ส่วนที่ 2 **รายงานฉบับสมบูรณ์(ฉบับจริง)**

โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2552

โครงการวิจัยรหัส ว-ท(ซ)2.8.52

การพัฒนาเครื่องชูรสจากหัวและเปลือกกุ้ง

Development of Shrimp Flavor from Shrimp Waste

วรรณวิบูลย์ กาญจนกูญชร[(1)] สุดสาย ตรีวานิช[1)]
Wumwiboon Garnjanagoonchorn[(1)] Sudsai Treevanich[1)]

รายงานฉบับสมบูรณ์(ฉบับจริง)
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2552

โครงการวิจัยรหัส ว-ท(ช)2.8.52
การพัฒนาเครื่องชูรสจากหัวและเปลือกกุ้ง
Development of Shrimp Flavor from Shrimp Waste

วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร และ สุดสายตรีวานิช

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
คณะอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทคัดย่อ

วัตถุดิบหัวกุ้งขาวสด มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 1.24 และความชื้นร้อยละ 74.62 pH เท่ากับ 7.16 ในหัวกุ้งมีจุลินทรีย์ที่เจริญและย่อยไคตินได้โดยพบ 2.0 x10^4 cfu/g สภาวะการย่อยสลายหัวกุ้งที่เลือกได้คือใช้กรดซิตริก หรือ กรดแล็กติก ความเข้มข้น 0.5 M เป็นเวลา 0 6 12 ชั่วโมงที่ 28-30 องศาเซลเซียส พบการย่อยสลายหัวกุ้งได้ดีคือจากหัวกุ้งบด 75 กรัมเมื่อย่อยสลายนาน 6 ชั่วโมงจะเหลือกากที่กรองออกต่ำกว่า 20 กรัมโดยในของเหลวจากการย่อยสลาย ประกอบด้วยปริมาณของแข็งที่ละลายได้(TSS) อยู่ในช่วง 4-5 กรัมต่อหัวกุ้ง 100 กรัม และ 6-7 กรัมต่อหัวกุ้ง 100 กรัม สำหรับกรดแล็กติกและกรดซิตริกตามลำดับ ที่เวลาย่อยสลายนาน 6 ชั่วโมงการหมักในกรดทั้งสองชนิดจะได้ของเหลวที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนอยู่ในช่วงเท่ากับร้อยละ 1.73-1.83 และ 1.06-1.37 กรัมต่อหัวกุ้ง 100 กรัมตามลำดับ นอกจากนั้นพบว่าระหว่างย่อยสลายตัวอย่างที่ใช้กรดแล็กติก 0.1 M มีค่า pH สูงกว่า 4.5 และยังคงพบจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไคตินและเป็นจุลินทรีย์ที่ย่อยไคตินได้แต่มีปริมาณต่ำกว่าที่พบในวัตถุดิบหัวกุ้งมาก พบกลูโคซามีนเล็กน้อยในส่วนใสจากการย่อยหัวกุ้ง โดยมีปริมาณ 0.009-0.013 mg/ml ของเหลว เมื่อนำไฮโดรไลเสตมาปรับพีเอชเท่ากับ 5.75 และทำให้เข้มข้นจะได้สารให้กลิ่นรสกุ้งที่มีโปรตีนและเปปไทด์ขนาดโมเลกุล 25 และ 6-10 kDa มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนจำเป็นครบทั้ง 9 ชนิดโดยมี Lys และ Leu สูง และพบกรดอะมิโนไม่จำเป็น 8 ชนิดโดยมี Glu, Asp และ Arg สูง ผลิตภัณฑ์แต่งกลิ่นรสกุ้งบรรจุขวดขณะร้อนแล้วนำไปผ่านการให้ความร้อนจนอุณหภูมิเท่ากับ 80°C เป็นเวลา 10 นาที และทำเย็นก่อนเก็บที่ 5-10°C จะเก็บได้ 6 เดือน ผลิตภัณฑ์กลิ่นรสกุ้งที่ได้ นำมาเป็นเครื่องปรุงรสอาหารที่ต้องการกลิ่นรสกุ้งเช่น ข้าวผัด ผัดผัก ต้มยำ หรือทาบนขนมปังกรอบและอบจะได้ขนมขบเคี้ยวกลิ่นรสกุ้ง

คำสำคัญ การย่อยหัวกุ้งด้วยกรด การไฮโดรไลส์ด้วยกรดอินทรีย์ ผลิตภัณฑ์แต่งกลิ่นรสกุ้ง

---

(1) *ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร*

Food Science and Technology Dept. Faculty of Agro-Industry

ABSTRACT

Shrimp heads of *Litopenaeus vannamei* were used as raw material. Shrimp heads consisted of 1.24% total nitrogen (TN) and 74.62% moisture with pH 7.16 and contained $2x10^4$ cfu/g of bacteria that can digest chitin. The conditions for acid hydrolysis of shrimp head were selected which were citric and lactic acid 0.5 M with 0,6,12 hr incubation at 28-30° C. After acid hydrolysis for 6 hr 75 g of ground shrimp head were digested leaving only less than 20g residue. The extract of shrimp head consisted of TSS in the range of 4-5 g/100g shrimp head and 6-7 g/100g shrimp head for lactic and citric acid hydrolysis respectively. At 6 hr of acid hydrolysis the extract from both type of acids composed of TN 1.73-1.83 g/100g shrimp head and nonprotein nitrogen(NPN) 1.06-1.37 g/100g shrimp head. Only the treatment that used 0.1 M lactic acid has pH higher than 4.5. Following the addition of acid the amount of bacteria that can digest chitin were reduced largely. Glucosamine content was 0.009-0.013 mg/ml which is very low. Hydrolysate was neutralized then concentrated to get shrimp flavor paste. Shrimp flavor paste contained proteins and peptides of 25 and 6-10 kDa. It composed of 9 essential amino acids with high Lys and Leu, and 8 non-essential amino acids with high Glu, Asp and Arg. The concentrated product packed in bottle and heated to 80°C for 10 min can be kept at 5-10°C for 6 months. The concentrated product from acid hydrolysis extract showed strong shrimp odor and flavor .

