเท่ากับ 0.529 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในช่วง 50-200 วันของการหมัก ปริมาณเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 20.72-32.07 และ 0.1885-0.3550 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในบูดูหมักจากปลาทั้งตัว 12.46-21.12 และ 0.0997-0.2319 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในบูดูหมักจากปลาไม่มีเครื่องใน การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของปริมาณเอนไซม์แสดงให้เห็นว่านอกจากเครื่องในปลาที่เป็นแหล่งของเอนไซม์ทั้งสองชนิดแล้ว จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารหมักยังสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิดด้วย ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Thongthai และคณะ (1992) ซึ่งได้แยก *Halobacterium salinarium* สายพันธุ์ ORE จากน้ำปลาและพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ทนเกลือ นอกจากนี้แบคทีเรียที่ตรวจพบในระหว่างการหมักน้ำปลาหรือบูดูได้แก่ *Bacillus* sp. และ *Staphylococcus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ด้วย (Phadatare, *et al.*, 1993)

ตารางที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสในระหว่างการหมักบูดูที่ทำจากปลาซาร์ดีนทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องใน

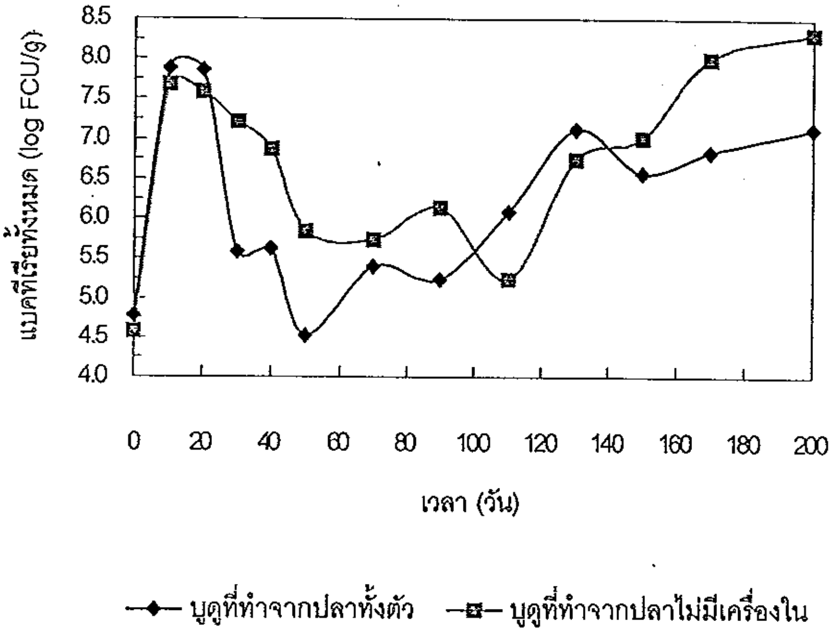
ระยะเวลาในการหมัก (วัน)	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิต/มิลลิลิตร)		กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิต/มิลลิลิตร)	
	บูดูที่ทำจากปลาทั้งตัว	บูดูที่ทำจากปลาไม่มีเครื่องใน	บูดูที่ทำจากปลาทั้งตัว	บูดูที่ทำจากปลาไม่มีเครื่องใน
0	17.04	6.12	0.0322	0.0065
30	16.84	10.96	0.5290	0.1540
50	21.01	12.46	0.3550	0.1475
90	21.12	17.39	0.1885	0.2155
130	24.59	16.92	0.2385	0.0997
150	20.72	17.39	0.2845	0.1213
200	32.07	21.12	0.2960	0.2319

เช่นเดียวกับประเสริฐ สายสิทธิ์ (2514) กล่าวว่าการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลาจะมีความสำคัญในระยะแรกเท่านั้น แต่ในระยะหลังแบคทีเรียจะเข้ามามีบทบาทในการย่อยสลายแทนที่เอนไซม์จากตัวปลา ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้สามารถยืนยันข้อความดังกล่าวได้เมื่อพิจารณาจากปริมาณเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมัก เมื่อหมักบูดูครบ 200 วันปริมาณเอนไซม์โปรติเอสในบูดูที่หมักจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในมีค่าเท่ากับ 32.07 และ 21.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณเอนไซม์ไลเปสในบูดูทั้งสองชนิดจะเป็น 0.2960 และ 0.2319 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยที่ปริมาณเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสในบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวจะสูงกว่าบูดูที่ทำจากปลาไม่มีเครื่องในตลอดระยะเวลาหมัก ดังนั้นจากการทดลองพบว่าเอนไซม์จากตัวปลาโดยเฉพาะจากเครื่องในปลาจะมีบทบาทสำคัญในระยะแรกของการหมักบูดูในขณะที่เอนไซม์จากจุลินทรีย์จะมีบทบาทสำคัญในระยะหลังของการหมัก

2.3 แบคทีเรียทั้งหมด

จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในวันแรกของการหมักบูดูจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในมีค่าเท่ากับ 4.78 log CFU/g และ 4.58 log CFU/g ตามลำดับ (ภาพที่ 2) จากการทดลองของพงษ์เทพ เกิดเนตร (2533) พบว่าในบูดูที่หมักวันแรกจะมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 5.20-7.46 log CFU/g ในขณะที่มาลี อมรทิพย์รัตน์ (2522) รายงานว่าบูดูที่หมักได้ 1 วันจะมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 3.34-3.89 log CFU/g เป็นแบคทีเรียรูปกลมแกรมบวกได้แก่ *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Micrococcus* spp. และ sarcinae bacteria ประมาณร้อยละ 60, แบคทีเรียรูปท่อนแกรมบวกมีสปอร์ได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus leterosporus* ประมาณร้อยละ 15, แบคทีเรียรูปท่อนแกรมบวกไม่สร้างสปอร์พวก coryneform bacteria ร้อยละ 10 และมีแบคทีเรียรูปท่อนแกรมลบพวก *Proteus* spp. ปริมาณน้อย สาเหตุที่การทดลองครั้งนี้พบปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 4.78 log CFU/g และ 4.58 log CFU/g เข้าใจว่ามีสาเหตุจากปลาที่นำมาทดลองผ่านการแช่แข็งมาก่อนซึ่งการแช่เข็งปลาสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและสามารถทำลายแบคทีเรียได้ประมาณร้อยละ 60-90 ของปริมาณเริ่มต้น (วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร, 2529) นอกจากนี้ Lantz และ Gunasekera (1955

อ้างโดย มาลี อมรทิพย์รัตน์, 2522) พบว่าถ้าเอาเครื่องในออกไปจะทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ลดลง สอดคล้องกับสุมาลี เหลืองสกุล (2527) รายงานว่า จำนวนของแบคทีเรียที่อยู่บนตัวปลาทะเลที่จับได้ใหม่ๆ มีตั้งแต่ 100 เซลล์ถึงหลายล้านเซลล์ต่อพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร น้ำจากลำไส้ของปลาจะมีแบคทีเรียจำนวน 10^3-10^8 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ส่วนที่บริเวณเหงือกอาจพบแบคทีเรียตั้งแต่ 10^3- 10^6 เซลล์ต่อกรัม โดยแบคทีเรียที่พบในระยะแรกของการหมัก เป็นแบคทีเรียที่ติดมากับส่วนต่างๆ ของปลา ปริมาณแบคทีเรียนี้จะแตกต่างกันขึ้นกับความสดของปลา ขนาด สภาพแวดล้อมที่ปลาอยู่ตลอดจนการขนส่ง (Stansby, 1962) และอาจติดมากับเกลือที่ใช้ในการหมักด้วย จากนั้นในวันที่ 10 ของการหมักจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 7.89 log CFU/g ในบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและ 7.68 log CFU/g ในบูดูที่ทำจากปลาไม่มีเครื่องใน แบคทีเรียในการทดลองทั้งสองชุดเพิ่มจำนวนขึ้นประมาณ 3 log cycles ของจำนวน



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียทั้งหมดในระหว่างการหมักบูดูจากปลาซาร์ดีนทั้งตัวและปลาที่ไม่มีเครื่องใน

แบคทีเรียเริ่มต้น (ภาพที่ 2) สายพิณ ไชยนันทน์และนิวัฒน์ ฉายโชติเจริญ (2530) กล่าวว่าการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียในช่วงแรก (0-30 วัน) เป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียย่อยโปรตีนพวก coryneform bacteria เนื่องจากในช่วงแรกของการหมักเป็นระยะที่เกลือซึมเข้าไปในเนื้อปลาได้น้อย เช่นเดียวกับมาลี อมรทิพย์รัตน์ (2522) รายงานว่าแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 3-10 ของการหมักโดยมี *Pediococcus halophilus* ร้อยละ 40 *Staphylococcus* spp. ร้อยละ 40 และพบ *Bacillus* spp. และ coryneform bacteria ในปริมาณน้อย ในขณะที่พงษ์เทพ เกิดเนตร (2533) ได้ทดลองหมักบูดูจากปลาซาร์ดีนและปลากะตักทั้งในร่มและกลางแจ้ง พบว่าในวันที่ 10 ของการหมักบูดูจากปลาซาร์ดีนที่หมักกลางแจ้งจะมีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้น แต่บูดูที่หมักโดยวิธีอื่นๆ จะมีจำนวน แบคทีเรียทั้งหมดลดลง จากนั้นจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวจะค่อยๆ ลดจำนวนลงจนต่ำที่สุดในวันที่ 50 ของการหมัก (4.53 log CFU/g) แสดงว่าในระยะนี้เกลือได้ซึมเข้าไปในเนื้อปลาอย่างสมบูรณ์และมีผลทำลายแบคทีเรียไม่ทนหรือไม่ชอบเกลือ จากนั้นในช่วง 50-200 วันจำนวนแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 4.53 – 7.13 log CFU/g และในวันสุดท้ายของการหมัก (200 วัน) มีแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 7.13 log CFU/g ส่วนบูดูที่หมักจากปลาไม่มีเครื่องใน ช่วง 50-200 วันจำนวนแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 5.84-8.33 log CFU/g เมื่อพิจารณารูปแบบของการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียทั้งหมดในบูดูที่หมักจากปลาทั้งตัวและจากปลาที่ไม่มีเครื่องในพบว่ามีความคล้ายกัน แต่การทดลองครั้งนี้ไม่ได้เทียบเคียงแบคทีเรียในแต่ละช่วงของการหมักจึงไม่สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียที่ตรวจพบเป็นชนิดเดียวกันหรือไม่

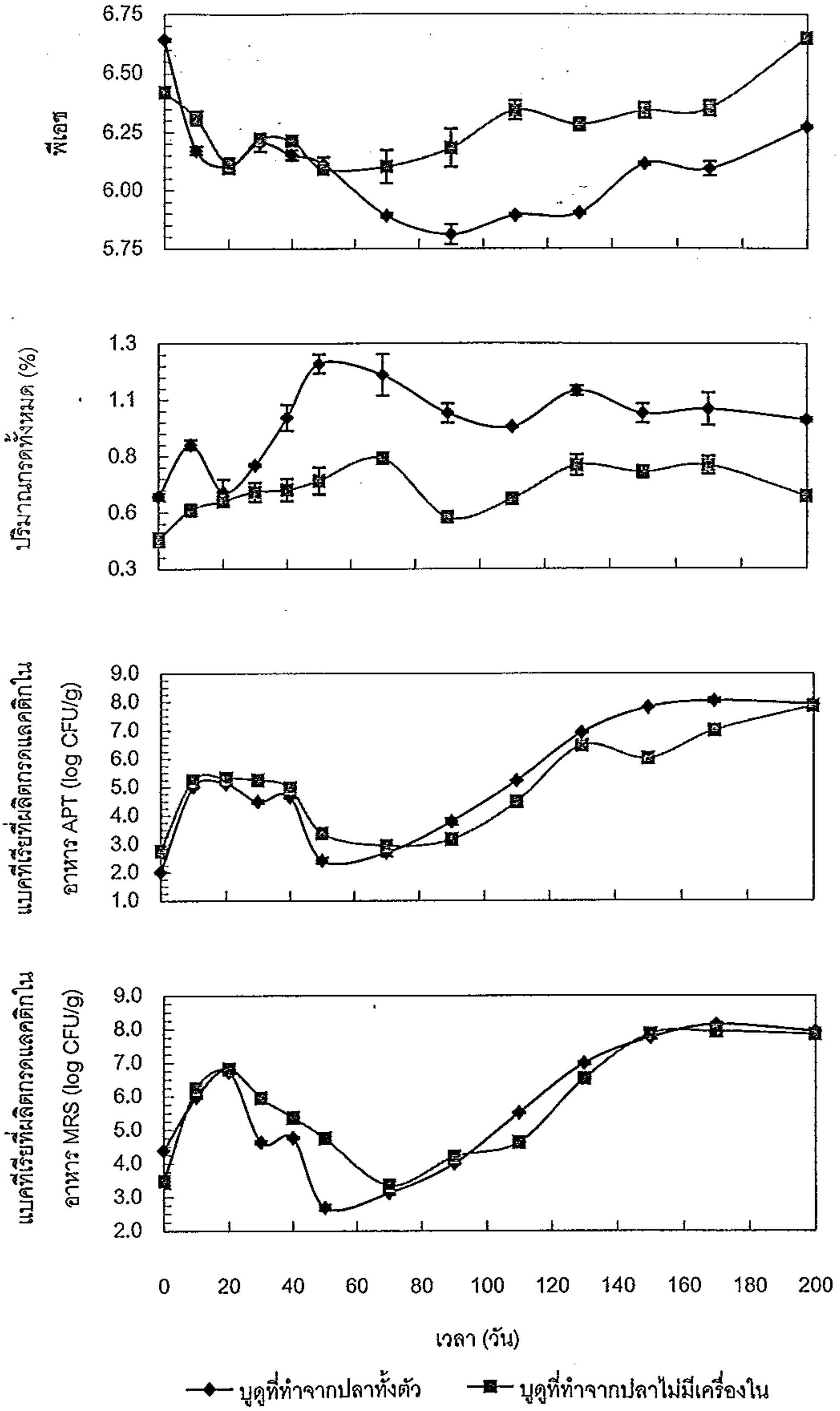
2.4 แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก พีเอช และปริมาณกรดแลคติกในบูดูที่หมักจากปลาซาร์ดีนทั้งตัวและจากปลาที่ไม่มีเครื่องใน

บูดูที่หมักจากปลาทั้งตัวและจากปลาที่ไม่มีเครื่องในมีจำนวนแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกเริ่มต้นในอาหาร MRS เท่ากับ 4.39 และ 3.48 log CFU/g และในอาหาร APT เท่ากับ 2.00 และ 2.76 log CFU/g ตามลำดับ (ภาพที่ 3) ในวันที่ 10 ของการหมักจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 20 ของ

การหมักมีจำนวนแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกเท่ากับ 6.72 และ 6.81 log CFU/g ในอาหาร MRS และเท่ากับ 5.11 และ 5.31 log CFU/g ในอาหาร APT ในบูดูหมักจากปลาทั้งตัวและปลาที่ไม่มีเครื่องในตามลำดับ การเพิ่มขึ้นของจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกในช่วง 10-20 วัน เพราะว่าในช่วงดังกล่าวเกลือยังซึมเข้าไปในเนื้อปลาได้น้อย และการอัดปลาให้แน่นเป็นการจัดสภาพให้มีอากาศน้อย ซึ่งเหมาะแก่การเจริญของแบคทีเรียแลคติก (สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์, 2518 อ้างโดยมาลี อมรทิพย์รัตน์, 2522) จึงทำให้แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกเพิ่มจำนวนสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว

เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกในอาหาร MRS และ APT ในช่วง 10-40 วันพบว่าจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกในอาหาร APT มีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าในอาหาร MRS อาจเนื่องจากว่าจำนวนแบคทีเรียในช่วงดังกล่าวเป็นแบคทีเรียแลคติกพวก heterofermentative เป็นส่วนใหญ่และอาหาร APT เหมาะสำหรับวิเคราะห์แบคทีเรียกลุ่มนี้ ในวันที่ 50 ของการหมักบูดูจากปลาทั้งตัวแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจะลดจำนวนลงเหลือเพียง 2.69 log CFU/g ในอาหาร MRS และ 2.43 log CFU/g ในอาหาร APT ในช่วง 50-150 วันของการหมักจำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกในบูดูจากปลาทั้งตัวจะเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ จนมีปริมาณ 7.75 log CFU/g ในอาหาร MRS และ 7.8 log CFU/g ในอาหาร APT และมีปริมาณค่อนข้างคงที่ในช่วง 150-200 วันของการหมัก ในวันที่ 70 ของการหมักบูดูจากปลาไม่มีเครื่องในแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจะลดจำนวนลงเหลือเพียง 3.35 และ 2.94 log CFU/g ในอาหาร MRS และ APT ตามลำดับ ในช่วง 70-200 วัน จำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจะเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ จนมีปริมาณ 7.85 log CFU/g ในอาหาร MRS ส่วนในอาหาร APT จำนวนแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจะเพิ่มจำนวนขึ้นในช่วง 70-130 วันของการหมักจนมีปริมาณเท่ากับ 6.47 log CFU/g จากนั้นจะเพิ่มจำนวนขึ้นอีกครั้งในช่วง 150-200 วันของการหมัก

ค่าพีเอชในวันแรกของการหมักบูดูจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในเท่ากับ 6.64 และ 6.42 ตามลำดับ และในระหว่างการหมักบูดู (10-200 วัน) ค่าพีเอชจะมีค่าค่อนข้างคงที่อยู่ในช่วง 5.8-6.2 และ 6.10-6.65 ตามลำดับส่วนปริมาณกรดในวันแรกเท่ากับร้อยละ 0.62 และ 0.43 ตามลำดับ จากภาพที่ 3 จะเห็นว่าปริมาณกรดมีการเปลี่ยนแปลง



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของพีเอช ปริมาณกรด และแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกในระหว่างการหมักบูดูจากปลาซาร์ดีนทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องใน