Key words: acid hydrolysis of shrimp head, organic acid hydrolysis, shrimp flavorant

บทนำ

หัวกุ้งมีสารอาหารที่มีประโยชน์ทั้งโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน แร่ธาตุ และมีเอนไซม์และจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของกุ้ง มีรายงานการใช้น้ำต้มกุ้ง หัวกุ้ง ที่เป็นของเหลือจากโรงงานแปรรูปโดยผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสต ซึ่งส่วนใหญ่ใช้วิธีการย่อยด้วยเอนไซม์ มีการใช้กรดไฮโดรคลอริคเพื่อย่อยเปลือกกุ้งได้เป็นกลูโคซามีน การย่อยสลายหัวกุ้งด้วยกรดอินทรีย์จะช่วยควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย ขณะเดียวกันทำให้เกิดการย่อยโปรตีน และไคติน ได้เปปไทด์ กรดอะมิโน และ อาจได้กลูโคซามีน ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นรส และมีผลดีต่อสุขภาพ รวมทั้งมีการละลายของแร่ธาตุ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค นำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ ทำให้สามารถเพิ่มมูลค่าหัวกุ้งที่เหลือจากกระบวนการผลิตจำนวนมากได้

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสภาวะการผลิตเครื่องซูรสจากหัวกุ้งที่มีเปลือก
2. ศึกษาบทบาทของจุลินทรีย์ ในวัตถุดิบและขั้นตอนการผลิตเครื่องซูรสจากหัวกุ้งพร้อมเปลือก
3. ศึกษาการเกิดสารที่ได้จากการย่อยโปรตีน ไขมัน ไคติน ในขั้นตอนการหมัก
4. ศึกษาคุณภาพผลิตภัณฑ์เครื่องซูรสจากหัวกุ้งที่มีเปลือกที่ผลิตได้ ทั้งทางเคมี กายภาพ และจุลชีววิทยา

บทตรวจเอกสาร

หัวและเปลือกกุ้ง เป็นส่วนเหลือจากการแปรรูปกุ้ง มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ โปรตีน 42% เถ้า 29-36.8% และไคติน 40% (Naczk and Shahidi, 1990) ซึ่งมีการนำมาทำผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นทางภาคใต้ของไทย คือมันกุ้ง ซึ่งมีลักษณะคล้ายผลิตภัณฑ์ น้ำปู ของภาคเหนือ โดยกระบวนการผลิตคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ นำปูนา ตำและกรองเอาส่วนของเหลว หมักไว้ 8-24 ชั่วโมง จะได้น้ำปู นำไปเคี่ยวจนน้ำแห้งเกิดเป็นครีมข้นสีน้ำตาลดำ (นิตยา, 2547) ทั้งน้ำปูและมันกุ้ง ใช้ผสมเป็นเครื่องซูรสอาหาร เช่น ทำข้าวผัด น้ำพริก ส้มตำ ยำหน่อไม้ แกงหน่อไม้ เป็นต้น นิตยา(2547) รายงานว่า ในน้ำปู 100 กรัม มี กรด อะมิโนไม่น้อยกว่า 17 ชนิด โดยมีกรดกลูตามิกมากที่สุด รองลงมาคือไกลซีน และอะลานีน ประกอบด้วยแร่ธาตุที่สำคัญคือ เหล็ก โซเดียม แคลเซียม และ สังกะสี สำหรับผลิตภัณฑ์มันกุ้งได้จากการนำมันของกุ้งมาเคี่ยว หรือนำส่วนหัวและเปลือกกุ้งมาเคี่ยวจนได้มันกุ้ง ตักเศษหัวและเปลือกออก เคี่ยวต่อจนแห้งหนียว (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, 2547) มันกุ้งใช้ทำข้าวผัด ก๋วยเตี๋ยวผัดไท น้ำพริกมันกุ้ง เป็นต้น Binsan et al.(2008) รายงานว่ามันกุ้งประกอบด้วยกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงชนิด EPA และDHA เท่ากับ 4.31g/100g และ 7.07 g/100g ตามลำดับ สารละลายน้ำของมันกุ้งเข้มข้น 1000 พีพีเอ็มแสดงสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี การนำโปรตีนในเนื้อสัตว์มาย่อยสลายจะได้เปปไทด์และกรดอะมิโน อาจใช้กระบวนการย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ ซึ่งในหัวกุ้งมีเอนไซม์ ซึ่งสามารถย่อยสลายส่วนประกอบของหัวกุ้ง พวงชมพู (2545) รายงานการสกัดเอนไซม์โปรติเอสจาก

เฮพาโทแพนเครียสของกุ้งกุลาดำ และนำเอนไซม์มาย่อยโปรตีนในเปลือกกุ้งอบแห้ง พบว่าการย่อยที่ 40°ซ 5 ชั่วโมง จะย่อยโปรตีนออกจากเปลือกกุ้งได้ถึง 32% นอกจากนั้น พบว่ามีการผลิตกลูโคซามีนจากไคตินในเปลือกกุ้ง โดย Mojarrad *et al*. (2007) ใช้กรดเกลือย่อยไคตินจากเปลือกกุ้ง และรายงานสภาวะที่เหมาะสมของการย่อย ซึ่งกลูโคซามีนเป็นสารที่ช่วยการทำงานของข้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ลดการอักเสบของโรคข้ออักเสบ และเป็นสารที่ให้รสหวาน (US Patent 5998173) จุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Aeromonas* sp., *Streptomyces* WAK-83 strain สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยไคตินเป็นกลูโคซามีน (US Patent 4686185) ดังนั้นการย่อยหัวและเปลือกกุ้งโดยใช้กรดร่วมกับเอนไซม์และจุลินทรีย์บางชนิด จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารโมเลกุลใหญ่ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน ไคติน ทำให้ได้สารโมเลกุลเล็กที่ให้กลิ่นรส ให้คุณค่าทางอาหาร หรืออาจได้สารที่มีคุณสมบัติในการบรรเทาอาการของโรคข้ออักเสบ เช่นกลูโคซามีน ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้บริโภค โดยการรับประทานกลูโคซามีนซัลเฟต 1500 มก/วัน บรรเทาอาการข้ออักเสบได้ (www.pharmacy.mahidol.ac.th) นอกจากนี้ San-Lang และ Jau-Ren (2001) ได้คัดแยกเชื้อกลุ่ม *Bacillus* จากเปลือกกุ้ง และพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ไคติเนส ซึ่งย่อยไคตินได้

Pan (1989) รายงานองค์ประกอบโดยประมาณของหัวกุ้งขาว ชนิด *P. fissurus* ว่าประกอบด้วยความชื้นร้อยละ 72.2 ไขมันร้อยละ 3.4 โปรตีนร้อยละ 13.1 เถ้าร้อยละ 7.9 และมีรายงานว่าพบเอนไซม์ย่อยโปรตีนหลายชนิดในส่วนหัวกุ้งชนิดต่างๆ เอนไซม์ที่พบได้แก่ carboxypeptidaseA และ B, trypsin, chymotrypsin, cathepsin และ collagenase เป็นต้น (Lee *et al.,* 1984; Nip *et al.,* 1985; Yeh and Tseng, 1985 อ้างตาม Pan, 1989) ซึ่งในประเทศไต้หวันมีการผลิตสารให้กลิ่นรสจากหัวกุ้งโดยวิธีย่อยด้วยเอนไซม์ แล้วนำไปทำให้เข้มข้นก่อนทำแห้งโดยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer) ซึ่งพบว่าผงแห้งที่ได้ประกอบด้วยกรดอะมิโนอิสระประมาณร้อยละ 9-12 ชนิดที่พบมากคือ taurine, arginine, glysine และ proline และมีรายงานการผลิตซอสกุ้งโดยหมักหัวกุ้งด้วยเกลือร้อยละ 30 เติมหัวเชื้อ *Bacillus* sp. L12 หมัก 5 วัน (Pan,1989) นอกจากนั้นยังมีรายงานการย่อยหัวกุ้ง โดยใช้จุลินทรีย์ร่วมกับโมลาส (Bueno-Solano *et al*.,2008)สำหรับในประเทศไทยมีการศึกษาการใช้ประโยชน์จากของเหลือการแปรรูปกุ้งโดยนักวิจัยดังนี้

พัชรี (2536) ศึกษาวัตถุดิบที่ใช้เตรียมสารปรุงแต่งกลิ่นรสกุ้งระหว่างหัวกุ้งกับเปลือกกุ้ง พบว่าหัวกุ้งให้สารละลายที่สกัดได้มีปริมาณไนโตรเจนสูงกว่าเมื่อใช้เปลือกกุ้ง หัวกุ้งที่เหมาะสมในการใช้เตรียมควรมีความสดสูง การสกัดด้วยเอนไซม์จะให้สารสกัดที่มีคุณค่าทางอาหารดีกว่าการสกัดด้วยกรดหรือด่างหรือน้ำ การสกัดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนจะให้สารสกัดที่ให้กลิ่นกุ้งแรงที่สุด ส่วนการสกัดด้วยกรดเกลือจะให้สารสกัดที่ให้กลิ่นกุ้งอ่อนที่สุด สภาวะที่ดีที่สุดในการย่อยหัวกุ้งคือใช้เอนไซม์โบรมิเลน 0.25% ที่ pH 6 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง ใช้ NaCl เป็นสารดูดซับกลิ่น เมื่อนำมาทำข้าวเกรียบโดยเปรียบเทียบกับกลิ่นรสอ้างอิงทางการค้า (Riber & Son และ Nestle) พบว่ากลิ่นรสอ้างอิงให้ข้าวเกรียบที่มีกลิ่นรสดีกว่า

เพียงใจ (2537) ได้ศึกษาองค์ประกอบที่สำคัญในเศษเหลือจากกุ้งกุลาดำพบว่าเศษเหลือจากการแปรรูปกุ้งกุลาดำประกอบด้วย ส่วนหัว 38% ส่วนเปลือก 7% ในส่วนของเสียมีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ โปรตีน 63.8% ไขมัน 1.73% ส่วนที่เหลือเป็นไคตินและไคโตแซน การนำเศษเหลือมาใช้ประโยชน์สามารถทำได้โดยการใช้เอ็นไซม์โปรติเอส การสกัดด้วยตัวทำละลาย และการย่อยสลายด้วยกรดและด่าง หัวกุ้งดิบจะให้

โปรตีนจากการย่อยด้วยเอ็นไซม์นิวเทรสสูงกว่าหัวกุ้งต้ม ปริมาณที่เหมาะสมของเอ็นไซม์ที่ใช้คือ 9% สารที่สกัดได้ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลักคือ กรดแอสปาร์ติก กรดกลูตามิก ไลซีนและอลานีน ซึ่งสามารถนำมาผสมเป็นน้ำปลา น้ำซอส และโปรตีนผงได้ ปริมาณน้ำมันที่สกัดได้ด้วยเฮกเซนจากส่วนกากมีผลผลิตประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกากที่เหลือจากการย่อยโปรตีนและสกัดน้ำมันสามารถนำไปสกัดไคตินและไคโตแซนผลผลิตของไคตินและไคโตแซนที่ได้ประมาณ 2.48 และ 2.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

รวิพิมพ์ และ ประพันธ์ (2538) ได้ทำการศึกษาการใช้ประโยชน์จากน้ำต้มกุ้ง จากโรงงานกุ้งต้มแช่แข็ง นำมาสกัดเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสชนิดผง โดยเริ่มจากผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากน้ำต้มกุ้ง โดยใช้เอนไซม์นิวเทรสเพื่อไฮโดรไลซ์โปรตีน ศึกษาสภาวะในการไฮโดรไลซ์โปรตีน พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และใช้เวลา 30 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต ซึ่งได้ค่าอะมิโนไนโตรเจนสูงที่สุด เท่ากับ 3.5 มิลลิกรัมไนโตรเจน/มิลลิลิตร เมื่อนำไปทำเป็นผง จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นกุ้งชัดเจน ดูดความชื้นง่าย มีโปรตีนประมาณ 52 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 6.5 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 25 เปอร์เซ็นต์ และ คาร์โบไฮเดรต 13เปอร์เซ็นต์

สราวุธ (2544) ผลิตซอสกุ้งจากน้ำต้มกุ้ง โดยใช้เอนไซม์นิวเตรสความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซนต์ย่อยน้ำต้มกุ้งที่ทำให้เข้มข้น ย่อยนาน 90 นาที นำไปทำซอสลักษณะคล้ายซอสหอยนางรมที่ขายทั่วไป โดยบรรจุขวดและพาสเจอร์ไรส์ที่ 80 องศาเซลเซียส 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้องได้นานกว่า 2 เดือน โดยไม่มีการเจริญของยีสต์และรา และปริมาณแบกทีเรียไม่เกินเกณฑ์กำหนดของซอสหอยนางรม จรินทร์ (2544) ย่อยหัวกุ้งด้วยเอนไซม์โบรมิเลน ร่วมกับฟลาโวไซม์ ได้โปรตีนไฮโดรไลเสตนำมาทำเป็นผงแห้งโดยผสมมัลโตเดกซตริน แล้วนำผงรสกุ้งไปผสมส่วนผสมอื่นๆทำเป็นซุปก้อน พบว่าผงรสกุ้งมีกรดอะมิโน แอสปาร์ติก อาร์จินีน กลูตามิก ไกลซีนมากกว่ากรดอะมิโนอื่นๆ