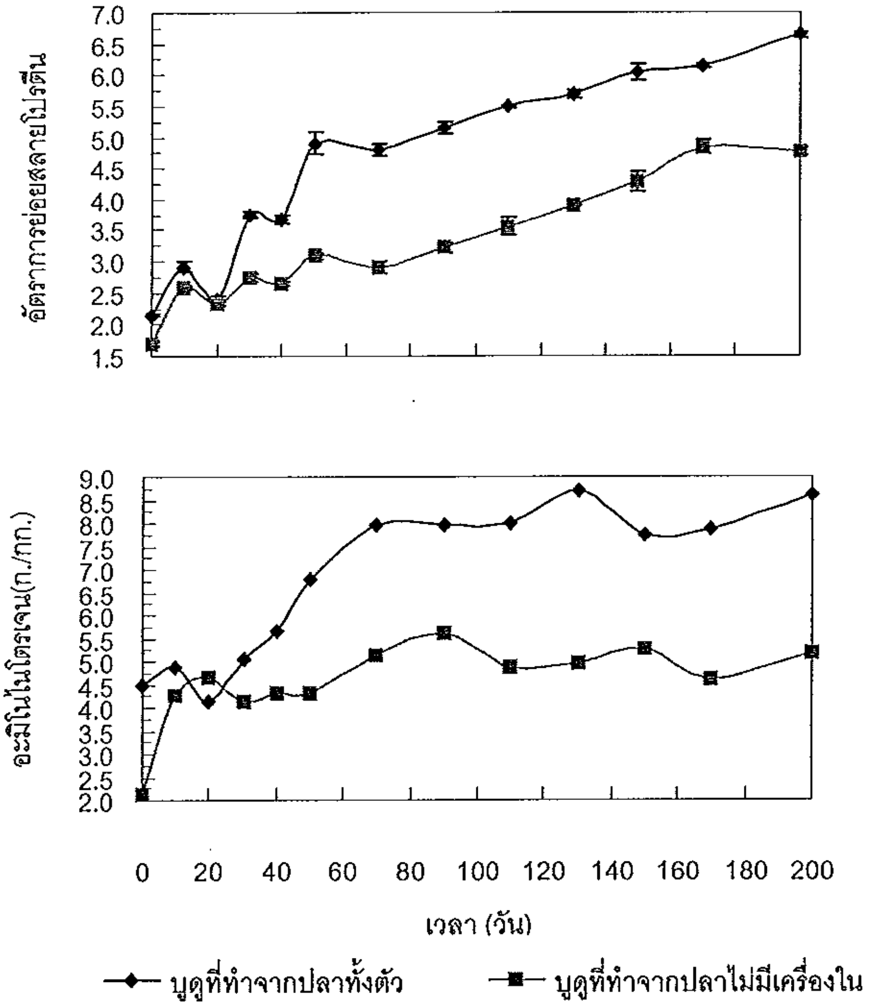
ในช่วงกว้างเมื่อเทียบกับการเปลี่ยนแปลงของพีเอช สาเหตุดังกล่าวเป็นเพราะว่ากรดอะมิโนที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักบูดูจะทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ได้อย่างดี (Jay, 1978) ในวันที่ 10 ของการหมักบูดูจากปลาทั้งตัวจะมีปริมาณกรดเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 0.85 และพีเอชลดลงเป็น 6.17 ส่วนในบูดูที่หมักจากปลาไม่มีเครื่องในมีปริมาณกรดเพิ่มขึ้นเป็น 0.56 และพีเอชเท่ากับ 6.31ซึ่งจะสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของจำนวนแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (ภาพที่ 3) กรดแลคติกที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เกิดจากแบคทีเรียใช้น้ำตาลโดยผ่านกระบวนการไกลโคไลซีสและขบวนการฟอสโฟคีโตเลส ในวันที่ 50 ของการหมักบูดูจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในปริมาณกรดจะเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 1.21 และ 0.69 แต่จำนวนแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่ตรวจพบมีจำนวนลดลง ซึ่งอาจเกิดจากชนิดของแบคทีเรียแลคติกมีการเปลี่ยนแปลงพวกที่ทนต่อกรดได้กำลังเจริญ และผลิตกรดออกมาอย่างช้าๆ ทำให้มีปริมาณกรดเพิ่มขึ้นทำให้แบคทีเรียที่ไม่ทนต่อกรดและเกลือลดจำนวนลง ดังนั้นแบคทีเรียที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการหมักบูดูจึงเป็นแบคทีเรียที่ทนต่อกรดและเกลือได้ดีและอาจเป็นผลมาจากการย่อยสลายโปรตีนได้เป็นกรดอะมิโนซึ่งกรดอะมิโนมีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน ในช่วง 130-200 วันของการหมักจะมีปริมาณกรดค่อนข้างคงที่ แต่จำนวนของแบคทีเรียแลคติกเพิ่มขึ้นซึ่งอาจเกิดจากแบคทีเรียแลคติกพวก heterofermentative เจริญในช่วงนี้ จากการทดลองจะสังเกตได้ว่าบูดูที่ทำจากปลาไม่มีเครื่องในจะมีพีเอชสูงกว่าบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและมีปริมาณกรดต่ำกว่าด้วยทั้งๆที่มีจำนวนของแบคทีเรียใกล้เคียงกัน เข้าใจว่าชนิดแบคทีเรียแลคติกในบูดูหมักแตกต่างกัน นอกจากนี้พีเอชที่สูงกว่ายังเกิดจากบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวมีการเพิ่มขึ้นของสารพวกเอมีนและแอมโมเนียสูงกว่าซึ่งสังเกตได้จากปริมาณอะมิโนไนโตรเจนจึงทำให้มีพีเอชสูงกว่า

3. ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของบูดู

3.1 การย่อยสลายโปรตีน

ภาพที่ 4 แสดงให้เห็นว่าการย่อยสลายจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาหมัก 200 วันและสามารถแบ่งการย่อยสลายได้เป็นสองช่วงคือ ช่วงแรก 0-50 วัน การย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่วนช่วงที่สอง 50-200 วันการเพิ่มขึ้นของการย่อย

สลายจะช้ากว่าช่วงแรก การย่อยสลายโปรตีนในบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวในวันแรกเท่ากับ 2.16 และเพิ่มเป็น 4.91 ในวันที่ 50 ของการหมักและในบูดูที่ทำจากปลาไม่มีเครื่องในเท่ากับ 1.69 และเพิ่มเป็น 3.09 ตามลำดับ ส่วนการย่อยสลายในช่วงวันที่ 200 ของบูดูหมักจากปลาทั้งตัวเท่ากับ 6.64 และจากปลาไม่มีเครื่องในเท่ากับ 4.77 โดยการย่อยสลายในบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวจะสูงกว่าบูดูที่ทำจากปลาไม่มีเครื่องในตลอดการทดลอง เป็นที่ทราบกันดีว่าการสลายพันธะเปปไทด์เกิดจากการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส จากการทดลอง (ตารางที่ 8) พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวในบูดูที่หมักจากปลาทั้งตัวมีค่าสูงกว่าเอนไซม์จากบูดูที่หมักโดยเอาเครื่องในออก ทั้งนี้เนื่องจากเครื่องในปลาเป็นแหล่งของเอนไซม์โปรติเอส และเอนไซม์โปรติเอสจากเครื่องในปลาจะมีประสิทธิภาพดีกว่าเอนไซม์โปรติเอสจากเนื้อเยื่อ (Amano, 1962; Owens and Mendoza, 1985; Greig, 1988; Greig and Estrella, 1988) นอกจากเอนไซม์โปรติเอสจากเครื่องในปลาแล้วยังมีเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักด้วย ซึ่งสอดคล้องกับ Van Veen(1965) ได้รายงานว่าในการหมักน้ำปลาของประเทศเวียดนาม ถ้าใช้ปลาที่เอาเครื่องในออกจะใช้ระยะเวลานานกว่าการหมักโดยใช้ปลาทั้งตัว นอกจากนี้พงษ์เทพ เกิดเนตร (2533) พบว่าการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆเมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้น และบูดูที่เติมเอนไซม์โบรมิเลนและโปรเนสอีจะมีการย่อยสลายสูงกว่าบูดูที่ไม่ได้เติมเอนไซม์ เช่นเดียวกับ Beddows และคณะ (1976) รายงานว่าการเติมเอนไซม์จะทำให้การย่อยสลายสูงขึ้น ในขณะที่ Gildberg และคณะ (1984) พบว่าความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 5 สามารถยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสจากทางเดินอาหารและจากตับอ่อนได้ แต่ Voskresensky (1965) กล่าวว่าในสภาวะที่มีเกลือร้อยละ 15 เอนไซม์ย่อยโปรตีนจากเครื่องในปลายังมีกิจกรรมอยู่ แต่เอนไซม์จากเนื้อเยื่อคือคาเทปซินจะถูกยับยั้ง ดังนั้นจากผลการทดลองจึงควรเลือกใช้ปลาทั้งตัวเป็นวัตถุดิบในการหมักบูดูแบบธรรมชาติเนื่องจากเครื่องในปลาเป็นแหล่งของเอนไซม์โปรติเอสที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเอนไซม์จากเนื้อเยื่อซึ่งจะทำให้ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้นกว่านอกจากนี้เครื่องในปลายังเป็นแหล่งของจุลินทรีย์อีกด้วย ซึ่งจากการทดลองจะพบว่าเอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์เป็นแหล่งของเอนไซม์โปรติเอสที่สำคัญเช่นกัน



ภาพที่ 4 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของการย่อยสลายโปรตีน และปริมาณอะมิโนไนโตรเจนในระหว่างการหมักบูดูจากปลาซาร์ดีน

3.2 อะมิโนไนโตรเจน

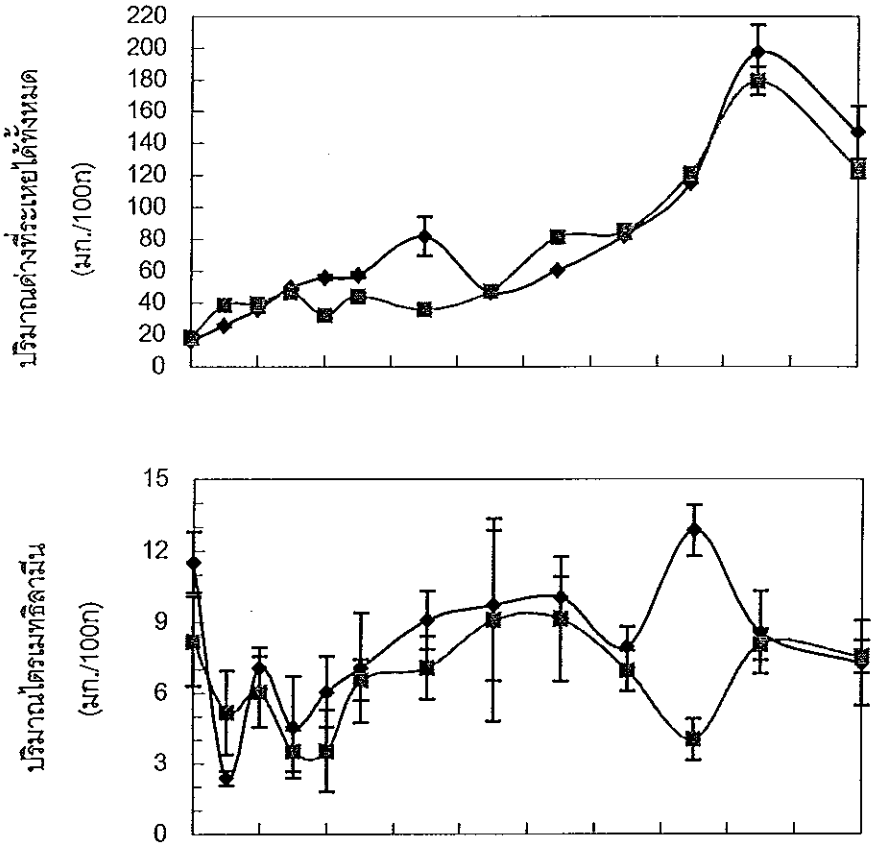
ในวันแรกของการหมักปริมาณอะมิโนไนโตรเจนของบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในเท่ากับ 4.465 และ 2.131 กรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ (ภาพที่ 4) การเปลี่ยนแปลงของปริมาณอะมิโนไนโตรเจนจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆเมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้นเช่นเดียวกับการทดลองของ Ijong และ Ohta (1996) และ Syaefudin และ

คณะ (1991) เมื่อหมักบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในครบ 200 วันจะมีปริมาณอะมิโนไนโตรเจนเท่ากับ 8.63 และ 5.16 กรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับเพิ่มจากเดิม 3.98 และ 3.029 กรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับน้ำปลาฟิลิปปินส์โดยมีปริมาณอะมิโนไนโตรเจน 6-11.2 กรัมต่อลิตร (Sanchez and Klitsaneephaiboon, 1983) จากการทดลองของพงษ์เทพ เกิดเนตร (2533) พบว่าในวันแรกของการหมักบูดูที่ทำจากปลาซาร์ดีนโดยไม่เติมเอนไซม์จะมีปริมาณอะมิโนไนโตรเจนเท่ากับ 1.08 กรัมต่อกิโลกรัม และเมื่อหมักครบ 150 วันจะมีปริมาณอะมิโนไนโตรเจนเท่ากับ 5.75 กรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ Beddows และคณะ (1979) พบว่าบูดูที่หมักนาน 154 วันจะมีปริมาณอะมิโนไนโตรเจน 11.7 กรัมต่อลิตร โดยปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณอะมิโนไนโตรเจนได้แก่ปริมาณเอนไซม์โปรติเอสซึ่งจะมีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนโดยถ้ามีปริมาณเอนไซม์สูงก็จะทำให้ปริมาณอะมิโนไนโตรเจนสูงด้วย (พงษ์เทพ เกิดเนตร, 2533 ; Greig and Estella, 1988 ; Kataoka, *et al.*, 1987 ; Raksakulthai and Haard, 1992b) ปริมาณเกลือก็มีผลเช่นกัน โดยปริมาณเกลือที่สูงจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส (อังคณา พลูดำ, 2533 ; Zung and K' sev, 1993) นอกจากนี้ความสดของวัตถุดิบก็มีผลเช่นกัน โดยพบว่าถ้าวัตถุดิบมีความสดน้อยจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณอะมิโนไนโตรเจนในระหว่างการหมักสูงกว่าวัตถุดิบที่มีความสดมากกว่า (นฤมล แสงทอง, 2533 อ้างโดย อังคณา พลูดำ, 2533 ; อังคณา พลูดำ, 2533)

3.3 ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด

ในวันแรกของการหมักปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดในบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในเท่ากับ 15.89 และ 18.42 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 5) จากนั้นจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้นและจะมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 170 ของการหมัก โดยบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในจะมีค่าเท่ากับ 197.21 และ 179.06 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตามลำดับ จากนั้นปริมาณด่างที่ระเหยได้จะลดลงในวันที่ 200 ของการหมักเหลือเพียง 146.8 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมในบูดูที่ทำจาก

ปลาทั้งตัวและ 124.02 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมในบูดูที่ทำจากปลาไม่มีเครื่องใน สอดคล้องกับการทดลองของ Saisithi และคณะ (1966) ซึ่งได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของน้ำปลาพบว่า ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นสูงสุดเป็น 14.7 มิลลิอิควิวาเลนซ์ต่อ 100 มิลลิลิตร ในเดือนที่ 9 ของการหมัก จากนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 3 มิลลิอิควิวาเลนซ์ต่อ 100 มิลลิลิตร ในเดือนที่ 12 ของการหมัก เช่นเดียวกับพงษ์เทพ เกิดเนตร (2533) รายงานว่าจากการหมักบูดูที่ไม่เติมเอนไซม์, เติมเอนไซม์โบรมิเลน และเอนไซม์โปรเนส-อี นาน 150 วัน จะมีปริมาณด่างที่ระเหยได้เท่ากับ 126.66, 159.88 และ 137.55 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับปริมาณด่างที่ระเหยได้ในน้ำปลาชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำปลาของฟิลิปปินส์เท่ากับ 150 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (Fujii, *et al.*, 1980) น้ำปลาจากญี่ปุ่น 74.4-82 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (Fujii and Sakai, 1984a) และ 56.8-113.6 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (Gasaluck, *et al.*,1996b) และน้ำปลาจากไทย ญี่ปุ่น และสิงคโปร์เท่ากับ 23-516 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (Itoh, *et al.*, 1985) Kasemsarn (1963 อ้างโดย Sanchez and Klitsaneephaiboon, 1983) และ Saisithi (1963 อ้างโดยมาลี อมรทิพย์รัตน์, 2533) รายงานว่า ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดจะมาจากการย่อยสลายของกรดไขมัน และจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเวลาในการหมักนานขึ้น แต่จะสิ้นสุดลงเมื่อหมักน้ำปลาได้ 9 เดือน หลังจากนั้นปริมาณด่างที่ระเหยได้จะลดลงอย่างรวดเร็ว แสดงว่าภายในระยะเวลาประมาณ 9 เดือนปฏิกิริยาทางเคมีของเนื้อปลาได้สิ้นสุดลงแล้ว นอกจากนี้ พงษ์เทพ เกิดเนตร (2533) กล่าวว่าปริมาณด่างที่ระเหยได้ในช่วงหลังของการหมักจะเป็น ส่วนประกอบสำคัญที่จะทำให้เกิดกลิ่นหอมคาวปลาของบูดู นอกจากนี้ปริมาณเกลือ (อังคณา พลูดำ, 2533) ความสดของวัตถุดิบ (นฤมล แสงทอง, 2529 อ้างโดย อังคณา พลูดำ, 2533) และปริมาณเอนไซม์โปรติเอส (พงษ์เทพ เกิดเนตร, 2533) ก็มีผลต่อปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดด้วย โดยอาหารหมักที่มีปริมาณเกลือสูงจะมีอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดช้ากว่าอาหารหมักที่มีปริมาณเกลือต่ำกว่า และอาหารหมักที่ใช้วัตถุดิบที่มีความสดน้อยกว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดมากกว่าอาหารหมักที่ใช้วัตถุดิบที่มีความสดมากกว่าเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดแสดง



ภาพที่ 5 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด และ ปริมาณไตรเมธิลเอมีน ในบูดูที่หมักจากปลาซาร์ดีนทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องใน

ให้เห็นว่ามีการแตกตัวของสารประกอบไนโตรเจนเกิดขึ้นสูงซึ่งเป็นผลจากปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสจากตัวปลาและแบคทีเรีย (Ng , 1987 อ้างโดย พงษ์เทพ เกิดเนตร, 2533)

3.4 ปริมาณไตรเมธิลเอมีน

Huss (1988 อ้างโดยอังคณา พูลดำ, 2533) กล่าวว่าปลาซาร์ดีนเป็นปลาที่มีกล้ามเนื้อสีดำมาก จากการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อสีดำทำให้ปริมาณไตรเมธิลเอมีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จากภาพที่ 5 ปริมาณไตรเมธิลเอมีนในวันแรกของการหมักบูดูที่

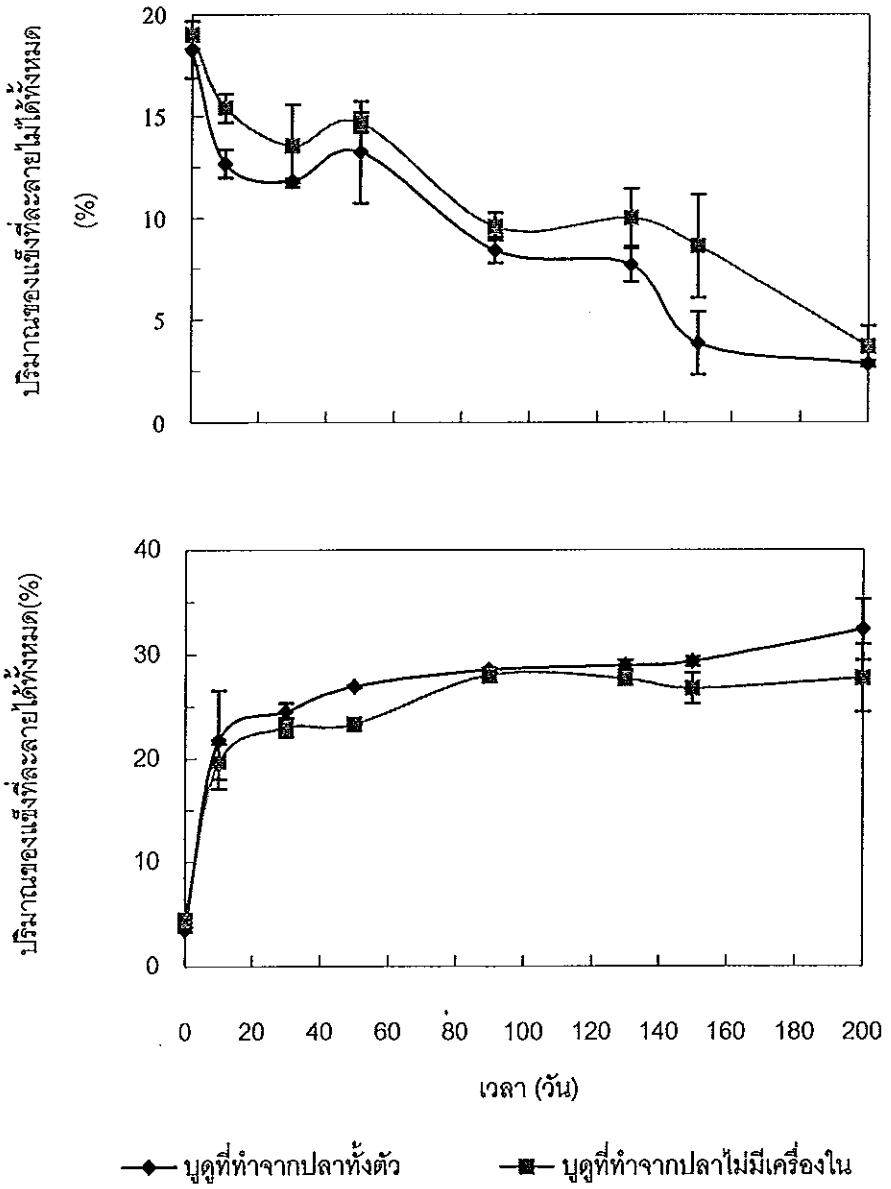
ทำจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในเท่ากับ 11.52 และ 8.19 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ ในวันที่ 10 ของการหมักปริมาณไตรเมธิลเอมีนจะลดลงมาอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 2.37 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมในบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและ 5.17 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมในบูดูที่หมักจากปลาไม่มีเครื่องใน ในช่วงระหว่าง 10-110 วันของการหมักปริมาณไตรเมธิลเอมีนของบูดูทั้งสองชนิดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และลดลงในช่วงหลังของการหมัก (110-200 วัน) ในขณะที่ Lalitha และคณะ (1994) รายงานว่าปริมาณไตรเมธิลเอมีนจะเพิ่มขึ้นเมื่ออายุในการหมักน้ำปลานานขึ้น สาเหตุที่ปริมาณไตรเมธิลเอมีนมีค่าสูงขึ้นนั้น Sakagushi และ Kawai (1981 อ้างโดยพงษ์เทพ เกิดเนตร, 2533) กล่าวว่าเป็นผลจากภาวะการหมักมีความเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย เช่น พีเอช อุณหภูมิ ปริมาณกรด และสารอาหารเป็นต้น โดยแบคทีเรียจะเป็นตัวเปลี่ยนไตรเมธิลเอมีนออกไซด์ให้เป็นไตรเมธิลเอมีนโดยใช้ไซโตโครม เป็นตัวนำอิเลคตรอนร่วมกับไตรเมธิลเอมีนออกไซด์ รีดักเทส (trimethylamine oxide reductase) จากนั้นในวันสุดท้ายของการหมัก (200 วัน) บูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวจะมีค่าไตรเมธิลเอมีนเท่ากับ 7.26 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และบูดูที่ทำจากปลาไม่มีเครื่องในมีค่าเท่ากับ 7.55 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

จากการทดลองของพงษ์เทพ เกิดเนตร (2533) พบว่าปริมาณไตรเมธิลเอมีนในบูดูที่มีการเติมเอนไซม์โบรมิเลน โปรเนส-อี และไม่เติมเอนไซม์ที่หมักนาน 150 วันจะมีค่าเท่ากับ 17.07 14.27 และ 12.06 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรตามลำดับ ในขณะที่ Beddows และคณะ (1979) พบว่าในระหว่างการหมักบูดูปริมาณไตรเมธิลเอมีนจะเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย และรายงานว่าบูดูที่มีหมักนาน 154 วันจะมีปริมาณไตรเมธิลเอมีนร้อยละ 0.028 กรัม ส่วน Fujii และคณะ (1980) รายงานว่าน้ำปลาของประเทศฟิลิปปินส์จะมีปริมาณไตรเมธิลเอมีน 14.9 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร แต่น้ำปลาของประเทศญี่ปุ่นจะมีปริมาณไตรเมธิลเอมีน 8.4-12.4 มิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ 100 มิลลิลิตร (Fujii and Sakai, 1984a) น้ำปลาจากประเทศไทย ญี่ปุ่น และสิงคโปร์จะมีค่าไตรเมธิลเอมีน 0-7.5 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (Itoh, *et al.*, 1985) นอกจากนี้ไตรเมธิลเอมีนยังมีบทบาทต่อผลิตภัณฑ์ปลาหมักได้แก่ ไตรเมธิลเอมีนเป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิดกลิ่นในน้ำปลา (Saisithi, *et al.*, 1966) และเมื่อไตรเมธิลเอมีนรวมตัวกับแอมโมเนียจะทำให้เกิดกลิ่นหอมคาวปลาที่รุนแรงในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (นงลักษณ์ สุทธิวณิช, 2531)

3.5 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้และละลายไม่ได้ทั้งหมด

ในวันแรกของการหมักบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในมีปริมาณของแข็งที่ละลายไม่ได้เท่ากับร้อยละ 18.26 และ 18.99 ตามลำดับ (ภาพที่ 6) จากนั้นจะมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้น โดยในวันที่ 200 ของการหมักบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในมีปริมาณของแข็งที่ละลายไม่ได้ทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 2.85 และ 3.69 ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่า อัตราการลดลงของปริมาณของแข็งที่ละลายไม่ได้ทั้งหมดในบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวจะสูงกว่าบูดูที่ทำจากปลาไม่มีเครื่องใน ส่วนปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในวันแรกของบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในเท่ากับร้อยละ 3.52 และ 4.48 ตามลำดับและมีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วโดยในวันที่ 10 ของการหมักมีค่าเป็นร้อยละ 21.78 และ 19.69 ตามลำดับ (ภาพที่ 6) จากนั้นแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของปริมาณของแข็งที่ละลายได้จะเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาหมัก จนครบ 200 วันของการหมัก โดยบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 32.31 และ 27.71 ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวจะสูงกว่าบูดูที่ทำจากปลาไม่มีเครื่องใน

พงษ์เทพ เกิดเนตร (2533) พบว่าเอนไซม์โปรติเอสจะมีผลต่อปริมาณของแข็งที่ละลายได้และละลายไม่ได้ทั้งหมด บูดูที่เติมเอนไซม์โบรมิเลน โปรเนสอี และไม่เติมเอนไซม์ และหมักนาน 150 วัน จะมีปริมาณของแข็งที่ละลายไม่ได้ทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 6.52 6.74 และ 8.55 ตามลำดับ และมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 37.08 36.87 และ 31.51 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าตัวอย่างบูดูที่เติมเอนไซม์โปรติเอสจะมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้สูงกว่าบูดูที่ไม่ได้เติมเอนไซม์ และมีปริมาณของแข็งที่ละลายไม่ได้ทั้งหมดต่ำกว่าบูดูที่ไม่เติมเอนไซม์ สอดคล้องกับพงษ์เทพ เกิดเนตร (2533) พบว่าเอนไซม์โปรติเอสจะมีผลต่อปริมาณของแข็งที่ละลายได้และละลายไม่ได้ทั้งหมด



ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณของแข็งที่ละลายได้และละลายไม่ได้ทั้งหมดใน ระหว่างการหมักบูดูจากปลาซาร์ดีนทั้งตัวและปลาที่ไม่มีเครื่องใน

โดยบูดูที่มีปริมาณเอนไซม์โปรติเอสสูงจะมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงกว่าบูดูที่มีปริมาณเอนไซม์โปรติเอสต่ำกว่า และมีปริมาณของแข็งที่ละลายไม่ได้ทั้งหมดต่ำกว่าบูดูที่ไม่เติมเอนไซม์ เช่นเดียวกับ ประเสริฐ สายสิทธิ์ (2511) กล่าวว่าเอนไซม์โปรติ เอสจะมี

ความสัมพันธ์กับปริมาณของแข็งที่ละลายได้และละลายไม่ได้ทั้งหมด อัตราการย่อยสลายโปรตีนและอะมิโนไนโตรเจน เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสจะย่อยสลายเนื้อปลาให้กลายเป็นเปปไทด์และกรดอะมิโน แต่จากการทดลองพบว่าในขณะที่ปริมาณของแข็งที่ละลายได้และละลายไม่ได้ทั้งหมดในบูดูทั้งสองชนิดไม่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด แต่การย่อยสลายโปรตีนและปริมาณอะมิโนไนโตรเจน (ภาพที่ 4) จะแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสจะย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลาให้กลายเป็นเปปไทด์และกรดอะมิโนไม่ใช่การย่อยสลายเนื้อปลา

3.6 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน

จากตารางที่ 9 พบว่าบูดูที่หมักจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องใน มีปริมาณกรดอะมิโนแตกต่างกัน บูดูที่หมักจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในมีกรดกลูทามิก 1290.27 และ 1112.02 ลูซีน 521.91 และ 419.60 กรดแอสพาร์ติก 749.44 และ 634.52 ไลซีน 653.13 และ 532.41 ฮีสติดีน 122.72 และ 106.06 วาลีน 376.52 และ 300.01 ไอโซ-ลูซีน 285.67 และ 211.45 ฟีนิลอะลานีน 221.57 และ 183.50 และอะลานีน 493.20 และ 409.85 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่างตามลำดับ จากข้อมูลจะเห็นได้ว่ากรดอะมิโนดังกล่าวข้างต้นในบูดูหมักจากปลาทั้งตัวมีปริมาณสูงกว่าบูดูที่หมักจากปลาซาร์ดีนที่ไม่มีเครื่องใน กรดอะมิโนที่พบมากที่สุดในการหมักบูดูทั้งสองชนิดได้แก่ กรดกลูทามิก กรดแอสพาร์ทิก ไลซีน ลูซีน อะลานีน และไกลซีนตามลำดับ ซึ่งกรดอะมิโนดังกล่าวเป็นกรดอะมิโนที่พบมากในน้ำปลาชนิดต่างๆ (Ijong and Ohta, 1995a,b ; Kaneko, 1991 อ้างโดย Shahidi and Botta, 1994 ; Shahidi and Botta, 1994) สาเหตุที่กรดอะมิโนของบูดูที่ทำจากปลาไม่มีเครื่องในมีปริมาณน้อยกว่าบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวทั้งๆ ที่ใช้ปลาชนิดเดียวกัน เพราะว่ามีเอนไซม์โปรติเอสน้อยกว่าทำให้อัตราการย่อยสลายช้ากว่าซึ่งสังเกตได้จากปริมาณของแข็งที่ละลายได้และปริมาณอะมิโนไนโตรเจน (El-Soda,*et al.*, 1983 อ้างโดย Collar and Martinez, 1993 ; Ijong and Ohta, 1995c ; Raksakulthai and Harrd, 1995b) นอกจากปริมาณเอนไซม์โปรติเอสแล้วยังขึ้นอยู่กับวิธีการเตรียมหรือขั้นตอนในการทำ ชนิดของปลาที่ใช้ ปริมาณเกลือ และชนิดของจุลินทรีย์

ตารางที่ 9 ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน (มิลลิกรัมต่อ100 กรัมตัวอย่าง) ที่ตรวจพบในบูดูแต่ละชนิด

ชนิดกรดอะมิโน	บูดูจากตลาด	บูดูที่หมักจากปลาทั้งตัว	บูดูที่หมักจากปลาไม่มีเครื่องใน
กรดแอสพาร์ทิก	279.62	749.44	634.52
ทรีโอนีน	141.71	331.31	273.04
เซรีน	73.71	329.88	265.64
กรดกลูทามิก	623.80	1290.27	1112.02
โพรลีน	87.63	291.44	264.64
ไกลซีน	152.46	473.48	399.63
อะลานีน	205.21	493.10	409.85
ซิสติน	21.59	23.35	23.71
วาลีน	193.03	376.52	300.01
เมทิโอนีน	103.46	168.93	122.20
ไอโซลูซีน	190.85	285.67	211.45
ลูซีน	328.25	521.91	419.60
ไทโรซีน	72.71	131.28	144.57
ฟีนิลอะลานีน	152.72	221.57	187.50
ฮิสติดีน	113.44	122.72	106.06
ไลซีน	272.61	653.13	523.41
อาร์จินีน	19.74	132.80	211.66
ทริบโตเฟน	24.08	40.23	17.47

วิเคราะห์โดย ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(Sanchez and Klitsaneephaiboon, 1983) จากการทดลองของ Shahidi และ Botta (1994) พบว่าถ้าใช้ปลา jack-mackeral หรือปลาซาร์ดีนหมักน้ำปลาจะมีกรดอะมิโน ฮีสติดีน ไลซีน และกรดกลูทามิก ในปริมาณสูง

รสชาติเป็นปัจจัยหลักอย่างหนึ่งในการยอมรับของผู้บริโภคเกิดจากบทบาทของกรดอะมิโน แต่ไม่มีรายงานที่แน่ชัดว่ากรดอะมิโนชนิดใดทำให้เกิดรสชาติในบูดูจึงใช้ชนิดของกรดอะมิโนในน้ำปลาซึ่งเป็นอาหารหมักที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันมากที่สุดในการเทียบเคียง อรพิน ภูมิภมร (2526) กล่าวว่ารสชาติของน้ำปลาเกิดจากกรดอะมิโนหลายชนิดร่วมกัน ซึ่งกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะให้รสชาติเฉพาะตัว กรดอะมิโนที่พบเกือบทุกระยะของการหมักคือ ไลซีน แอสพาร์ทิก กลูทามิก ไกลซีน ฮีสติดีน ลูซีนหรือไอโซ-ลูซีน และฟีนิลอะลานีน ส่วน Raksakulthai และ Haard, 1992a) พบว่า กรดอะมิโนพวกแอสพาร์ทิก เซอรีน กรดกลูตามิกและลูซีนที่พบในสายเปปไทด์เป็นองค์ประกอบที่ทำให้เกิดกลิ่นรสในน้ำปลา ซึ่งกรดอะมิโนดังกล่าวมีในบูดูด้วยโดยเฉพาะบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัว ดังนั้นในการหมักบูดูโดยวิธีธรรมชาติการใช้ปลาทั้งตัวเป็นวัตถุดิบในการหมักจึงดีกว่าการใช้ปลาไม่มีเครื่องในเป็นวัตถุดิบในการหมัก

4. เปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของบูดูจากปลาซาร์ดีน

4.1 องค์ประกอบทางเคมีของบูดู

จากตารางที่ 10 พบว่าบูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในที่มีอายุ 200 วันจะมีค่าทางเคมีได้แก่ ปริมาณโปรตีนร้อยละ 18.74 และ 15.71 อะมิโนไนโตรเจน 8.63 และ 5.16 กรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณกรดคิดเทียบกรดแลคติกร้อยละ 0.96 และ 0.62 ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด 146.80 และ 124.02 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตามลำดับ องค์ประกอบทางเคมีของบูดูที่ทำจากปลาไม่มีเครื่องในดังกล่าวจะมีปริมาณสูงกว่าบูดูที่ทำจากปลาไม่มีเครื่องใน และมีองค์ประกอบทางเคมีได้แก่ ปริมาณเกลือร้อยละ 20.62 และ 21.59 พีเอช 6.27 และ 6.65 และปริมาณไตรเมธิลเอมีน 7.26 และ 7.55 มิลลิกรัม