วันวิสา (2550) ศึกษากิจกรรมการต้านออกซิเดชันของมันกุ้งจากหัวกุ้งขาวที่เตรียมวิธีต่างกัน คือ 1 ต้มหัวกุ้งในน้ำ 100 องศาเซลเซียส 15 นาที กรองและผสมรวมกับส่วนสกัดจากกากหัวกุ้งบด 2 หัวกุ้งสด บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส 10 นาที เติมฟลาโวไซม์ย่อยนาน 90 นาที ให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียสเพื่อทำลายกิจกรรมเอนไซม์ กรองส่วนใสไปใช้ 3 หัวกุ้งสุกเติมน้ำ บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส 10 นาทีเติมฟลาโวไซม์ย่อยนาน 90 นาที ให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียสเพื่อทำลายกิจกรรมเอนไซม์ กรองส่วนใสและผสมรวมกับส่วนสกัดจากกากหัวกุ้งบดนำไปใช้ โดยสารสกัดจากทั้งสามวิธีนำไปทำให้เข้มข้น แล้วผสมน้ำตาล เกลือทำเป็นมันกุ้ง สารสกัดจากกุ้งที่ทำจากวิธีที่ 1 แสดงฤทธิ์เป็นสารต้านออกซิเดชันสูงสุด

การใช้ประโยชน์จากหัวและเปลือกกุ้งผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสต ทำได้ดังนี้

1. การย่อยหัวและเปลือกด้วยกรด หรือ เบส
2. การย่อยด้วยเอนไซม์ โปรติเอส

การย่อยสลายโปรตีนด้วยกรดหรือเบส เป็นวิธีการที่มีต้นทุนการผลิตต่ำ แต่ก็มีข้อจำกัดในด้านการนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหาร และยังเป็นวิธีที่ยากต่อการควบคุมการย่อยสลาย ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่คงที่ การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสเป็นการย่อยสลายโปรตีนที่บริเวณพันธะเปปไทด์ โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสทำให้ได้ผลิตภัณฑ์คือ เปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ การย่อยสลายโปรตีนโดย

การใช้เอนไซม์โปรติเอสจากแหล่งต่างๆ เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง โดยจะทำให้เกิดสารเปปไทด์ในปริมาณสูง เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสจะมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น มีความคงทนต่อความร้อน ตัวกระตุ้น และตัวยับยั้ง จึงสามารถเลือกใช้ชนิดของเอนไซม์และสภาวะในการย่อยสลายได้ตามความเหมาะสม อีกทั้งสภาวะในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์นั้นไม่รุนแรงทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีคุณภาพดี และมีสมบัติเชิงหน้าที่ตามที่ต้องการ เมื่อเปรียบเทียบโปรตีนปลาไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายทั้งสองวิธีพบว่า การย่อยด้วยเอนไซม์สามารถกำหนดขอบเขตการย่อยและขนาดของเปปไทด์ที่เกิดขึ้นได้ (Adler-Nissen, 1986) ในขณะที่การย่อยด้วยสารเคมีนั้นจะไม่สามารถระบุถึงการแตกตัวของพันธะเปปไทด์และขนาดของเปปไทด์ได้ กรมประมง รายงานการทำซอสหัวกุ้งโดยใช้ไฮโดรไลเสตที่ผลิตโดยเอนไซม์และแบกทีเรียชนิดแลกติกแอซิด (กรมประมง, 2554) การย่อยโปรตีนด้วยกรด และเบสแก่ เช่น กรดเกลือ กรดซัลฟูริค และโซเดียมหรือโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ จะทำให้สูญเสียกรดอะมิโนบางชนิด แต่เกิดการไฮโดรไลส์ได้เร็ว (Kim *et al*., 2013) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาการย่อยหัวกุ้งด้วย กรดอินทรีย์สองชนิด เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์แต่งกลิ่นรสกุ้งสำหรับใช้ในอาหารและผลิตภัณฑ์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1.วัตถุดิบ

หัวกุ้ง (*Litopenaeus vannamei*) จากตลาดสะพานใหม่

2.สารเคมี

2.1. กรดแล็กติก กรดซิตริก

2.2. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด สารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน กลูโคซามีน และ ปริมาณไนโตรเจนในรูปด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด

3.เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ยี่ห้อ Memmert

3.2 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer, Shimadzu model UV-1201)

3.3 เครื่องสับผสม (Bowl Chopper) ยี่ห้อ Robot coupe รุ่น R2 จาก บริษัท ซีแอลฟู้ดส์ จก

3.4 เครื่องชั่งชนิดละเอียด (Analytical balance) รุ่น Analytical Plus ยี่ห้อ Ohaus

3.5 เครื่องชั่งชนิดหยาบ (Coarse balance)รุ่น Precision Advanced ยี่ห้อ Ohaus

3.6 เครื่องกวนส่วนผสม (stirrer) รุ่น 51450-series ยี่ห้อ Cole Parmar

3.7 อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking water bath) รุ่น BS-11 จากบริษัท Jeio Tech Limited

3.8 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น Microcomputer pH-vision 6071 จากบริษัท Jenco Electronics Limited

3.9 เครื่องเผาเถ้า (Muffle furnace) รุ่น Tactical 308 ยี่ห้อ Gallenkamp

3.10 ชุดวิเคราะห์โปรตีน ยี่ห้อ BÜCHI Labortechnik AG

3.11 ไมโครปิเปต ยี่ห้อ Pipette Man จากบริษัท Gilson S.A.S.

3.12 Desktop centrifuge, Hermle Z 200A

วิธีการ

1. การเตรียมวัตถุดิบ

เนื่องจากมีการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวเพื่อแปรรูปส่งออกไปขายต่างประเทศจำนวนมากและมีขายเพื่อการบริโภคในประเทศด้วยจึงเลือกใช้หัวกุ้งขาวในการศึกษา

นำหัวกุ้งขาวบรรจุในถุงพลาสติกบรรจุในลังโฟมที่มีน้ำแข็ง ขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายในเวลาไม่นานกว่า 2 ชั่วโมงนำหัวกุ้งมาสับจนละเอียดด้วยเครื่องสับผสม (Bowl Chopper) เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วไปทำการทดลองต่อไป

2. ศึกษาคุณภาพเริ่มต้นของหัวกุ้ง

คัดเลือกหัวกุ้ง โดยประเมินจากลักษณะลูกตาที่เต่ง ไม่หดเหี่ยว สีสดใสแวววาว และไม่มีกลิ่นเหม็น นำหัวกุ้งที่บดละเอียดมาวิเคราะห์คุณภาพด้านเคมี โดยวัด pH และ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ความชื้น (AOAC, 2000) และปริมาณไนโตรเจนในรูปด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB-N) ตามวิธีการที่จะกล่าวถึงในข้อ 3 วิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนตามวิธีในข้อ 3.1.4 และวิเคราะห์คุณภาพด้านจุลชีววิทยา โดยวิเคราะห์ปริมาณ TPC (cfu/g) ปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมไคติน (Ronald, 2010) และนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏเคลียร์โซนเพื่อเก็บบันทึกเป็นข้อมูลวัตถุดิบ

3. การคัดเลือกสภาวะในการย่อยสลายหัวกุ้ง

สภาวะการย่อยสลายที่ศึกษาแบ่งเป็น 4 ปัจจัยคือ

1 ชนิดกรด ได้แก่ กรดซิตริก(C) และ กรดแล็กติก (L)

2 ความเข้มข้นกรด มี 2 ระดับคือ 0.1 และ 0.5 M

3 อุณหภูมิมี 2 ระดับคือ อุณหภูมิห้อง (RT, 28-30°C) และ 50°C

4 เวลาในการหมัก 5 ระดับ คือ 0 6 9 12 และ 24 ชั่วโมงโดยจัดการทดลองดังนี้

C-0.1-RT, C-0.5-RT, C-0.1-50C, C-0.5-50C, L-0.1-RT, L-0.5-RT, L-0.1-50C, L-0.5-50C ทำการย่อยสลาย ที่เวลาต่างๆกันคือ 0 6 9 12 และ 24 ชั่วโมง ทำการย่อยดังนี้

3.1 เตรียมส่วนผสมในการย่อยสลายโดย ชั่งหัวกุ้งขาวที่บดละเอียดแล้ว 75 กรัม ผสมสารละลายกรด 200 มิลลิลิตร หรือเท่ากับอัตราส่วน 3 : 8 w/v กำหนดปัจจัยการย่อยคือ ชนิดกรด ความเข้มข้นของกรด อุณหภูมิการย่อยสลาย เวลาในการย่อย โดยทำการย่อยที่สองอุณหภูมิคืออุณหภูมิห้อง โดยกวนผสมตลอดเวลา ด้วยเครื่อง hot plate stirrer โดยใช้ magnetic bar และที่ 50 °C ใช้เครื่อง shaking water bath ที่ควบคุมการเขย่าด้วยความเร็ว 100 rpm เมื่อครบเวลาในการย่อยสลายตามกำหนดแล้ว นำไปกรองด้วยตะแกรงกรอง และทำการบันทึกน้ำหนักกากและส่วนใสที่กรองผ่านตะแกรง นำส่วนใสไปวิเคราะห์ค่าต่างๆ คือ

3.1.1 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) โดยการนำส่วนใสที่ได้จากการกรองครั้งแรกของตัวอย่างไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3500g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสด้านบนมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 สารละลายที่กรองได้นำมาหาความชื้นตามวิธี AOAC (2000) แล้วคำนวณปริมาณของแข็งคิดเป็นจำนวนกรัมของของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดที่อยู่ในสารสกัด ต่อ หัวกุ้งบดละเอียด 100 กรัม (TSS)

3.1.2 วัด pH โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter)

3.1.3 วัดปริมาณไนโตรเจนในรูปด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB-N) ใช้วิธีคอนเวย์ (Hasegawa,1987)

3.1.4 วัดปริมาณกลูโคซามีน (glucosamine) ตามวิธีที่ปรับปรุงจากวิธีของ Morgan-Elson (Van de loo, 1976)

3.2 จากข้อมูลที่ได้ทำการคัดเลือกสภาวะการย่อยสลาย โดยพิจารณาคุณลักษณะของสารสกัดกำหนดลักษณะที่ต้องการของส่วนสกัดจากหัวกุ้ง ดังนี้

3.2.1 สารละลายที่ได้จากการย่อยต้องมีกลิ่นกุ้งสูงและมีกลิ่นกรดที่ใช้น้อย

3.2.2 pH ของสารละลายจะต้องไม่มากกว่า 4.5 และไม่น้อยกว่า 2.5

3.2.3 สารละลายที่ได้จากการย่อย ต้องมีปริมาณร้อยละของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด(%TSS) สูง

3.2.4 สารละลายที่ได้จากการย่อยต้องมีปริมาณTVB-N ต่ำและให้กลิ่นที่ดี หอม

3.3 เมื่อเลือกสภาวะได้แล้วทำการย่อยหัวกุ้งที่สภาวะดังกล่าว ติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของสารสกัดที่ระยะเวลาการย่อยต่างๆกัน โดยนำส่วนผสมที่ย่อยได้ กรองผ่านตะแกรงกรองแล้วนำของเหลวที่ได้มาวิเคราะห์ดังนี้

3.3.1 ปริมาณร้อยละของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด(%TSS) pH กลูโคซามีน ตามวิธีในข้อ 3.1.1-3.1.4 และปริมาณร้อยละของแข็งในสารสกัดที่ผ่านการกรองหยาบด้วยตะแกรงกรอง

3.3.2 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Kjeldahl method: AOAC, 2000)

3.3.3 สารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนโดย นำตัวอย่าง 5 กรัม ปั่นผสมกับกรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) ร้อยละ 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 3,500g เป็นเวลา 10 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนตามวิธีของ AOAC (2000)

3.3.4 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด(AOAC,1995) และปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมไคติน ((Ronald, 2010) และนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏเคลียร์โซน

3.3.5 ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)

3.3.6 ตรวจสอบกลิ่น และรสของสารสกัดโดยใช้ผู้ทดสอบที่คุ้นเคยกับผลิตภัณฑ์

4. การศึกษาลักษณะสมบัติของสารสกัดจากสภาวะที่คัดเลือกได้

4.1 นำสารสกัดที่กรองได้จากตะแกรงกรองมาปรับ pH ด้วย 6N NaOH จนมี pH เท่ากับ 5.5, 5.75, 6.00, และ 7.00 ทดสอบรสเปรี้ยวเพื่อหาระดับของการใช้เบสที่เหมาะสมในการลดความเปรี้ยวของสารสกัดที่ได้ ผลที่ได้นำมาผ่านกระบวนการทำให้เข้มข้นโดยให้ความร้อนที่ 90-95 องศาเซลเซียส จนปริมาตร

เปลี่ยนจาก 100 มล เหลือเพียง 30 มล นำสารสกัดเข้มข้นมาทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยทดสอบความชอบด้าน รส สี ลักษณะปรากฏ กลิ่นรส โดยวิธี 7 point hedonic scale ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 9 คน