ตารางที่ 10 คุณสมบัติทางเคมีของบูดูจากปลาซาร์ดีน

องค์ประกอบทางเคมี	บูดูที่ทำจากปลาทั้งตัว	บูดูที่ทำจากปลาไม่มีเครื่องใน
โปรตีน (%)	18.74	15.71
อะมิโนไนโตรเจน (ก./กก.)	8.63	5.16
เกลือ (%)	20.62	21.56
พีเอช	6.27	6.65
กรดคิดเทียบกรดแลคติก (%)	0.96	0.62
ด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (มก./100 ก.)	146.80	124.02
ไตรเมธิลเอมีน (มก./100ก.)	7.26	7.55

ทำจากปลาไม่มีเครื่องใน ซึ่งจากรายงานของจักรี ทองเรือง และจงเกษม วณิชสุวรรณ (2532) พบว่าบูดูระดับชั้นที่ 1 มีคุณลักษณะทางเคมีดังนี้ พีเอช 4.75-6.80 ปริมาณกรดแลคติกร้อยละ 0.041-0.144 ปริมาณเกลือร้อยละ 17.16-24.08 ปริมาณอะมิโนไนโตรเจน 5.59-24.13 กรัมต่อลิตร และปริมาณโปรตีนร้อยละ 3.000-11.431 สำหรับบูดูระดับชั้นที่ 2 มีคุณลักษณะทางเคมีดังนี้คือ พีเอช 5.85-5.90 ปริมาณกรดแลคติกร้อยละ 0.050-0.097 ปริมาณเกลือร้อยละ 21.33-22.80 ปริมาณอะมิโนไนโตรเจน 8.99-17.34 กรัมต่อลิตร และปริมาณโปรตีนร้อยละ 4.694-9.073 แต่มาลี อมรทิพย์รัตน์ (2522) รายงานว่าบูดูจะมีพีเอช 5.3-6.6 ปริมาณกรดคิดเทียบกรดแลคติกร้อยละ 0.22-1.29 ปริมาณเกลือร้อยละ 19.87-27.55 ในขณะที่พงษ์เทพ เกิดเนตร (2533) รายงานว่า บูดูที่หมักตามธรรมชาตินาน 150 วัน จะมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 9.78 อะมิโนไนโตรเจน 5.75 กรัมต่อลิตร ด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด 126.66 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ไตรเมธิลเอมีน 12.60 กรัมต่อ 100 กรัม Beddows และ Ardeshir (1979) พบว่าบูดูจะมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 11.06-13.81 อะมิโนไนโตรเจน 11.70-15.10 กรัมต่อลิตร และไตรเมธิลเอมีน 2.80-3.60 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีของบูดูที่หมักจากปลาทั้งตัว บูดูที่หมักจากปลาไม่มีเครื่องใน และบูดูจากการทดลองของ จักรี ทองเรืองและจงเกษม วณิชสุวรรณ (2532), มาลี อมรทิพย์รัตน์ (2522), พงษ์เทพ เกิดเนตร (2533) และ Beddows และ Ardeshir (1979) พบว่า บูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและบูดูที่ทำจากปลาไม่มีเครื่องในจะมีปริมาณโปรตีนสูงกว่า ซึ่งอาจเกิดจากในการทดลองครั้งนี้จะใช้ตัวอย่างบูดูซึ่งประกอบด้วยเนื้อปลาและน้ำที่ได้จากการหมักแต่การทดลองจากรายงานที่อ้างถึงใช้เฉพาะน้ำหมัก และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างบูดูที่หมักจากปลาทั้งตัวกับบูดูที่หมักจากปลาไม่มีเครื่องในจะเห็นว่า บูดูที่หมักจากปลาทั้งตัวจะมีองค์ประกอบทางเคมีสูงกว่าบูดูที่ทำจากปลาไม่มีเครื่องใน ดังนั้นปลาซาร์ดีนทั้งตัวจึงเหมาะสมที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตบูดูมากกว่าปลาที่ไม่มีเครื่องใน นอกจากนี้เมื่อพิจารณาคุณสมบัติทางเคมีของผลิตภัณฑ์เพื่อพิจารณาระดับชั้นของบูดูพบว่า บูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในจัดอยู่ในบูดูระดับชั้นที่ 1

4.2 คุณค่าทางโภชนาการ : กรดไขมันและกรดอะมิโน

จากการวิเคราะห์หาชนิดของกรดไขมันในบูดูทั้ง 3 ชนิดได้แก่บูดูสายบุรี บูดูที่หมักจากปลาทั้งตัว และบูดูที่หมักจากปลาไม่มีเครื่องใน โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี พบว่า บูดูที่ขายตามท้องตลาดและบูดูที่หมักจากปลาทั้งตัวในห้องปฏิบัติการจะมีกรดพาลมิติกมากที่สุด (0.170 และ 0.207 กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง) รองลงมาคือกรดโดโคเฮกซาอิโนอิกหรือดีเอชเอ (0.140 และ 0.072 กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง) และกรดสเตียริก (0.060 และ 0.069 กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง) ตามลำดับ ส่วนบูดูที่หมักจากปลาที่ไม่มีเครื่องในจะมี กรดไอโคซาเพนทาอิโนอิกหรืออีพีเอมากที่สุด (0.20 กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง) รองลงมาคือกรดพาลมิติก (0.15 กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง) กรดสเตียริก และดีเอชเอ (0.007 กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง) ตามลำดับ โดยมีปริมาณกรดสเตียริกและดีเอชเอเท่ากัน จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าบูดูหมักจากปลาซาร์ดีนทั้งตัวมีปริมาณกรดไขมันชนิดต่างๆ ในระดับสูงกว่าบูดูที่วางขายตามท้องตลาดและบูดูที่หมักจากปลาซาร์ดีนไม่มีเครื่องใน ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากการใช้วัตถุดิบในการหมักบูดูต่างกัน โดยปกติชาว

บ้านมักจะใช้ปลาหลายชนิดรวมๆกันในการหมักบูดู ซึ่งปลาแต่ละชนิดจะมีปริมาณไขมันต่างกันและถึงแม้ว่าเป็นปลาชนิดเดียวกันแต่ฤดูกาลต่างกันก็ส่งผลให้ปริมาณไขมันต่างกันด้วย (Shahidi and Botta, 1994) สอดคล้องกับการทดลองของ Stansby (1990) รายงานว่าองค์ประกอบโดยเฉลี่ยของกรดไขมันในน้ำมันปลาซาร์ดีนจะมี อีพีเอมากที่สุด (17 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก) รองลงมาคือกรดพาลมิติก (16 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก) และดีเอชเอ (13 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก) นอกจากนี้ Steiner-Asieduและคณะ (1991อ้างโดย Shahidi and Botta, 1994) พบว่าเนื้อปลาซาร์ดีนสดจะมีดีเอชเอมากที่สุด (ร้อยละ 28.2 โดยน้ำหนัก) รองลงมาคือกรดพาลมิติก (ร้อยละ 28.0 โดยน้ำหนัก) และกรดโอเลอิก (ร้อยละ 9.5 โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ ส่วนฝ่ายวิชาการบริษัทแลปอินเตอร์ (2540) รายงานว่ากรดไขมันในน้ำมันปลาประมาณร้อยละ 15-40 เป็นกรดไขมันอิ่มตัวได้แก่ กรดพาลมิติก ส่วนที่เหลือเป็นกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวที่พบมากที่สุดคือ อีพีเอและดีเอชเอ บทบาทสำคัญของ อีพีเอและดีเอชเอ คือช่วยป้องกันและลดปัจจัยเสี่ยงในการเป็นโรคหัวใจ ความดันโลหิตสูง ไขข้ออักเสบและโรคปวดศรีษะไมเกรน นอกจากนี้โอเมก้า-3 ยังมีความสำคัญต่อการพัฒนาระบบประสาทส่วนกลางและการมองเห็นอีกด้วย (มณีรัตน์ อังศุศรีวงศ์, 2529)

องค์ประกอบทางเคมีของบูดูที่สำคัญคือ โปรตีน แต่คุณค่าทางอาหารของบูดูมีจำกัด เนื่องจากมีรสเค็มมากทำให้รับประทานได้ในปริมาณน้อย บูดูที่ทำจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในมีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นครบทุกตัว โดยที่มีไลซีนมากที่สุด รองลงมาคือ ลูซีน วาลีน ทรีโอนีน ไอโซ-ลูซีน ฟีนิลอะลานีน เมทิโอนีน ทริปโตเฟน ตามลำดับ (ตารางที่ 9) จากรายงานของ McGraw-Hill (1987) รายงานว่าปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นที่มนุษย์ควรได้รับอย่างน้อยที่สุด คือ ไลซีน 0.80 ลูซีน 1.10 วาลีน 0.80 ทรีโอนีน 0.50 ไอโซ-ลูซีน 0.70 ฟีนิลอะลานีน 1.10 เมทิโอนีน 1.10 และทริปโตเฟน 0.25 กรัมต่อวัน เนื่องจากบูดูมีปริมาณไลซีนสูง และข้าวที่เป็นอาหารหลักของประชาชนในแถบนี้มีไลซีนต่ำ บูดูจึงนับเป็นแหล่งไลซีนที่ดีเช่นกัน

ตารางที่ 11 ชนิดและปริมาณกรดไขมัน (กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง) ในบูดูแต่ละชนิด

ชนิดกรดไขมัน	บูดูจากตลาด	บูดูที่หมักจากปลาทั้งตัว	บูดูที่หมักจากปลาไม่มีเครื่องใน
กรดเลอริก ($C_{12:0}$)	0.010	0.003	0.002
กรดไมริสติก ($C_{14:0}$)	0.030	0.053	0.040
กรดพาลมิติก ($C_{16:0}$)	0.170	0.207	0.150
กรดพาลมิโทเลอิก ($C_{16:1\ n-7}$)	0.030	0.052	0.040
กรดมาร์การิก ($C_{17:0}$)	0.010	0.015	0.010
กรดสเทียริก ($C_{18:0}$)	0.060	0.069	0.050
ซีส-วัคซีนิค ($C_{18:1\ n-7}$)	0.020	0.018	0.014
กรดโอเลอิก ($C_{18:1\ n-9}$)	0.040	0.031	0.023
กรดลิโนเลอิก ($C_{18:2\ n-6}$)	0.010	0.010	0.006
กรดอัลฟาลิโนเลอิก ($C_{18:3\ n-3}$)	0.003	0.004	0.002
กรดโมรอคติก ($C_{18:4\ n-3}$)	0.003	0.004	0.002
กรดอะราคิดิก ($C_{20:0}$)	0.003	0.005	0.004
กรดกอนโดอิก ($C_{20:1\ n-9}$)	0.003	0.002	0.002
กรดไอโคซาไตรอิโนอิก ($C_{20:3\ n-6}$)	-	0.001	-

ตารางที่ 11 (ต่อ)

ชนิดกรดไขมัน	บูดูจากตลาด	บูดูที่หมักจากปลาทั้งตัว	บูดูที่หมักจากปลาไม่มีเครื่องใน
กรดไอโคซาเทททร้าอิโนอิก ($C_{20:4\ n-6}$)	0.002	-	0.010
กรดไอโคซาเทททร้าอิโนอิก ($C_{20:4\ n-6,n-3}$)	-	0.015	-
กรดไอโคซาเพนทาอิโนอิก ($C_{20:5\ n-3}$)	0.030	0.026	0.20
กรดบีฮีนิก ($C_{22:0}$)	0.002	0.003	0.003
กรดโดโคซาเพนทาอิโนอิก ($C_{22:5\ n-6,n-3}$)	0.010	0.010	0.007
กรดโดโคซาเฮกซาอิโนอิก($C_{22-6\ n-3}$)	0.140	0.072	0.050
กรดเททร้าโคซาอิโนอิก ($C_{24:1}$)	0.004	0.003	0.002
ระบุชนิดไม่ได้	0.030	0.060	0.030

วิเคราะห์โดย ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

5. แบคทีเรียที่ผลิตกรดและผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักบูดู

จากการสุ่มโคโลนีที่ผลิตกรดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ APT ในระหว่างการหมักบูดูและนำมาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสได้มากที่สุดจำนวน 8 สายพันธุ์จากจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 624 สายพันธุ์ดังแสดงในตารางที่ 12 และ 13

ตารางที่ 12 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 8 สายพันธุ์

สายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส(ยูนิต/มล.) ที่เวลา 24 ชม.		กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส(ยูนิต/มล.) ที่เวลา 48 ชม.	
	ไม่มีเกลือ	มีเกลือ 10 %	ไม่มีเกลือ	มีเกลือ 10 %
PLN02	0.150	0.166	0.122	0.139
PLN71	0.033	0.058	0.038	0.037
PLN72	0.032	0.042	0.041	0.039
PLN75	0.031	0.034	0.032	0.033
PLN85	0.046	0.065	0.038	0.043
PLN106	0.020	0.035	0.032	0.029
PLN135	0.057	0.078	0.041	0.055
PLN158	0.028	0.032	0.024	0.036

6. ศึกษาผลของการเติมกล้าเชื้อจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ต่อการหมักบูดู

หมักบูดูโดยใช้กล้าเชื้อที่คัดเลือกได้จำนวน 8 สายพันธุ์ โดยเติมลงไปในบูดูที่หมักมานาน 50 วันเปรียบเทียบกับบูดูที่หมักโดยวิธีธรรมชาติ (ไม่เติมกล้าเชื้อ) ทำการสุ่มตัวอย่างบูดูที่เวลา 10 20 และ 30 วันหลังจากการเติมกล้าเชื้อ จากตารางที่ 14 และ 15 พบว่าในวันที่ 10 หลังจากเติมกล้าเชื้อตัวอย่างบูดูทุกชุดการทดลองจะมีการย่อยสลายโปรตีนอยู่ในช่วง 5.71-6.16 จากนั้นในวันที่ 20 หลังจากเติมกล้าเชื้อจะมีการย่อยสลายโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็น 5.96-6.24 และค่อนข้างคงที่ในวันที่ 30 หลังจากเติมกล้าเชื้อ กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสพบว่าที่เวลาเดียวกันบูดูที่มีการเติมกล้าเชื้อและไม่เติมกล้าเชื้อจะไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 21.68-25.75, 24.01-25.71 และ 22.51-26.79 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในวันที่ 10, 20 และ 30 หลังจากเติมกล้าเชื้อตามลำดับ

ตารางที่ 13 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 8 สายพันธุ์บนอาหารแข็ง Tributyrin

สายพันธุ์	Tributyrin agar[1]	Tributyrin agar ที่มีเกลือ 10%[2]
PLN02	+	+
PLN71	+	+
PLN72	+++	++
PLN75	++	+
PLN85	++	+
PLN106	+	+
PLN135	+	+
PLN158	+++	+

[1] ทำการวัดวงใสหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

[2] ทำการวัดวงใสหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง

+ : ขนาดวงใส 0.5-1.0 มิลลิเมตร

++ : ขนาดวงใสมากกว่า 1.0-2.0 มิลลิเมตร

+++ : ขนาดวงใสมากกว่า 2.0 -3.0 มิลลิเมตร

เมื่อนำบูดูที่หมักหลังจากเติมกล้าเชื้อเป็นเวลา 30 วันทั้งหมด 9 ตัวอย่างมาทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ทดสอบดมจำนวน 18 คน ทดสอบดมโดยวิธีพรรณนาเชิงปริมาณ (QDA) โดยปัจจัยที่ศึกษาคือ กลิ่นบูดู (ภาคผนวก ค) การทดสอบจะแบ่งเป็นสองครั้งๆละ 4 ตัวอย่างและทุกครั้งที่ทดสอบจะมีตัวอย่างมาตรฐาน 1 ตัวอย่างคือบูดูที่ขายตามท้องตลาด จากการทดลองพบว่าทุกตัวอย่างไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.5$) (ตารางที่ 16) ซึ่งการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคมีความสอดคล้องกับอัตราการย่อยสลายโปรตีน และปริมาณเอนไซม์โปรติเอส จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า การเติมกล้าเชื้อไม่มีผลเร่งการหมักบูดู ในขณะที่จากการทดลองของคนอื่นพบว่าการ

เติมกล้าเชื้อ *Pediococcus halophilus* ในการหมักไตปลา กุ้งจ่อม และหอยแมลงภู่ดอง จะทำให้ระยะเวลาในการหมักน้อยลงแต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพเหมือนเดิม (จินดารัตน์ นิวัฒนพงษ์, 2522 อ้างโดย นภา โล่ห์ทอง, 2534) และการเติมกล้าเชื้อ *P. halophilus* ในการหมักบูดูจะทำให้ได้บูดูที่มีกลิ่นหอมมากกว่าบูดูที่หมักโดยวิธีธรรมชาติ (มาลี อมรทิพย์รัตน์, 2522) นอกจากกล้าเชื้อแบคทีเรียแล้วยังมีการเติมกล้าเชื้อราในรูปของโคจิ (koji) ในการหมักน้ำปลาด้วยโดยพบว่าจะช่วยลดระยะเวลาในการหมักน้ำปลาได้เช่นกัน (Park, *et al.*, 1979 อ้างโดย Beddows, 1985 ; Tagano, *et al.*, 1978 อ้างโดย Beddows, 1985)

ตารางที่ 14 การย่อยสลายโปรตีนของบูดูที่หมักโดยวิธีธรรมชาติ เปรียบเทียบกับการเติมกล้าเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ

ชนิดของบูดู	หลังจากเติมกล้าเชื้อ 10 วัน	หลังจากเติมกล้าเชื้อ 20 วัน	หลังจากเติมกล้าเชื้อ 30 วัน
บูดูที่หมักตามธรรมชาติ	6.01	6.21	6.17
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN2	5.97	6.24	6.18
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN71	6.05	6.23	6.33
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN72	5.71	6.09	6.16
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN75	6.16	6.24	6.19
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN85	5.97	5.96	5.93
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN106	5.92	6.20	6.25
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN135	6.00	6.22	6.22
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN158	5.97	6.00	6.23