4.2 วัด pH ของสารสกัดหลังปรับด้วยเบสทั้งก่อนและหลังการทำให้เข้มข้น ตามวิธีในข้อ 3.1.2

4.3 SDS-PAGE เพื่อศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนและเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดหัวกุ้งที่ปรับ pH เป็น 5.75 ก่อนและหลังทำให้เข้มข้นด้วยความร้อนโดยวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้ความเข้มข้นของเจลที่ร้อยละ 18 ใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐาน -full range rainbow markers (Amersham Biosciences, อังกฤษ) ซึ่งประกอบด้วยน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10-250 kDa ซึ่งประกอบด้วย Blue color (250 kDa) Red color (160 kDa) Green color (105 kDa) Yellow color (75 kDa) Purple color (50 kDa) Blue color (35kDa) Orange color (30 kDa) Green color (25 kDa) Blue color (15 kDa) และ Red color (10 kDa) และ peptide marker (GE Healthcare, สหรัฐอเมริกา) น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2.5-16.9 kDa ซึ่งประกอบด้วย Globin III (2.5 kDa) Globin II (6.2 kDa) Globin I (8.2 kDa) Globin I+III (10.7 kDa) Globin I+II (14.4 kDa) และ Globin (16.9 kDa)

5. การศึกษาแนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยหัวกุ้งโดยใช้ความร้อนภายใต้ความดันสูง

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยหัวกุ้งด้วยกรดอินทรีย์ จึงเปรียบเทียบการย่อยหัวกุ้งในน้ำ และกรดซิตริก 0.5 M ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 6 ชม กรองสารสกัด ดมกลิ่น และ ชิมรส

6. กระบวนการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์กลิ่นรสกุ้ง

โดยนำผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาได้ บรรจุขวดทนความร้อนที่ผ่านการต้มฆ่าเชื้อในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที การบรรจุใช้วิธีบรรจุขณะร้อน ปิดฝา นำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือด ให้อาหารมีอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำให้เย็น ที่อุณหภูมิห้อง จึงเก็บในตู้เย็น (5-10°C) สุ่มตัวอย่างวิเคราะห์ดังนี้

6.1 สุ่มตัวอย่างที่ 0 และ 6 เดือน วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (AOAC,1995)

6.2 สุ่มตัวอย่างที่ 2 สัปดาห์ วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนในผลิตภัณฑ์แต่งกลิ่นรสกุ้งโดยวิธี HPLC ใช้คอลัมน์ Pico tag (3.9×150 mm) วิธีทดสอบอ้างอิง Hagen *et al. (*1989) โดยมีสภาวะดังนี้ Injection volume : 20 µl, DAD wavelength : 254 nm, Oven temperature 40 องศาเซลเซียส, Run time : 30 นาที

ผลและวิจารณ์

1. คุณภาพวัตถุดิบ

หัวกุ้งขาวมีความสดดี โดยมีนัยน์ตาเต่งไม่หดเหี่ยว สีแววววาวสดใส ไม่มีกลิ่นเหม็น และไม่มีลักษณะการเกิดจุดดำ(melanosis) มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 1.24±0.03 ซึ่งถ้าสมมุติว่าไนโตรเจนทั้งหมดที่พบมาจากโปรตีนจะคิดเป็นปริมาณโปรตีนในหัวกุ้งบดเท่ากับร้อยละ 7.75 (wet basis) แต่เนื่องจากหัวกุ้งมีไคตินด้วยและไคตินมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบดังนั้นปริมาณโปรตีนจริงในหัวกุ้งจะน้อยกว่าร้อยละ 7.75 นอกจากนั้นพบว่าหัวกุ้งมีความชื้นเท่ากับร้อยละ 74.62 ±0.95 หรือมีปริมาณของแข็งเท่ากับร้อยละ

25.38 โดยส่วนของแข็งในหัวกุ้งประกอบด้วย โปรตีน ไคติน แร่ธาตุ (Naczk and Shahidi, 1990) ไขมันและรงควัตถุ astaxanthin ซึ่งละลายในไขมัน และสารประกอบที่มีไนโตรเจนแต่ไม่ใช่โปรตีน(NPN compounds) ค่าไนโตรเจนในรูปด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB-N) เท่ากับ 13.21±0.33mg/100g ค่า pH เท่ากับ 7.16±0.02 พบจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ 1.8 x 10^5 cfu/g และพบจุลินทรีย์ที่เจริญได้บนไคตินอะการ์เท่ากับ 3.0 x10^5 cfu/g โดยเป็นโคโลนีที่มีเคลียร์โซน จำนวน 2.0 x10^4 cfu/g แสดงว่าในหัวกุ้งมีจุลินทรีย์ที่เจริญและย่อยไคตินได้

2. การคัดเลือกสภาวะในการย่อยหัวกุ้ง

หัวกุ้งขาวย่อยในสารละลายกรดอินทรีย์ 2 ชนิดคือ กรดซิตริก และ กรดแล็กติก (ไม่ใช้กรดอะซิติกเนื่องจากมีกลิ่นกรดฉุนซึ่งส่งผลด้านลบต่อสารสกัดที่ได้) ที่ระดับความเข้มข้นกรด 2 ระดับคือ 0.1 และ 0.5M ที่อุณหภูมิห้องและ 50°C ทำการย่อยที่เวลาต่างๆคือ 0 6 9 12 และ 24 ชั่วโมง ติดตามการเปลี่ยนแปลงของส่วนใสที่แยกได้จากการย่อย พบดังนี้

ตารางที่ 1 ปริมาณร้อยละของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด(คำนวณโดยเทียบจาก100 กรัมของน้ำหนักสารละลายใสหลังการเหวี่ยงแยกตะกอนและกรอง)มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามเวลาการย่อยสลาย ในทุกสภาวะการย่อยหัวกุ้ง แต่เมื่อย่อยไปได้ระยะหนึ่ง ปริมาณร้อยละของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดกลับลดลง การใช้กรดซิตริกจะให้ผลสูงกว่ากรดแล็กติก และความเข้มข้นกรด 0.1 ได้ผลต่ำกว่า 0.5 M ในทุกชนิดกรด แต่อุณหภูมิการหมักไม่ทำให้ร้อยละของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดต่างกันมากนัก สภาวะการย่อยที่ให้ปริมาณร้อยละของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงสำหรับกรดแต่ละชนิด ได้แก่ กรดซิตริก 0.5 M ย่อยที่อุณหภูมิห้อง(28-30°C) และกรดแล็กติก 0.5 M ย่อยที่อุณหภูมิห้อง(28-30°C) โดยได้ปริมาณร้อยละของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงเท่ากับ 10.41และ 6.71 (ที่เวลาย่อยนาน 9 ชั่วโมง) ตามลำดับ ผลการย่อยแสดงว่ากรดย่อยสลายหัวกุ้งได้สารโมเลกุลเล็กที่ละลายได้ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเกิดได้ดีเมื่อเพิ่มเวลาการย่อย แต่การย่อยที่นานเกินไปกลับทำให้ปริมาณร้อยละของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดลดลงทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเกิดการย่อยสลายหัวกุ้งได้สารโมเลกุลเล็กมากที่ระเหยได้นอกจากนั้นบางตัวอย่างพบการเกิดกลิ่นเน่าในบางสภาวะดังปรากฏในตารางที่ 1 ซึ่งอาจมีสาเหตุจากจุลินทรีย์

ตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลง pH ของสารสกัดจากการย่อยหัวกุ้ง พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการย่อยและที่ความเข้มข้นกรดเท่ากัน กรดซิตริกจะให้ค่า pH ต่ำกว่ากรดแล็กติก และที่ความเข้มข้นกรด 0.5M ทำให้ pHต่ำกว่าที่ความเข้มข้นกรด 0.1M โดยสภาวะที่ให้ค่า pH ต่ำจะทำให้เกิดการย่อยหัวกุ้งได้ดีจึงได้ปริมาณร้อยละของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงดังแสดงในตารางที่ 1 โดยกรดซิตริก 0.5 M ย่อยสลายที่อุณหภูมิห้อง(28-30°C) มีค่า pH 2.58(0 ชั่วโมง) และเพิ่มเป็น 2.79 เมื่อให้เวลานาน (12 ชั่วโมง) และกรดแล็กติก 0.5 M ย่อยที่อุณหภูมิห้อง(28-30°C) มีค่า pH 3.54(0 ชั่วโมง) และเพิ่มเป็น 3.82 เมื่อย่อยนาน (12 ชั่วโมง) จะเห็นได้ว่าสารที่เป็นผลผลิตจากการย่อยหัวกุ้งในกรดอินทรีย์มีความเป็นเบส จึงทำให้ค่า pH ของของเหลวที่ทำการย่อยสลายมีค่าเพิ่มขึ้นตามเวลา

ตารางที่ 1 ปริมาณร้อยละของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (%TSS)* ในส่วนของเหลวที่กรองแยกจากส่วนผสมของหัวกุ้งย่อยสลายที่ระยะเวลาต่างๆ

ตัวอย่าง	เวลาในการย่อยสลาย (ชั่วโมง)				
	0	6	9	12	24
C-0.1-RT	4.6 ± 0.3	4.07 ± 0.1	3.83 ± 0.5	-	-
C-0.5-RT	8.94 ± 1.1	10.22 ± 0.1	10.41 ± 0.0	10.31 ± 0.2	-
L-0.1-RT	4.07 ± 0.6	5.11 ± 0.4	4.82 ± 0.4	-	-
L-0.5-RT	5.93 ± 0.4	6.39 ± 0.2	6.59 ± 0.3	6.71 ± 0.4	-
C-0.1-50C	4.60 ± 0.3	4.65 ± 0.5	5.57 ± 0.4	5.34 ± 0.6	4.76 ± 0.4
C-0.5-50C	8.94 ± 1.1	10.29 ± 0.2	10.15 ± 0.3	10.17 ± 0.8	9.97 ± 0.8
L-0.1-50C	4.07 ± 0.6	5.13 ± 0.5	5.05 ± 0.4	4.85 ± 0.5	5.65 ± 1.1
L-0.5-50C	5.93 ± 0.4	6.90 ± 0.6	7.11 ± 0.4	6.98 ± 0.5	6.87 ± 0.5

หมายเหตุ C, L = กรดซิตริก กรดแล็กติก

RT = 28-30°C

(-) = ไม่ได้วัดค่าเนื่องจากเกิดกลิ่นเหม็นเน่า

* %TSS คำนวณโดยเทียบจาก100 กรัมของน้ำหนักสารละลายใสหลังการเหวี่ยงแยกตะกอนและกรองผ่านกระดาษกรอง

ตารางที่ 2 pH ของของเหลวที่กรองแยกจากส่วนผสมของหัวกุ้งย่อยสลายที่ระยะเวลาต่างๆ

Sample	เวลาในการย่อยสลาย (ชั่วโมง)				
	0	6	9	12	24
C-0.1-RT	4.01 ± 0.3	4.21 ± 0.0	4.26 ± 0.1	5.35 ± 0.0	5.50 ± 3.2
C-0.5-RT	2.58 ± 0.1	2.64 ± 0.1	2.64 ± 0.1	2.79 ± 0.0	2.75 ± 0.0
L-0.1-RT	5.38 ± 1.0	6.24 ± 0.2	6.55 ± 0.1	6.69 ± 0.2	7.06 ± 0.3
L-0.5-RT	3.54 ± 0.2	3.78 ± 0.1	3.80 ± 0.1	3.82 ± 0.1	3.78 ± 0.1
C-0.1-50C	4.01 ± 0.3	4.16 ± 0.1	4.16 ± 0.2	4.73 ± 0.7	4.24 ± 0.1
C-0.5-50C	2.58 ± 0.1	2.63 ± 0.1	2.58 ± 0.2	2.77 ± 0.0	2.73 ± 0.1
L-0.1-50C	5.38 ± 1.0	6.18 ± 0.2	6.33 ± 0.4	6.67 ± 0.3	7.08 0.5
L-0.5-50C	3.54 ± 0.2	3.76 ± 0.1	3.57 ± 0.2	3.84 ± 0.1	3.81 ± 0.1

หมายเหตุ C, L = กรดซิตริก กรดแล็กติก

RT = 28-30°C

ตารางที่ 3 ปริมาณไนโตรเจนในรูปด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB-N)ในทุกสภาวะการย่อยมีค่าสูงขึ้นตามเวลาโดยการย่อยที่สภาวะที่มี pHเริ่มต้นสูงกว่า 4.5 เมื่อย่อยนานขึ้นจะมีค่าปริมาณไนโตรเจนในรูปด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วนั่นคือมีสารโมเลกุลเล็กเกิดขึ้นมากในรูปด่างที่ระเหยได้ ซึ่งการไฮโดรไลส์ที่สภาวะที่ pH สูงกว่า 4.5 จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียมีการเจริญได้ดี และผลิตสารไนโตรเจนในรูปด่างที่ระเหยได้ สังเกตได้ว่าค่า pH ในตารางที่ 2 เปลี่ยนแปลงสอดคล้องกับค่าปริมาณไนโตรเจนในรูปด่างที่ระเหยได้ทั้งหมดในตารางที่ 3 นี้