ตารางที่ 15 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในบูดูหมักโดยวิธีดั้งเดิม เปรียบเทียบกับการเติมกล้าเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

ชนิดของบูดู	หลังจากเติมกล้าเชื้อ 10 วัน	หลังจากเติมกล้าเชื้อ 20 วัน	หลังจากเติมกล้าเชื้อ 30 วัน
บูดูที่หมักตามธรรมชาติ	23.93	24.41	24.31
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN2	24.66	25.06	25.21
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN71	23.54	24.01	25.37
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN72	24.19	24.86	25.18
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN75	25.75	24.79	25.53
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN85	21.68	24.26	22.51
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN106	23.27	24.82	22.94
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN135	23.85	24.86	26.79
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN158	23.00	25.71	24.72

7. การเทียบเคียงชนิดแบคทีเรียที่ใช้เป็นกล้าเชื้อ

จากการเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียทั้ง 8 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้และใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักบูดู โดยวิธีทางกายภาพและทางชีวเคมี (ตารางที่ 17) พบว่าประกอบด้วย *Staphylococcus equorum* 2 สายพันธุ์ (PLN2 และ PLN71) *S. gallinarum* 5 สายพันธุ์ (PLN72 PLN75 PLN106 PLN135 และPLN158) และ *S. xylosus* 1 สายพันธุ์ (PLN85) สอดคล้องกับการทดลองของ Suntinanalerts (1979 อ้างโดย พงษ์เทพ เกิดเนตร, 2533) Sanchez และ Klitsaneephaiboon (1983) Saisithi (1987a,b) Ijong และ Ohta (1995b, 1996) Gasaluck และคณะ (1996b) และ สายสมร ลิปตะศิริ (2518 อ้างโดย มาลี อมรทิพย์รัตน์, 2522) ตรวจพบ *Staphylococcus* ในน้ำปลา นอกจากนี้ Itoh และคณะ (1985) *พบ S. saprophyticus* ในน้ำปลาจากประเทศไทย และมาลี อมรทิพย์รัตน์ (2522) พบ *S. aureus* และ *S. epidermis* ในบูดู

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบการประเมินผลทางประสาทสัมผัสของบูดูที่หมักโดยวิธีเติมกล้าเชื้อและที่หมักตามธรรมชาติ

ชนิดของบูดู	กลิ่นบูดู
บูดูที่หมักตามธรรมชาติ	2.80^{ns}
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN2	3.39
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN71	3.78
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN72	2.41
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN75	2.64
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN85	2.60
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN106	3.23
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN135	2.91
บูดูที่เติมกล้าเชื้อ PLN158	3.66

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยในแต่ละสดมภ์จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.5$)

จากการทดลองในข้อ 3 พบว่าทั้ง 8 สายพันธุ์ไม่สามารถผลิตกลิ่นบูดูได้ดี อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดเป็นแบคทีเรียที่ทนเกลือคือสามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซนต์ (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2535) แต่ไม่ชอบเกลือ เมื่อเติมลงในบูดูซึ่งมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 25 เปอร์เซนต์การเจริญจึงช้ามากทำให้สังเกตผลการทดลองไม่ได้ในช่วงเวลาที่ทดสอบ

ตารางที่ 17 คุณสมบัติทางสัณฐาน และชีวเคมีสำหรับการเทียบเคียงแบคทีเรีย

คุณลักษณะที่ตรวจสอบ	*S. gallinarum*	*S. equorum*	*S. xylosus*
รูปร่าง	กลม	กลม	กลม
การติดสีแกรม	+	+	+
Catalase	+	+	+
O-F glucose	F	F	F
Coagulase	-	-	-
Urease	+	+	+
Novobiocin resistance	R	R	R
Acid (aerobically) from			
Sucrose	+	+	+
Cellobiose	ND	+	-
Xylose	+	+	+
Raffinose	+	-	-

S. gallinarum ได้แก่ LPN72 LPN75 PLN106 PLN135 และLPN158

S. equorum ได้แก่ LPN2 และLPN71

S. xylosus ได้แก่ LPN85

บทที่ 4

สรุป

1. บูดูที่หมักจากปลาซาร์ดีนที่ไม่มีเครื่องในปลาจะมีปริมาณเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส และปริมาณไขมันต่ำกว่าบูดูที่หมักจากปลาทั้งตัว

2. ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกที่ตรวจพบไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อหมักปลาทั้งตัวเปรียบเทียบกับการหมักปลาที่ไม่มีเครื่องใน

3. การเปลี่ยนแปลงของการย่อยสลาย อะมิโนไนโตรเจน ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในการหมักปลาซาร์ดีนไม่มีเครื่องในเกิดขึ้นช้ากว่าและปริมาณต่ำกว่าชุดการหมักจากปลาทั้งตัว

4. การเปลี่ยนแปลงของด่างที่ระเหยได้และปริมาณไตรเมธิลเอมีนจากบูดูหมักจากปลาทั้งตัวและปลาไม่มีเครื่องในไม่แตกต่างกัน

5. คุณค่าทางโภชนาการของบูดูที่หมักจากปลาทั้งตัวจะมีปริมาณอีพีเอ ดีเอชเอและกรดอะมิโนที่จำเป็นสูงกว่าบูดูที่หมักจากปลาไม่มีเครื่องใน

6. แบคทีเรียที่สร้างกรดและเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจำนวน 8 สายพันธุ์ที่เติมเป็นกล้าเชื้อในบูดูไม่มีผลทำให้อัตราการย่อยสลาย ปริมาณโปรติเอสต่างจากการหมักแบบธรรมชาติ

บรรณานุกรม

กองโภชนาการ กรมอนามัย. 2530. ตารางแสดงคุณค่าอาหารไทยในส่วนที่กินได้ 100 กรัม. กรุงเทพฯ : กองโภชนาการ กรมอนามัย.

จักรี ทองเรือง และจงเกษม วณิชสุวรรณ. 2532. องค์ประกอบและการแบ่งระดับชั้นน้ำบูดูที่วางจำหน่ายในตลาด. ปัญหาพิเศษ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ดนัย ลิมปดนัย. 2511. ศึกษาการผลิตบูดูในระยะสั้นโดยเปรียบเทียบกับบูดูพื้นเมืองและน้ำปลาจากภาคใต้. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นงนุช รักสกุลไทย. 2530. กรรมวิธีแปรรูปสัตว์น้ำ. ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นงลักษณ์ สุทธิวนิช. 2531. การเน่าเสียของสัตว์น้ำ. *ใน* คุณภาพสัตว์น้ำ. หน้า 163-176., สงขลา : ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นภา โล่ห์ทอง. 2534. กล้าแบคทีเรีย. *ใน* กล้าเชื้อ อาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. หน้า 122-145. กรุงเทพฯ : ฟันนี่ พับลิชชิ่ง.

ประเสริฐ สายสิทธิ์. 2511. กลิ่นและรสของน้ำปลา. ว. การประมง. 21(3) : 467-474.

ประเสริฐ สายสิทธิ์. 2514. ผลิตภัณฑ์ประมงและหลักการถนอม. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์คุรุสภา.

ประเสริฐ สายสิทธิ์. 2533. การถนอมปลาในประเทศเอเชียอาคเนย์. อาหาร. 20(2) : 75-95.

ฝ่ายวิชาการบริษัทแลปอินเตอร์. 2540. น้ำมันปลา.ว. สุกรสาส์น. 23(95) : 23-25.

พงษ์เทพ เกิดเนตร. 2533. การศึกษาผลของชนิดปลาและกรรมวิธีต่อการผลิตและคุณภาพของน้ำบูดู. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พิสิฐ กาญจนไพศิษฐ์. 2520. การทำน้ำปลาโดยขบวนการเร่งด่วน. สัมมนาวิทยาศาสตร์การอาหาร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2535. การวางแผนและการวิเคราะห์ทางด้านประสาทสัมผัส. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มณีรัตน์ อังศุศรีวงศ์. 2539. น้ำมันปลา. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ. 44(140) : 6-8.

มาลี อมรทิพย์รัตน์. 2522. การศึกษาจุลชีววิทยาของอาหารหมักพื้นเมือง : บูดู. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ละอองวรรณ เหมจินดา. 2526. การศึกษาชนิดของปลาและอัตราส่วนของเกลือต่อคุณภาพน้ำบูดู. ปัญหาพิเศษ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร. 2529. เทคโนโลยีของผลิตภัณฑ์ประมง. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2535. แบคทีเรียที่มีความสำคัญด้านอาหาร. *ใน* จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร. หน้า 60-119. สงขลา : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2536. จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในอาหารหมัก. *ใน* ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์. หน้า 3-33. สงขลา : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิวาพร ศิวเวชช. 2526. การเสียของปลาและสัตว์น้ำต่างๆ. *ใน* จุลชีววิทยาทางอาหาร. หน้า 154-159. สงขลา : ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมพงษ์ คุ้มภัย. 2534. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของแบคทีเรียแลคติกในระยะต้นของการหมักน้ำปลา. ปัญหาพิเศษภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

สมศักดิ์ ไชยจิตต์ และอโนชา ขจัดภัย. 2524. การวิเคราะห์หาปริมาณสารอาหารในบูดู. ว. สงขลานครินทร์. 3(4) : 298-303.

สายพิณ ไชยนันทน์ และนิวัฒน์ ฉายโชติเจริญ. 2530. กิจกรรมย่อยสลายโปรตีนของแบคทีเรียที่ทนเกลือได้ 10 เปอร์เซนต์. ว. ครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์. 6 : 115-125.

สายพิณ ไชยนันทน์ และสิทธิพันธุ์ ไชยนันทน์. 2526. การศึกษาบักเตรีที่มีบทบาททำให้เกิดกลิ่นในน้ำปลาไทย. วารสารคณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์. 2 (2) : 1-14.

สิทธิพันธุ์ ไชยนันทน์. 2522. การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำปลาไทย ซึ่งผลิตจากปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุมาลี เหลืองสกุล. 2527. การปนเปื้อน การถนอม และการเสียของปลาและอาหารทะเลต่างๆ. *ใน* จุลชีววิทยาทางอาหาร. หน้า 268-281., กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

อรพิน ภูมิภมร. 2526. น้ำปลาและผลิตภัณฑ์ปลาหมัก. *ใน* จุลินทรีย์ในเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์และอาหารหมักพื้นเมือง. หน้า 73-84. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อังคณา พูลดำ. 2533. การพัฒนาผลิตภัณฑ์กะปิปลาจากปลาหลังเขียว (*Sardinella* sp.) และวัสดุเศษเหลือใช้จากโรงงานแปรรูปอาหารทะเล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อำนวย โชติญาณวงษ์. 2524. การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ประมง. กรุงเทพฯ : ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลับเกษตรศาสตร์

Adams, M.R., Cooke ,R.D. and Rattagool, P. 1985. Fermented fish products of Southeast Asia. Trop. Sci. 25 : 61-73.

Adnan, N.A.M. and Owens, J.D. 1984. Technical note : Microbiology of oriental shrimp paste. J. Food Technol. 19 : 499-502.

Alm, F. 1965. Scandinavian anchovies and herring tidbits. *In* Fish as Food. (ed. G. Borgstrom). Vol.3, pp. 195-213. New York : Academic Press.

Amano, K. 1962. The influence of fermentation to the nutritive value of fish with special reference to fermented fish products of South-East Asia. *In* F.A.O. Intern. Symp. on Fish in Nutrition. (eds. E. Heen and R. Krenzer) pp.180-200. London : Fishing News (Books) Ltd.

A.O.A.C. 1984. Official Method of Analysis of the Association of Official A Analytical Chemists 14th ed. Virginia : The Association of Official Analytical Chemists, Inc.

A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists 15th ed. Virginia : The Association of Official Analytical Chemists, Inc.

Balows, A., Truper,H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. 1991. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. *In* The Prokaryotes. Vol. II. pp. 1369-1420. Springer-Verlag.

Beddows, C.G. 1985. Fermented Fish and Fish Products. *In* Microbiology of Fermented Foods. (ed. B.J.B. Wood) Vol.2, pp. 1-39. England : Elsevier Applied Science Publishers Ltd.

Beddows, C.G. 1985. Fermented Fish and Fish Products. *In* Microbiology of Fermented Foods. (ed. B.J.B. Wood) Vol.2, pp. 1-39. England : Elsevier Applied Science Publishers Ltd.

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

Beddows, C.G., Ardeshir, A.G. and Daud, W.J.b. 1979. Biochemical Changes Occuring During the Manufacture of Budu. J. Sci. Food Agric. 30 : 1097-1103.

Beddows, C.G., Ismail, M. and Steinkraus, K.H. 1976. The use of bromelain in the hydrolysis of mackerel and the investigation of fermented fish aroma. J. Sci. Food Agric. 11 : 379-388.

Chaiyanan, S., Sarayanit, S., Chamaoot, M. and Kesornmala, C. 1988. Fish Sauce Fermentation by Using Microbial Inoculation and Recycling System. Proceeding of the Food Conference' 88 Bangkok, Thailand, 24-26 October, 1988, Food Science and Technology in Industrial Development. Vol.1. pp. 320-325.

Charabuddhanond, S. and Thongthai, C. 1991. Fish sauce fermentation : Roles of microorganisms. Papers Presented at The Eighth Session of The Indo Pacific Fishery commission Working Party in Fish Technology and Marketing, Yogjakata, Indonesia, 24-27 September 1991. pp. 124-127.

Chayovan, S., Rao, R.M., Liuzzo, J.A. and Khan, M.A. 1983. Chemical characterization and sensory evaluation of a dietary sodium-potassium fish sauce. J. Agric. Food Chem. 31 : 859-863.

Chung, S.Y. and Lee, E.H. 1976. The taste compounds of fermented *Acetes chinensis*. Bull. Korean Fish. Soc. 9 : 79-110.

Cole, R.C. 1963. Preservation of fish in the tropics. Fishing News International. 2 (4) : 385-390.

Collar, C. and Martinez, C.S. 1993. Amino Acid Profiles of Fermenting Wheat Sour Doughs. J. Food Sci. 58(6) : 1324 - 1328.

Coombs, J. 1988. Dictionary of biotechnology. The Macmillan Press Ltd.

Crisan , E.V. and Sands, A. 1975. Microflora of four fermented fish sauce. J. Appl. Microbiol. 29 : 106-108.

Dougan, J. and Howard, G.E. 1975. Some Flavoring Constituents of Fermented Fish Sauce. J. Sci. Food Agric. 26 : 887-894.

Frazier, W.C. and Westhoff, D.C. 1988. Food as a Substrate for Microorganisms. *In* Food Microbiology. pp. 3-16. Singapore : McGraw-Hill Book Co.

Fujii, T., Basuki, S.B. and Tozawa, H. 1980. Microbiological studies on ripening of fish sauce, I. Chemical composition and microflora of fish sauce (Patis).

Nippon Suisan Gakkaishi. 46(10) : 1235-1240.

Fujii, T. and Sakai, H. 1984a. Chemical composition and microflora of fish sauce "shotturu". Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. Nissuishi. 50(6) : 1061-1066.

Fujii, T. and Sakai, H. 1984b. Chemical and microbiological analyses of putrid fish sauce "shotturu". Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. Nissuishi. 50(6) : 1067-1070.

Gasaluck, P., Yokoyama, K., Kimura, T. and Sugahara, I. 1996a. The occurrence of *Bacillus cereus* in local Thai traditional foods. J. of Antibacterial and Antifungal Agents , Japan. 24(5) : 349-356.

Gasaluck, P., Yokoyama, K., Kimura, T. and Sugahara, I. 1996b. Some chemical and microbiological properties of Thai fish sauce and paste. J. of Antibacterial and Antifungal Agents, Japan. 24(6) : 385-390.

Gildberg, A., Hermes, J.A. and Orejana, F.M. 1984. Acceleration of autolysis during fish sauce fermentation by adding acid and reducing salt content.. J. Sci. Food Agric. 35 : 1363-1369.

Gildberg, A. and Xian-Quan, S. 1994. Recovery of Tryptic Enzymes from Fish Sauce. Process Biochem. 29 : 151-155.

Greig, R.I.W. 1988. Fish fermentation - a potential export product for Australian fisheries. Fishermans J. 10(6) : 17-20.

Greig, R.I.W. and Estrella, D.C. 1988. A Study of the Acceleration of Fish Sauce Production Using Enzymes. Proceeding of the Food Conference' 88 Bangkok, Thailand, 24-26 October, 1988, Food Science and Technology in Industrial Development. Vol. 1. pp. 275-280.

Hagihara, B., Matsubara, H., Nakia, M. and Okunuki, K. 1958. Crystalline bacteria proteinase. I Preparation of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis*. J. Biochem(Tokyo). 45 : 185-194.

Hasegawa, H. 1987. Laboratory manual on analytical methods and procedures for fish and fish products. Marine Fisheries Research Department Southeast Asia Fisheries Development Center. Singapore.

Ijong, F.G. and Ohta, Y. 1995a. Amino Acid Compositions of Baksang, a Traditional Fermented Fish Sauce from Indonesia. Food Science and Technology Lebensmittel Wissenschaft and Technologie. 28(2) : 236-237.

Ijong, F.G. and Ohta, Y. 1995b. Microflora and chemical assessment of an Indonesian traditional fermented fish sauce "bakasang". J. Appl. Biol. Sci. 34(2) : 95-100.

Ijong, F.G. and Ohta, Y. 1995c. Characteristics of bakasang fermented with lactic acid bacteria-mixed culture. Appl. Biol. Sci. Seibutsu Seisangaku Kenkyu. 34(1) : 1-10.

Ijong, F.G. and Ohta, Y. 1996. Physicochemical and microbiological changes associated with bakasang processing a traditional Indonesian fermented fish sauce. J. Sci. Food Agric. 71(1) : 69-74.

Itoh, H., Hdioetoma, R.S., Nikkuni, S. and Okada, N. 1985. Studies on lactic acid bacteria in fish sauce (part I) Chemical composition and microflora of fish sauce. Rept. Natl. Food Res. Inst. 47 : 23-30.

Jay, J.M. 1978. Fermented food and related products of fermentation. *In* Modern food microbiology. (ed. D. Van) 2nd pp. 253-270. New York : Nostrand Reinhold Company.

Kataoka, E., Tokue, C., Yamashita,T. and Tanimura, W. 1987. Amino acids, organic acids, fatty acids, trimethylamine and methional in improved fish sauce. Japanese J. of Nutrition. 45(2) : 67-76.

Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowell, V.R., Janda, W.M., Sommers, H.M. and Winn, C.W. 1988. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Philddelphia: J.B. Lippincott Company.

Kwon, D.Y. and Rhee, J.S. 1986. A Simple and Rapid Colorimetric Method for Determination of Free Fatty Acids for Lipase Assay. JAOCS. 63(1) : 89-92.

Lalitha, K.V., Nair, A.L., Surendran, P.K. and Gopakumar, K. 1994. Microbial and biochemical changes during the fish sauce fermentation. Research Contributions Presented at The Ninth Session of the Indo Pacific Fishery

Commission Working Party on Fish Technology and Marketing. Cochin, India. 7-9 March 1994. pp. 147-157.

Lee, C.-H. 1989. Fish Fermentation Technology-A Review. *In* Post-Harvest Technology, Preservation and Quality of Fish in Southeast Asia. P.J.A. Reilly, R.W.H. Parry and L.E. Barile (eds.) Bangkok, Thailand. November 13-17, 1989. pp. 1-13.

Lee, Y.Z., Simpson, B.K. and Haard, N.F. 1982. Supplemented of squid fermentation with proteolytic enzymes. J. Food Biochem. 6 : 127-134.

Mabesa, R.C., Lagtapon, S.C. and Villaralvo, M.J.A. 1986. Characterization and identification of some halophilic bacteria in spoiled fish sauce. Philipp. J. Sci. 115(4) : 329-334.

Martin, R.E., Flick, G.J., Hebard, C.E. and Ward, D.R. 1982. Chemistry & Biochemistry of Marine Food Products. Connecticut : The Avi Publishing Company, Inc.

McGraw-Hill. 1987. Encyclopedia of Science & Technology. 6th ed. New York : McGraw-Hill, Inc.

McIver, R.C., Brooks, R.I. and Reineccius, G.A. 1982. Flavor of Fermented Fish Sauce. J. Agric. Food Chem. 30 : 1017-1.20.

Meinke, W.W., Rahman, M.A. and Mattil, K.F. 1972. Autolysis as factor in the production of protein isolates from whole fish. J. Food Sci. 38 : 864-866.

Nambudiry, D.D. 1980. Mixed culture fermentation as a predominant biological phenomenon in the production of fermented fish products. Proceedings of the Symposium on Coastal Aquaculture. India. 12-18 January 1980. pp. 1474 1476.

Ohhira, I., Jeong, C.M., Miyamoto, T. and Kataoka, K. 1990. Isolation and identification of lactic acid bacteria from traditional fermented sauce in Southeast Asia. Japanese J. of Dairy and Food Sci. 39(5) : A175-A182.

Olcott, H.S. 1962. Oxidation of fish lipids. *In* International Symposium on Fish in Nutrition. (eds. E. Heen and R. Kreuzer). pp. 112-116. London : Fishing News (Books) Ltd.

Orejana, F.M. and Liston, J. 1981. Agents of Proteolysis and Its Inhibition in Patis (Fish Sauce) Fermentation. J. Food Sci. 47 (1) : 198-203, 209.

Owens, J.D. and Mendoza, L.S. 1985. Enzymically hydrolysed and bacterially fermented fishery products. J. Food Technol. 20 : 273-293.

Phadatare, S.U., Deshpande, V.V. and Srinivasan, M.C. 1993. High activity alkaline protease from *Condiobolus caronatus* (NCL 86.8.20). Enzyme and Microbial Technology. 15 : 72-76.

Phithakpol, B., Varanyanond, W. and Reungmaneepaitoon, S. 1994. Thai traditional fermented products. 5^{th} Asean Food Conference. Kuala Lumpur, Malaysia. 26-29 July 1994. pp. 84-86.

Potter, N.N. 1986. Fermentations and Other uses of Microorganisms. *In* Food science. pp. 328-347. New York : Van Nostrand Reinhold.

Prescott, S.C. and Dunn, C.G. 1959. Industrial microbiology. 3^{rd}. New York : McGraw-Hill Book Company, Inc.

Raksakulthai, N. and Haard, N.F. 1992a. Correlation Between the Concentration of Peptides and Amino Acids and the Flavor of Fish Sauce. Asean Food J. 7(2) : 86-90.

Raksakulthai, N. and Haard, N.F. 1992b. Fish sauce from Capelin (*Mallotus villosus*) Contribution of Cathepsin C to the Fermentation. Asean Food J. 7 (3) : 147-151.

Rao, S. 1967. Fish processing in the Indo-pacific Area. Indo pacific Fisheries Council Regional Studies. No.4. FAO Regional Office for Asia and Far East., Bangkok, Thailand.

Reynolds, T.M. 1965. Chemistry of nonenzymatic browning. Adv. Food Res. 13 : 167-283.

Saisithi, P. 1987a. Microbiology of Thai Traditional Fermented Fish. Microbial Utili of Re Re. 5 : 306-312.

Saisithi, P. 1987b. Traditional Fermented Fish Products with special reference to Thai Products. Asean Food J. 3(1) : 3-10.

Saisithi, P., Kasemsarn, B., Liston, J. and Dollar, A.M. 1966. Microbiology and Chemistry of Fermented Fish . J. Food Sci. 31 : 105-110.

Sanceda, N.G., Kurata, T. and Arakawa, N. 1984. Fraction and Identification of Volatile Compounds in Patis, a Philippine Fish Sauce. Agric. Biol. Chem. 48(12) : 3047-3052.

Sanceda, N.G., Kurata, T. and Arakawa, N. 1986. Study on the Volatile Compounds of Fish Sauces-Shottsuru, Nampla and Noucman. Agric. Biol. Chem. 50(5) : 1201-1208.

Sanceda, N.G., Kurata, T. and Arakawa, N. 1990. Overall Quality and Sensory Acceptance of a Lysine-Fortified Fish Sauce. J. Food Sci. 55(4) : 983-988.

Sanceda, N.G., Kurata, T. and Arakawa, N. 1996. Accelerated Fermentation Process for the Manufacture of Fish Sauce Using Histidine. J. Food Sci. 61(1) : 220-220, 225.

Sanchez, P.C. and Klitsaneephaiboon, M. 1983. Traditional fish sauce (Patis) fermentation in the Philippines. Phil. Agr. 66(3) : 251-269.

Sangjindavon, M. and Vinitnantharat, S. 1984. Study on the bacteria isolated from the early stage of fish sauce. Thai Fish. Gaz. 37(1) : 69-72.

Seibert, G. and Schmilt, A. 1965. Fish tissue enzymes and their role in the deteriovative changes in fish. *In* International Symposium on the Technology of Fish Utilization. (ed. Krenzer, R.). pp. 47-52. London : Fishing News (Books) Ltd.

Shahidi, F. and Botta, J.R. 1994. Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality. London : Blackie Academic and Profressional, an imprint of Chapman & Hall.

Simpson, B.K., Simpson, M.V. and Haard, N.F. 1990. Properties of Trypsin from the Pyloric Caeca of Atlantic Cod (*Gadus morhua*). J. Food Sci. 55(4) : 959-961, 971.

Stansby, M.E. 1962. Fish in Nutrition. London : Fishing News (Books) Ltd.

Stansby, M.E. 1990. Fish oils in Nutrition. New York : An AVI Book.

Stefansson, G. and Steingrimsdottir, U. 1989. Application of enzymes for fish processing in Iceland-Present and Future Aspects. Advances in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased Profitability. Fisheries Technological conference and Seafood Biotechnology Workshop. August 27 to September 1, 1989 pp. 237-250.

Sulistiyani and Heruwati, E.S. 1991. Identification and Purification of proteolytic enzymes from fish pyloric caeca. Papers Presented at The Eighth Session of The Indo Pacific Fishery commission Working Party in Fish Technology and Marketing, Yogjakata, Indonesia, 24-27 September 1991. pp. 320-325.

Syaefudin, K., Budianto, S. and Sunarya NCQC. 1991. Papers Presented at The Eighth Session of The Indo Pacific Fishery commission Working Party in Fish Technology and Marketing, Yogjakata, Indonesia, 24-27 September 1991. pp. 136-141.

Thongthai, C., McGenity, T.J., Suntinanalert, P. and Grant, W.D. 1992. Isolation and characterization of an extremely halophilic archaebacterium from traditionally fermented Thai fish sauce (nam pla). Lett. Appl. Microbiol. 14 (3) : 111-114.

Thongthai, C. and Siriwongpairat, M. 1978. Changes in the viable bacterial population, pH and chloride concentration during the first month of Nam Pla (fish sauce) fermentation. J. Sci. Soc. Thailand. 4(2) : 73-78.

Thongthai, C. and Suntinanalert, P. 1991. Halophiles in Thai fish sauce (Num Pla). *In* General and Applied Aspects of Halophilic Microorgannism. (ed. F. Rodriguez-Valera) pp. 381-388. New York : Plenum Press.

Troller, J.A. and Christian, J.H.B. 1978. Water Activity and Food. New York : Academic Press Inc.

Tsuchida, O., Yamagata, Y., Ishizuka, T., Arai, T., Yamada, J.I., Takeuchi, M. and Ichishima, E. 1986. An Alkaline Proteinase of an Alkalophilic *Bacillus* sp. Curr. Micro. 14:7-12.

Van Veen, A.G. 1965. Fermented and Dried Seafood Products in Southeast Asia. *In* Fish as Food. (ed.L.G. Borgstrom). Vol. 3. pp. 227-250. New York : Acedemic Press, Inc.

Voskresensky, N.A. 1965. Salting of herring. *In* Fish as Food. (ed. Bargstrom, L.G.) Vol. 3, pp. 107-131. New York : Academic Press.

Weiser, H.H., Mountney, G.J. and Gould, W.A. 1976. Sugar and Salt in Food Preservation. *In* Practical Food Microbiology and Technology. pp. 243-254. Connecticut : The Avi Publishing Company, Inc.

Yamashita, M., Fujii, T. and Konagaya, S. 1991. Proteases in the fish sauce "shottsuru" mash in fermentation. Bull. Natl. Res. Inst. Fish. Sci. Japan Chuosuiken Kenpo. 2 : 25-31.

Zung, C.T. and K'sev, D. 1993. Influence of technological factors on autohydrolysis in fish. Khranitelna-Promishlenost. 42(5/6) : 38-40.

ภาคผนวก ก
อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ อาหารทดสอบเชื้อ และวิธีการทดสอบ

1. Nutrient agar : NA

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 7±0.2 เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือดและฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2 Tryptic soya agar : TSA

Bacto-tryptone	17	กรัม
Bacto-soytone	3	กรัม
Bacto-dextrose	2.5	กรัม
K_2HPO_4	2.5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 7±0.2 เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือดและฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3 BHI agar (Brain Heart Infusion agar)

Extracts of brian and heart and peptones	27.5	กรัม
D(+)-glucose	2	กรัม
NaCl	5	กรัม
Na_2HPO_4	2.5	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 7±0.2 เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือดและฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

4. MRS (De, Man Rogosa and Sharpe)

Bacto Proteose Peptone No.3	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
Ammonium Citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium Sulfate	0.1	กรัม
Manganese Sulfate	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 55 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 950 มิลลิลิตร ปรับพีเอช ให้เป็น 6.5±0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือด และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

5. APT (All Purpose Tween)

Yeast extract	7.5	กรัม
Tryptone	12.5	กรัม
Dextrose	10.0	กรัม
Sodium citrate	5.0	กรัม
Thiamine Hydrochloride	0.001	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate	5.0	กรัม

Manganese chloride	0.14	กรัม
Magnesium sulfate	0.8	กรัม
Ferrous sulfate	0.04	กรัม
Sorbitan Monooleate Complex	0.2	กรัม

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 46.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 950 มิลลิลิตร ปรับพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.7±0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เติมน้ำจนครบ 1 ลิตรแล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

6. Plate count agar

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่นประมาณ 950 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 7±0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือดแล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

7. Tributyrin agar

Peptone from meat	2.5	กรัม
Peptone from casein	2.5	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Agar	12.0	กรัม
Glycerol tributyrate	10.0	มิลลิลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 กรัม เติมน้ำประมาณ 950 มิลลิลิตร ปรับพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.5±0.1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เติมneutral tributyrin (Merck Cat, No. 1958) 10 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วย

หม้อนึ่งความดัน 121 องศาเซลเซียส 15 นาที นำมาเขย่าจนอุณหภูมิของอาหารลดลงเหลือ 50 องศาเซลเซียสจึงนำไปเทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

8. CA (Tsuchida, *et. al.*, 1986)

casein	10	กรัม
meat extract	10	กรัม
polypeptone	10	กรัม
$NaHCO_3$	10	กรัม

ละลายสารทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น ทำให้สวนผสมละลายด้วยการต้มและปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ๆละ 100 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

9.อาหาร Hugh and Leifson's O-F medium

Peptone	2	กรัม
K_2HPO_4	0.3	กรัม
NaCl	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
Agar	3	กรัม
Bromthymol blue1.6%	4	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น ปรับpH ให้เป็น 7 เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือด และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส 10 นาที

วิธีการ

1 ปลูกเชื้อลงในอาหารชนิดละ 2 หลอดโดยการแทงตรงลงไป(Stab)

2 หลอดหนึ่งทำให้อยู่ในสภาพขาดอากาศ โดยการเทพาราฟินเหลวปิดผิวหน้าหนาประมาณ 1 เซนติเมตร

3 บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง.

ผลการทดลอง

อาหารเปลี่ยนสีจากเขียวเป็นเหลืองเฉพาะหลอดที่ไม่ได้เทพาราฟินแสดงว่าเป็น oxidation แต่ถ้าเกิดการเปลี่ยนสีทั้ง 2 หลอดแสดงว่าเป็น fermentation

10. อาหาร Christensen's urea medium

Peptone	1	กรัม
Glucose	1	กรัม
KH_2PO_4	2	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	20	กรัม
Phenol red ความเข้มข้นร้อยละ 0.04	20	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้เป็น 7±0.2 เติมน้ำจนครบ 1 ลิตรนำไปต้มให้เดือด และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ทิ้งให้เย็นประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติมสารละลายยูเรียที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 ที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองปริมาตร 10 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน ปิเปตอาหารใส่หลอดทดสอบที่ฆ่าเชื้อแล้ว เอียงอาหาร(Slant)

วิธีการ

1 ปลูกเชื้อที่มีอายุ 18-24 ชม.ลงให้เป็นจุด (point inoculum) บนอาหาร ในปริมาณน้อย

2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และตรวจผลทุกๆวันเป็นเวลา 7 วัน

ผลการทดลอง

ผลบวก : อาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีบานเย็น

ผลลบ : อาหารไม่เปลี่ยนสี

11 อาหารทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำตาล	10	กรัม
Bromthymol blue 1.6%	4	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันปรับพีเอชให้เป็น 7.0±0.2 เทใส่หลอดที่ใส่หลอดดักแก๊สไว้ ในการเตรียมน้ำตาลแต่ละชนิด ควรเตรียมหลอดทดสอบที่ใส่หลอดดักแก๊สไว้ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจึงเตรียมอาหารใส่หลอดแล้วฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วรีบยกออกมาแช่น้ำเย็น

วิธีการ

1 ปลูกเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหาร

2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชม.

ผลการทดลอง

ผลบวก:

1 อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แต่ไม่มีแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่าเชื้อไม่สร้างแก๊สแต่หมักคาร์โบไฮเดรตได้

2 อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และมีแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่าเชื้อหมักคาร์โบไฮเดรตแล้วได้กรดและแก๊ส

ผลลบ : อาหารไม่เปลี่ยนสี แสดงว่าเชื้อหมักคาร์โบไฮเดรตไม่ได้

12.การทดสอบการต่อต้าน Novobiocin

อาหาร

Tryptic soy agar

สารเคมี

Novobiocin dist (difco NB 30)	30 microgram

วิธีการ

1 ปลูกเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหาร Tryptic soy broth 1 colony

2 บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง

3 ถ่ายเชื้อจากอาหารเหลวปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อ(Tryptic soy agar) โดยวิธีการเกลี่ยเชื้อ (spread plate)

4 วางแผ่น Novobiocin ลงบนจานเพาะเชื้อ

5 บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

ผลการทดลอง

Resistant: clear zone ≤ 17 มิลลิเมตร

Susceptible: clear zone ≥ 22 มิลลิเมตร

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

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

1.1 ชั่งตัวอย่างบูดูซึ่งปั่นละเอียด 10 กรัมใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร

1.2 เติมน้ำกลั่นที่มีพีเอชเท่ากับ 7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer

1.3วัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยพีเอชมิเตอร์

2.การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติก (A.O.A.C., 1990)

2.1 สารเคมี

สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล

2.2 วิธีการ

2.2.1 ชั่งตัวอย่างซึ่งปั่นละเอียดแล้วหนัก 5 กรัมใส่ในบีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer

2.2.2 ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนมีค่าพีเอชเท่ากับ 8.3

2.3 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติก} = \frac{\text{โซเดียมไฮดรอกไซด์(มล.)} \times N \times 90.09 \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง(กรัม)} \times 1000}$$

3. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (A.O.A.C., 1990)

3.1 สารเคมี

ปิโตรเลียมอีเทอร์

3.2 วิธีการ

3.2.1 อบขวดกลมสำหรับหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร ในตู้อบอากาศร้อนที่ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำออกจากตู้ใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนัก

3.2.2 กระทำเช่นข้อ 3.2.1 ซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3.2.3 ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนลงบนกระดาษกรอง ถ้าเป็นตัวอย่างชนิดที่มีไขมันมากให้ชั่ง 1-2 กรัม แต่ถ้าเป็นชนิดที่มีไขมันน้อยให้ชั่ง 3-5 กรัม ห่อให้มิดชิดแล้วใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยสำลีเพื่อให้สารทำละลายกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ

3.2.4 เติมตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ประมาณ 150 มิลลิลิตรลงในขวดหาไขมันแล้ววางบนเตา

3.2.5 ประกอบชุดสกัดไขมัน (ซอคเลตและเครื่องควบแน่น) พร้อมเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นและเปิดสวิทซ์ให้ความร้อน

3.2.6 สกัดไขมันนาน 14 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที

3.2.7 เมื่อครบ 14 ชั่วโมงแล้ว นำหลอดตัวอย่างออกจากซอคเลต และกลั่นเก็บสารทำละลายจนเหลือสารละลายในขวดกลมเพียงเล็กน้อย

3.2.8 อบขวดหาไขมันในตู้อบอากาศร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสจนแห้ง นำออกจากตู้ใส่ไว้ในโถดูดความร้อนปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนัก

3.2.9 กระทำเช่นข้อ 3.2.8 ซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3.3 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน(ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักขวดรวมไขมัน - น้ำหนักขวด} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

4. การหาปริมาณความชื้น (A.O.A.C., 1990)

4.1 วิธีการ

4.1.1 อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบอากาศร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำออกจากตู้ใส่ไว้ในโถดูดความร้อนปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนัก

4.1.2 กระทำเช่นข้อ 4.1.1 ซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

4.1.3 ชั่งตัวอย่างที่ต้องการหาความชื้นให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1-3 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว นำไปอบในตู้อบอากาศร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่างนั้น จากนั้นนำกลับไปเข้าตู้อบอีก และกระทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

4.2 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}}$$

5. การวิเคราะห์อัตราการย่อยสลายโปรตีน (Beddows, *et al.*, 1976)

5.1 สารเคมี

5.1.1 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

5.1.2 ฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 37

5.2 วิธีการ

5.2.1 ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 40 มิลลิลิตร

5.2.2 ไตไตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอลจนได้พีเอช 7

5.2.3 เติมฟอร์มาลดีไฮด์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

5.2.4 ไตไตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอลจนได้พีเอช 8.5

5.3 การคำนวณ

$$\text{อัตราการย่อยสลาย} = \frac{V \times N \times 10}{W}$$

N คือความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มอล)

V คือปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ (มิลลิลิตร)

W คือน้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

6. การวิเคราะห์ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total volatile base nitrogen) และปริมาณไตรเมทธิลามีน (trimethylamine nitrogen) (Hasegawa, 1987)

6.1 สารเคมี

6.1.1 วาสลีน

6.1.2 สารละลาย mixed indicator : ละลาย bromocresol green 0.01 กรัมและ methy red 0.02 กรัมในเอทธานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร

6.1.3 สารละลายวงแหวนชั้นใน (Inner ring) :ละลายกรดบอร์ริก (boric acid) 10 กรัมในเอทธานอลปริมาตร 200 มิลลิลิตร เติม สารละลาย mixed indicator ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

6.1.4 สารละลายอิ่มตัวของโปตัสเซียมคาร์บอเนต เตรียมโดยละลายโปตัสเซียมคาร์บอเนต 60 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดประมาณ 10 นาที

ทำให้เย็นแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง

6.1.5 สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid : TCA, CCl_3COOH) เข้มข้นร้อยละ 4

6.1.6 สารละลายมาตรฐานกรดเกลือเข้มข้น 0.02 นอร์มอล

6.1.7 สารละลาย neutralized formaldehyde ความเข้มข้นร้อยละ 10 เตรียมโดยละลาย $MgCO_3$ 10 กรัมในฟอร์มาลิน แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 กรองด้วยกระดาษกรอง นำส่วนที่กรองได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 3 เท่า

6.2 การสกัดตัวอย่าง

6.2.1 ชั่งตัวอย่างหนัก 2 กรัมเติม TCA ความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร บดผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

6.2.2 กรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman No. 41) หรือเหวี่ยงแยกตัวอย่างที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

6.2.3 ถ้าไม่ได้วิเคราะห์ค่าทันทีให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ก. ปริมาณด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB-N)

6.3 วิธีการ

6.3.1 ทาวาสลีนที่ขอบจานคอนเวย์ (conway unit)

6.3.2 ปิเปตสารละลาย inner ring ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในวงแหวนชั้นใน

6.3.3 ปิเปตสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในวงแหวนชั้นนอก

6.3.4 ปิดฝาจานคอนเวย์แล้วเอียงจานคอนเวย์

6.3.5 ปิเปตสารละลาย K_2CO_3 อิ่มตัวปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในวงแหวนชั้นนอกแล้วปิดจานคอนเวย์

6.3.6 เอียงจานคอนเวย์เบาๆให้สารละลายในวงแหวนชั้นนอกผสมเข้าด้วยกัน

6.3.7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

6.3.8 ไตเตรตสารละลาย inner ring ด้วยสารละลายมาตรฐานกรดเกลือเข้มข้น 0.02 นอร์มอลจนสีเขียวเปลี่ยนเป็นสีชมพู

6.3.9 ในการทำ blank ให้ใช้ TCA ความเข้มข้นร้อยละ 4 แทนสารสกัดจากตัวอย่าง

ข. ปริมาณไตรเมทธิลามีน (TMA-N)

6.4 วิธีการ

6.4.1 ทาวาสลีนที่ขอบจานคอนเวย์ (conway unit)

6.4.2 ปิเปตสารละลาย inner ring ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในวงแหวนชั้นใน

6.4.3 ปิเปตสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในวงแหวนชั้นนอก

6.4.4 ปิเปตฟอร์มาดีไฮด์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในวงแหวนชั้นนอกปิดฝาจานคอนเวย์แล้วเอียงจานคอนเวย์

6.4.5 ปิเปตสารละลาย K_2CO_3 อิ่มตัวปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในวงแหวนชั้นนอกแล้วปิดจานคอนเวย์

6.4.6 เอียงจานคอนเวย์เบาๆให้สารละลายในวงแหวนชั้นนอกผสมเข้าด้วยกัน

6.4.7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

6.4.8 ไตเตรตสารละลาย inner ring ด้วยสารละลายมาตรฐานกรดเกลือเข้มข้น 0.02 นอร์มอลจนสีเขียวเปลี่ยนเป็นสีชมพู

6.4.9 ในการทำ blank ให้ใช้ TCA ความเข้มข้นร้อยละ 4 แทนสารสกัดจากตัวอย่าง

6.5 การคำนวณ

$$\text{TMA และ TVB} = \frac{N \times 14 \times (A-B) \times V \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

(มิลลิกรัม/100 กรัม)

N คือความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดเกลือที่ใช้ไตเตรต (นอร์มอล)

A คือปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดเกลือที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดเกลือที่ใช้ไตเตรต blank (มิลลิลิตร)

V คือปริมาตรรวมของกรดไตรคลอโรอะซิติกที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

7. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน (A.O.A.C., 1984)

ปริมาณไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน (กรัมต่อกิโลกรัม) เป็นผลต่างระหว่างปริมาณไนโตรเจนในรูปฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde nitrogen) กับปริมาณไนโตรเจนในรูปแอมโมนิคัล (Ammonical nitrogen)

ก. ปริมาณไนโตรเจนในรูปฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde nitrogen)

7.1. สารเคมี

7.1.1 สารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ ที่ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 9 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล

7.1.2 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล

7.1.3 สารละลายซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

7.2 วิธีการ

7.2.1 ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 0.3 กรัมใส่ในบีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer

7.2.2 วัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยพีเอชมิเตอร์ ปรับให้เป็นกลางโดยใช้สารบละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล

7.2.3 ปิเปตสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ที่ปรับความเป็นกรด-ด่างเป็น 9 แล้วลงไป 10 มิลลิลิตร

7.2.4 ไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนได้จุดยุติที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9

7.3 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนในรูปฟอร์มาลดีไฮด์ (กรัม/กิโลกรัม)} = \frac{14 \times N \times V}{W}$$

N คือความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มอล)

V คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (มิลลิลิตร)

W คือน้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

ข. ปริมาณไนโตรเจนในรูปแอมโมนิคัล (Ammonical nitrogen)

7.4 สารเคมี

7.4.1 สารแมกนีเซียมออกไซด์ (MgO)

7.4.2 สารละลายกรดบอร์ริกเข้มข้นร้อยละ 4

7.4.3 mixed indicator

ก. ชั่งเมทธิลเรด 0.125 กรัมและเมทธิลลีนบูล 0.082 กรัม ละลายในเอทธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ข. ชั่งโบรโมกลีซอลกรีน 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

ค. ผสมสารละลายข้อ 1 และข้อ 2 ในอัตรส่วนข้อ 1 ต่อข้อ 2 เท่ากับ 5:1

7.4.4 สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

7.5 วิธีการ

7.5.1 ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 4 กรัมใส่ในขวดกลั่น

7.5.2 เติมสารแมกนีเซียมออกไซด์ 3 กรัม และน้ำกลั่นปริมารต 20 มิลลิลิตร

7.5.3 กลั่น โดยรองรับสารละลายที่กลั่นได้ด้วยสารละลายกรดบอร์ริกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จนได้ปริมาตร 150 มิลลิลิตร

7.6 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนในรูปแอมโมนิคัล (กรัม/กิโลกรัม)} = \frac{14 \times N \times V}{W}$$

N คือความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก (นอร์มอล)

V คือปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก (มิลลิลิตร)

W คือน้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

8.ปริมาณเกลือ (A.O.AC, 1990)

8.1 สารเคมี

8.1.1 สารละลายมาตรฐานซิลเวอร์ไนเตรตความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

8.1.2 สารละลายแอมโมเนียมไทโอไซยาเนต (NH_4SCN) เข้มข้น 0.1 นอร์มอล

8.1.3 เฟอร์ริกอินดิเคเตอร์

8.1.4 กรดไนตริกเข้มข้น

8.2 วิธีการ

8.2.1 ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 0.5 กรัมใส่ในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร

8.2.2 เติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต 0.1 นอร์มอล 35 มิลลิลิตร

8.2.3 เติมกรดไนตริกเข้มข้นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ย่อยบนเตาที่ระดับความร้อนน้อยในตู้ควัน นาน 15 นาที ทำให้เย็น

8.2.4 เติมน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเฟอร์ริกอินดิเคเตอร์ 5 มิลลิลิตร

8.2.5 ไตรเตรตด้วยสารละลายแอมโมเนียมไทโอไซยาเนตจนได้สีน้ำตาลคงตัว

8.3 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเกลือ (ร้อยละ)} = \frac{0.0058 \times (a-b) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

a คือปริมาตรของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตที่เติม (มิลลิลิตร)

b คือปริมาตรของสารละลายแอมโมเนียมไทโอไซยาเนตที่ใช้ไตเตรต (มิลลิลิตร)

9 ปริมาณโปรตีน (A.O.A.C., 1990)

9.1. สารเคมี

9.1.1 กรดซัลฟูริก

9.1.2 สารช่วยเร่งการย่อย (catalyst) ประกอบด้วย $CuSO_4$ 1 ส่วนและ K_2SO_4 10 ส่วน

9.1.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40

9.1.4 กรดบอริเข้มข้นร้อยละ 4

9.1.5 mixed indicator

ก. ชั่งเมทธิลเรด 0.125 กรัมและเมทธิลลีนบูล 0.082 กรัม ละลายในเอทธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ข. ชั่งโบรโมกลีซอลกรีน 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

ค. ผสมสารละลายข้อ 1 และข้อ 2 ในอัตรส่วนข้อ 1 ต่อข้อ 2 เท่ากับ 5:1

9.2. วิธีการ

9.2.1 การย่อยตัวอย่าง

ก. ชั่งตัวอย่าง 0.2-0.5 กรัม หรือ 5-10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดย่อย

ข. ใส่สารช่วยเร่งการย่อย 1-2 กรัม

ค. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร สวมและเปิดเครื่องจับไอกรด

ง. ย่อยที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส 30 นาที เมื่อครบเวลาเพิ่มอุณหภูมิในการย่อยเป็น 400 องศาเซลเซียส 60 นาที

จ. เมื่อครบเวลาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

9.2.2 การกลั่นตัวอย่าง

ก. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 60 มิลลิลิตรลงในหลอดกลั่น เขย่าเบาๆเพื่อผสมกรด

ข. ใส่หลอดเข้ากับเครื่องกลั่น เปิดน้ำหล่อเย็นในอัตราการไหลประมาณ 3-4 ลิตรต่อนาที

ค. เปิดไอน้ำ เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 ลงไปช้าๆจนได้สารละลายสีดำ รองรับสารที่ได้จากการกลั่นโดยใช้กรดบอร์ริกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีmixed indicator 2-3 หยด

ง. กลั่นให้ได้ condensate ประมาณ 100-150 มิลลิลิตร

จ. ไตเตรตกับสารละลายมาตรฐานกรดเกลือเข้มข้นหรือกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.02 หรือ 0.1 นอร์มอล

9.3 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด} = \frac{\text{ปริมาณกรด (มล.)} \times \text{นอร์มอลลิตี้} \times 14}{\text{น้ำหนักหรือปริมาณตัวอย่าง}}$$

10 การวิเคราะห์ปริมาณ ชนิดและองค์ประกอบของกรดไขมัน

10.1 อุปกรณ์

10.1.1 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี บริษัท Shimadzu รุ่น GC-14A

10.1.2 เครื่องวัดสัญญาณ (Detector) แบบ Flame Ionization Detector (FID)

10.1.3 คอลัมน์แบบ Capillary column CBP20-M25-025

10.2 สารเคมี

10.2.1 แก๊สพาได้แก่ ไนโตรเจน

10.2.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมธานอลเข้มข้น 0.5 นอร์มอล

10.2.3 เมธานอล

10.2.4 สารละลายโบรอนไตรฟลูออไรด์ร้อยละ 12 ในเมธานอล

10.2.5 ไอโซออกเทน

10.2.6 สารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว

10.2.7 สารละลายมาตรฐานเม่ทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน

10.3 วิธีการ

10.3.1 เตรียมสารละลายเมทิลเอสเทอร์

ชั่งตัวอย่างหนัก 0.25 กรัมใส่ในหลอดฝาเกลียว เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมธานอล 1.5 มิลลิลิตร เป่าด้วยไนโตรเจนบริสุทธิ์ แล้วปิดฝาหลอดให้แน่น นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 5 นาที เติมโบรอนไตรฟลูออไรด์ในเมธานอล 2 มิลลิลิตร เป่าด้วยไนโตรเจนบริสุทธิ์แล้วปิดฝาหลอดให้แน่นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นจึงทำให้เย็นลงทันที เติมไอโซออกเทน 1 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดให้แน่นเขย่านาน 30 วินาที เติมสารละลายเกลืออิ่มตัว 5 มิลลิลิตรทันที เป่าด้วยไนโตรเจนบริสุทธิ์ปิดฝาหลอดให้แน่นเขย่าให้ผสมเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยก

ชั้น ดูดเอาส่วนไอโซออกเทนซึ่งอยู่ชั้นบนใส่ในหลอดแล้วสกัดซ้ำอีกครั้งโดยใช้ไอโซออกเทน 1 มิลลิลิตร เขย่าและดูดส่วนบนไปรวมกับครั้งแรก เป่าด้วยไนโตรเจนบริสุทธิ์ปิดฝาให้แน่น และเก็บไว้ในหลอดฝาเกลียว

10.3.2 การวิเคราะห์กรดไขมันโดยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี

ฉีดสารละลายผสมในเมธิลเอสเทอร์ของกรดไขมันปริมาตร 1 ไมโครลิตร เพื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมัน โดยมีสภาวะการทำงานของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟีดังนี้คือ

สภาวะของเครื่องดีเทคเตอร์

- Injection port 250 องศาเซลเซียส
- Detector 270 องศาเซลเซียส
- split ratio 1:15

Oven temperature profile

- อุณหภูมิเริ่มต้น 170 องศาเซลเซียส
- Initial hold time 0 นาที
- program rate 1 องศาเซลเซียสต่อนาที
- อุณหภูมิสุดท้าย 225 องศาเซลเซียส
- Final hold time 0 นาที

11. การวิเคราะห์ปริมาณ ชนิดและองค์ประกอบของกรดอะมิโน

11.1 อุปกรณ์

11.1.1 เครื่อง HPLC บริษัท Shimadzu รุ่น LC-6A

11.1.2 เครื่องวัดสัญญาณแบบ Fluorescence detector (FLD-6A, RF-535 EX 348 nm Em 450 nm)

11.1.3 คอลัมน์ Shim-pack ISC-07/s 1504 Na

11.2 สารเคมี

11.2.1 สารละลายพา (Mobile phase) ประกอบด้วย

A : สารละลายโซเดียมซิเตรตที่มีเอธานอลร้อยละ 7 ความเข้มข้น 0.2 นอร์มอล ที่มีพีเอช 3.2

B : สารละลายผสมของโซเดียมซิเตรต 0.6 นอร์มอลและกรดบอร์ริก 0.2 นอร์มอล ที่มีพีเอช 10

C : สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 นอร์มอล

11.2.2 สารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยา (Reaction solution) ประกอบด้วย

A : สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 0.4 มิลลิลิตรในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร

B : o-phthalaldehyde 0.8 กรัมในเอธานอล 14 มิลลิลิตร

โพลีออกซีเอทธิลลีน เลอริล อีเทอร์ (Brij-35) 0.4 กรัม

n-acetyl-L-cysteine 1.0 กรัม นำสารทั้งหมดเติมลงในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร

11.2.3 สารละลายอัลคาไลน์บัฟเฟอร์ ประกอบด้วย สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.384 โมลาร์ กรดบอร์ริก 0.216 โมลาร์และสารละลายโปแทสเซียมซัลเฟต 0.108 โมลาร์

11.2.4 สารละลายเจือจางตัวอย่างพีเอช 2.2 ประกอบด้วย สารละลายโซเดียมซิเตรต 0.2 นอร์มอล กรดเปอร์คลอริกร้อยละ 1.5 และกรด n-Caprylic ร้อยละ 0.01 (ปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริก)

12.3 วิธีการ

ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนใส่ในหลอดทดลอง เติมกรดไฮโดรคลอริก 6.0 นอร์มอล 3-4 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดให้แน่นนำไปลดความดัน จากนั้นจึงนำตัวอย่างไปย่อยที่ 110 องศาเซลเซียส 22-24 ชั่วโมง เติมสารละลายเจือจางตัวอย่างปริมาตรที่แน่นอนลงในตัวอย่าง นำไปกรองแล้วจึงนำตัวอย่างไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยมีสภาวะในการทำงานของเครื่องดังนี้คือ

- อัตราการไหล (Flow rate) 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที
- อุณหภูมิของคอลัมน์ 55 องศาเซลเซียส
- อัตราการไหลของสารละลาย (Flow rate solution) 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที
- อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา 55 องศาเซลเซียส

12. การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

12.1 สารเคมี

12.1.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และมีเกลือร้อยละ 10 ที่มีพีเอชเท่ากับตัวอย่างบูดู

12.1.2 stop buffer ประกอบด้วย กรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid) 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) 0.22 โมลาร์ และกรดอะซิติก (acetic acid) 0.33 โมลาร์

12.1.3 สารละลายเคซีนความเข้มข้นร้อยละ 1 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์

12.2 วิธีการ

12.2.1 ปิเปตเอนไซม์ที่เจือจางใน 0.05 โมลาร์ ของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ ตามพีเอชของตัวอย่างบูดู 0.3 มิลลิลิตร

12.2.2 เติมสารละลายเคซีนที่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร

12.2.3 บ่มเอนไซมที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ. เป็นเวลา 15 นาที

12.2.4 หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม stop buffer ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

12.2.5 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณไทโรซีนจากกราฟมาตรฐานไทโรซีน (ภาคผนวก ง)

12.3 การคำนวณ

กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส = มิลลิกรัมของไทโรซีน x 1000 x จำนวนเท่าการเจือจางของสารละลายเอนไซม์
(ยูนิตต่อมิลลิลิตร) นน.โมเลกุลของไทโรซีน x ระยะเวลาที่บ่ม x ปริมาตรสารละลายเอนไซม์
(กรัมต่อโมล) (นาที) (มิลลิลิตร)

13. การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

13.1 สารเคมี

13.1.1 สารละลาย cupric acetate เข้มข้นร้อยละ 5 เตรียมโดย ละลาย cupric acetate ในน้ำกลั่น แล้วกรองแยกส่วนที่ไม่ละลายออก ปรับพีเอชเป็น 6.1 โดยใช้ pyridine

13.1.2 ไอโซออกเทน (isocotane)

13.1.3 กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 นอร์มอล

13.1.4 น้ำมันมะกอก (บริษัทวิทยาศรม)

13.1.5 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และมีเกลือร้อยละ 10 ที่มีพีเอชเท่ากับตัวอย่างบูดู

13.2 วิธีการ

13.2.1 ชั่งน้ำมันมะกอกให้ได้น้ำหนักแน่นอน 0.2 กรัม

13.2.2 เติมไอโซออกเทน 2 มิลลิลิตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร

13.2.3 เขย่าที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 120 นาที

13.2.4 หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มอล 0.2 มิลลิลิตร รีบผสมให้เข้ากัน

13.2.5 ดูดเอาส่วนใส (ชั้นบน) มา 1 มิลลิลิตรแล้วเติม cupric acetate 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

13.2.6 ดูดเอาส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานที่ใช้กรดโอลิอิกเป็นตัวอย่าง (ภาคผนวก ง)

13.3 การคำนวณ

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มให้ได้กรดไขมันอิสระในรูปของกรดโอลิอิกปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

14. การย้อมแกรม

14.1 สารเคมี

14.1.1 คริสตัลไวโอเลต (crystal violet) ประกอบด้วยคริสตัลไวโอเลต 2 กรัม ละลายในเอทธานอล (95%) 20 มิลลิลิตร และ ammonium oxalate (1%) 80 มิลลิลิตร

14.1.2 สารละลายไอโอดีน (iodine) ประกอบด้วย Iodine 2 กรัม Potassium iodine 2 กรัม ละลายาในน้ำ 300 มิลลิลิตร

14.1.3 สารละลายซาฟรานีน (safranin) ประกอบด้วย Safranin 2.5 กรัม ละลายในเอทธานอล (95%) 100 มิลลิลิตร และน้ำ 100 มิลลิลิตร

14.1.4 เอทธานอลร้อยละ 95

14.2 วิธีการ

14.2.1 เกลี่ยเชื้อบนสไลด์ที่แห้งและสะอาด ปล่อยให้แห้งและยึดเชื้อด้วยเปลวไฟ

14.2.2 หยดสารละลายคริสตัลไวโอเลตลงบนรอยเกลี่ยทิ้งไว้ 1 นาที ล้างน้ำ 2-3 วินาที แล้วเทน้ำออกให้หมด

14.2.3 หยดสารละลายไอโอดีนทิ้งไว้ 1 นาทีแล้วล้างออกด้วยน้ำ

14.2.4 หยดเอทธานอลร้อยละ 95 เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อล้างสีน้ำเงินออกจนจางเกือบหมด แล้วล้างออกด้วยน้ำ

14.2.5 หยดสารละลายซาฟรานีน 15 วินาที ล้างออกด้วยน้ำ ซับให้แห้ง นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

15. การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase)

15.1 สารเคมี

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ร้อยละ 3

15.2 วิธีการ

15.2.1 ปลูกเชื้อลงในอาหาร Nutrient agar ที่เอียง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

15.2.2 เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 มิลลิลิตร

15.3 ผลการทดลอง

ผลบวก: เกิดฟองแก๊ส

ผลลบ: ไม่เกิดฟองแก๊ส

16. ปริมาณของแข็งที่ละลายได้และละลายไม่ได้ทั้งหมด

16.1 วิธีการ

16.1.1 อบกระดาษกรองเบอร์ 41 และถ้วยหาความชื้นในตู้อบอากาศร้อนที่ 105 องศาเซลเซียสและชั่งให้ได้น้ำหนักแน่นอน

16.1.2 ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 1 กรัม เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

16.1.3 กรองผ่านกระดาษกรอง

16.1.4 ล้างกากบนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งๆ ละ 10 มิลลิลิตร

16.1.5 นำของเหลวในถ้วยหาความชื้นและกระดาษกรองไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส แล้วชั่งหาน้ำหนักของถ้วยและกระดาษกรองให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน

16.2 การคำนวณ

$$\text{ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด(\%)} = \frac{\text{น้ำหนักของถ้วยหาความชื้นที่เพิ่มขึ้น (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

$$\text{ของแข็งที่ละลายไม่ได้ทั้งหมด (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักของกระดาษกรองที่เพิ่มขึ้น (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

ภาคผนวก ค

แบบทดสอบดมแบบพรรณนาเชิงปริมาณ

ชื่อผู้ทดสอบดม________________________________วันที่__________เวลา_________

คำอธิบาย กรุณาดมตัวอย่างจากซ้ายไปขวา แล้วขีดเส้นตั้งฉากกับแนวนอนของแต่ละปัจจัยที่ตรงกับความรู้สึกของท่านพร้อมทั้งเขียนรหัสกำกับ

คำแนะนำ กรุณาดมเปลือกส้มแล้วทิ้งไว้ประมาณ 30 วินาที ก่อนดมตัวอย่างและระหว่างการดมตัวอย่างทุกครั้ง และกรุณาปิดฝาตัวอย่างทุกครั้งหลังจากดมแล้ว

กลิ่นบูดู

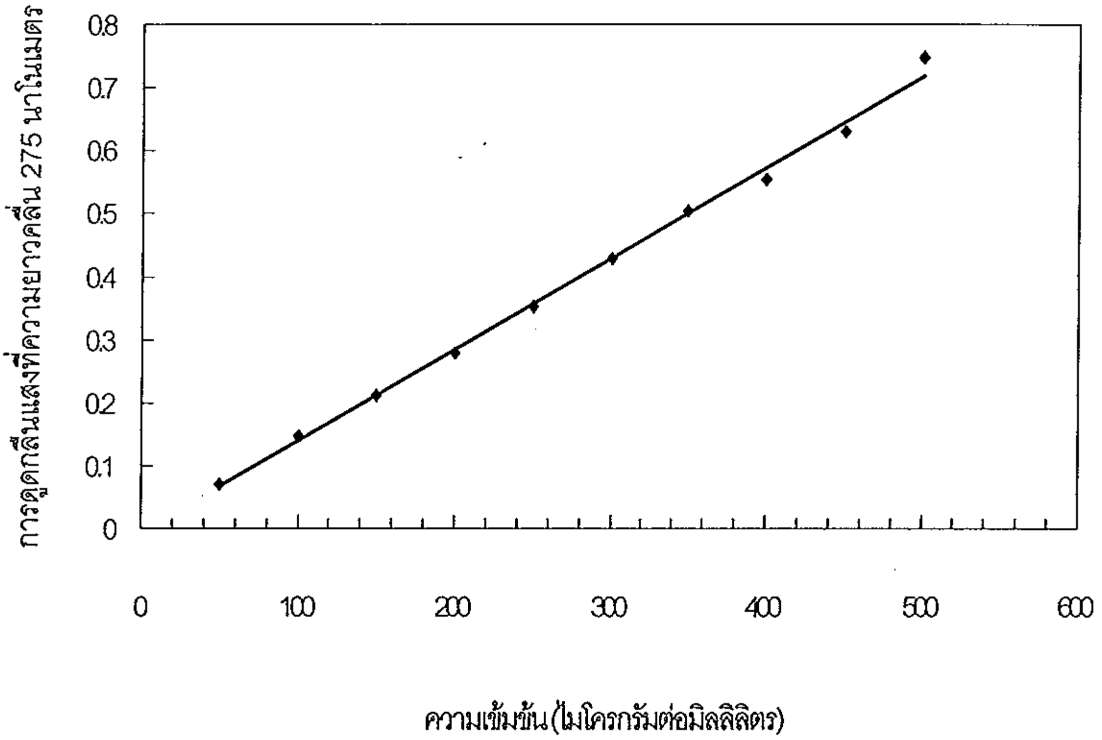
น้อย ปานกลาง มาก

วิจารณ์และข้อเสนอแนะ____

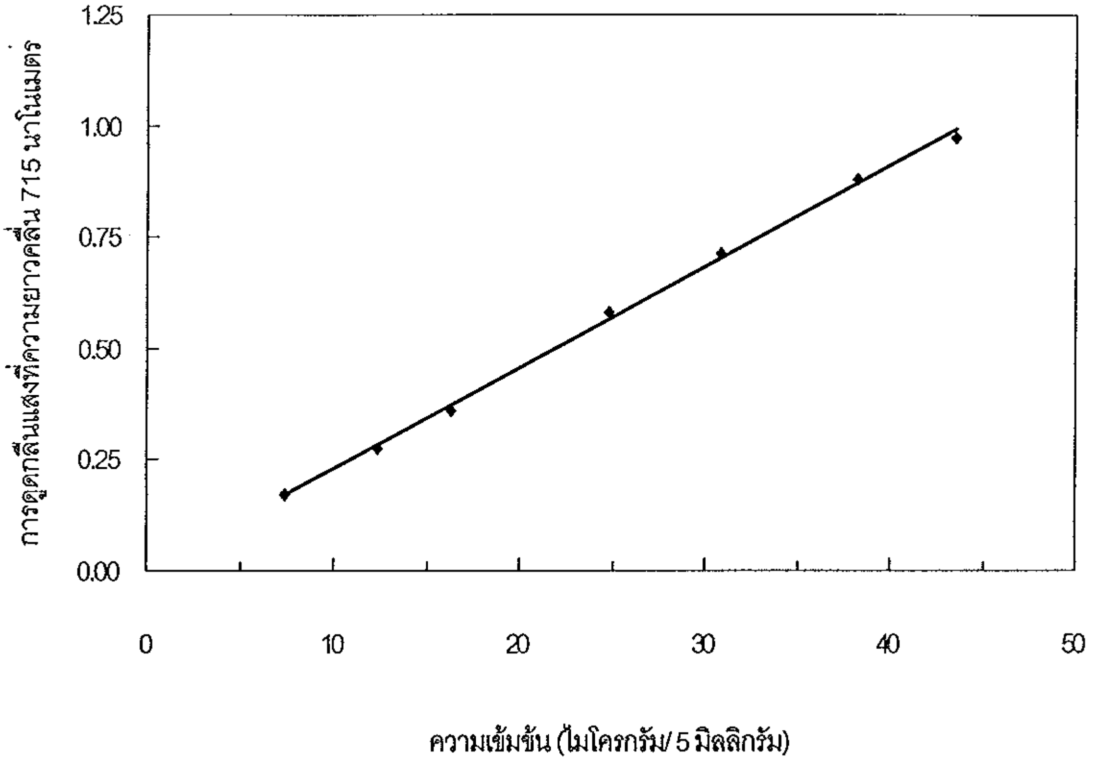
____

ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐาน



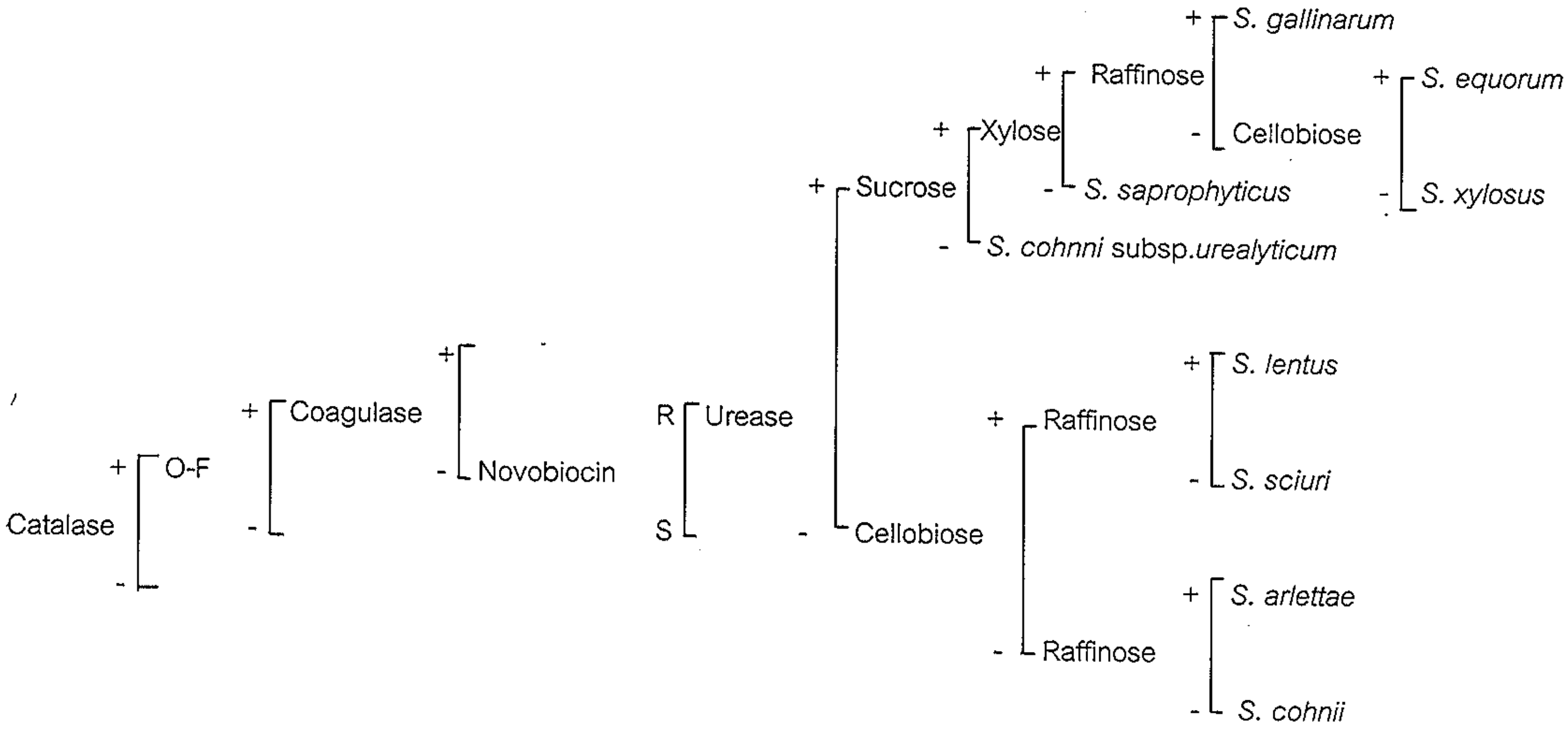
ภาพภาคผนวก ง1 กราฟมาตรฐานไทโรซีนที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร



ภาพภาคผนวก ง2 กราฟมาตรฐานของกรดโอลิอิกในสารละลายไอโซออกเทนที่ความยาวคลื่น 715 นาโนเมตร ด้วยวิธี cupric acetate

ภาคผนวก จ

แผนภูมิแสดงการเทียบเคียงแบคทีเรีย


Catalase
+
-
O-F
+
-
Coagulase
+
-
Novobiocin
R
S
Urease
+
-
Sucrose
+
-
Xylose
+
-
Raffinose
+
-
S. gallinarum
Cellobiose
+
-
S. equorum
S. xylosus
S. saprophyticus
S. cohnni subsp.urealyticum
Cellobiose
+
-
Raffinose
S. lentus
S. sciuri
Raffinose
S. arlettae
S. cohnii

แผนภูมิ แสดงการเทียบเคียงแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม

ที่มา : ดัดแปลงจาก Koneman และคณะ (1988) และ Balows และคณะ (1992)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวนงลักษณ์ เกียรติตันสกุล
วัน เดือน ปี เกิด	24 ธันวาคม 2516

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	**ชื่อสถาบัน**	**ปีที่สำเร็จการศึกษา**
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการประมง)	สถาบันเทคโลยีราชมงคล	2538

ทุนการศึกษา(ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนการศึกษาจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