ตารางที่ 3 ปริมาณไนโตรเจนในรูปด่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB-N, mg/100g)ในส่วนของเหลวที่กรองแยกจากส่วนผสมของหัวกุ้งย่อยสลายที่ระยะเวลาต่างๆ

Sample	เวลาในการย่อยสลาย (ชั่วโมง)				
	0	6	9	12	24
C-0.1-RT	0.49 ± 0.3	0.34 ± 0.1	0.55 ± 0.0	1.47 ± 0.8	2.12 ± 0.0
C-0.5-RT	0.33 ± 0.3	0.41 ± 0.0	0.35 ± 0.0	1.24 ± 0.1	0.63 ± 0.1
L-0.1-RT	0.49 ± 1.3	4.07 ± 0.9	6.55 ± 0.1	18.54 ± 0.2	18.81 ± 1.7
L-0.5-RT	0.04 ± 0.6	0.42 ± 0.0	0.49 ± 0.1	0.45 ± 0.1	0.61 ± 0.2
C-0.1-50C	0.49 ± 0.3	0.52 ± 0.0	0.56 ± 0.0	0.54 ± 2.4	0.70 ± 0.1
C-0.5-50C	0.33 ± 0.3	0.49 ± 0.0	0.56 ± 0.0	1.69 ± 0.1	0.72 ± 0.2
L-0.1-50C	0.49 ± 1.3	0.55 ± 0.1	0.49 ± 0.0	3.22 ± 0.1	13.37 ± 5.8
L-0.5-50C	0.04 ± 0.6	0.61 ± 0.1	0.55 ± 0.1	1.48 ± 0.0	0.88 ± 0.2

หมายเหตุ C, L = กรดซิตริก กรดแล็กติก

RT = 28-30°C

ตารางที่ 4 ปริมาณ glucosamine (mg/ml) ในสารละลาย โดยเตรียมตัวอย่างวัตถุดิบหัวกุ้ง 75 กรัมในน้ำ 200 มล และ หัวกุ้ง 75 กรัมในกรด 200 มล ตามสภาวะการย่อยที่ศึกษา นำของเหลวที่กรองได้มาหาค่าปริมาณกลูโคซามีน พบว่าวัตถุดิบหัวกุ้งมีกลูโคซามีน 0.034 มก/มล(ไม่ได้แสดงไว้ในตาราง) ซึ่งสูงกว่าในสารสกัดด้วยกรดส่วนใหญ่(0.008-0.035) อาจเป็นได้ว่าสภาวะของหัวกุ้งที่เติมน้ำนั้น จุลินทรีย์และเอนไซม์ที่ผลิตกลูโคซามีนทำงานดีกว่าสภาวะที่มีกรด อิทธิพลของชนิดกรดอินทรีย์ และความเข้มข้น และอุณหภูมิกับเวลาในการบ่ม ไม่ส่งผลต่อปริมาณกลูโคซามีนในสารสกัด โดยปริมาณกลูโคซามีนมีค่าต่ำในทุกทรีทเมนท์ ทั้งนี้เป็นเพราะไคตินไม่ละลายในกรดอินทรีย์ แต่ละลายได้ในกรดอนินทรีย์เช่นกรดเกลือ เป็นต้น (Mojarrad *et al.*, 2007)นอกจากนั้นเข้าใจว่าภายใต้สภาวะการสกัดที่เป็นกรดของกรดอินทรีย์นี้ไม่เหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์ในหัวกุ้งหรือจุลินทรีย์ในหัวกุ้งที่สามารถย่อยไคตินได้

ตารางที่ 4 ปริมาณ glucosamine (mg/ml) ในส่วนของเหลวที่กรองแยกจากส่วนผสมของหัวกุ้งย่อยสลายที่ระยะเวลาต่างๆ*

ตัวอย่าง	เวลาในการย่อยสลาย (ชั่วโมง)			
	6	9	12	24
C-0.1-RT	0.014 ± 0.0	0.022 ± 0.0	0.013 ± 0.0	0.013 ± 0.0
C-0.5-RT	0.008 ± 0.0	0.018 ± 0.0	0.019 ± 0.0	0.015 ± 0.0
L-0.1-RT	0.019 ± 0.0	0.015 ± 0.0	0.015 ± 0.0	0.022 ± 0.0
L-0.5-RT	0.020 ± 0.0	0.019 ± 0.0	0.023 ± 0.0	0.014 ± 0.0
C-0.1-50C	0.022 ± 0.0	0.016 ± 0.0	0.021 ± 0.0	0.021 ± 0.0
C-0.5-50C	0.014 ± 0.0	0.018 ± 0.0	0.020 ± 0.0	0.020 ± 0.0
L-0.1-50C	0.019 ± 0.0	0.016 ± 0.0	0.021 ± 0.0	0.040 ± 0.0
L-0.5-50C	0.021 ± 0.0	0.030 ± 0.0	0.035 ± 0.0	0.020 ± 0.0

หมายเหตุ C, L = กรดซิตริก กรดแล็กติก

RT = 28-30°C

* หัวกุ้ง 75 กรัมต่อกรด 200 มล

จากการเปรียบเทียบผลคุณภาพของส่วนใสจากการย่อยสลายกับหลักเกณฑ์การคัดเลือกคือ

1 สารละลายที่ได้จากการย่อยสลายต้องมีกลิ่นกุ้งสูงและมีกลิ่นกรดที่ใช้น้อย

2 pH ของสารละลายจะต้องไม่มากกว่า 4.5 และไม่น้อยกว่า 2.5

3 สารละลายที่ได้จากการย่อยต้องมีปริมาณร้อยละของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูง

4 สารละลายที่ได้จากการย่อยต้องมีปริมาณTVB-N ต่ำและให้กลิ่นที่ดี หอม

จึงคัดเลือกสภาวะการย่อยสลายคือกรดซิตริก และแลกติก 0.5M บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 0 6 และ 12 ชั่วโมง และนำไปทำการศึกษาในตอนต่อไป

2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของส่วนใสจากการย่อยสลายที่เป็นสภาวะที่คัดเลือก

2.1 การเปลี่ยนแปลงทางเคมี

ทำการย่อยหัวกุ้งด้วยกรดซิตริก และกรดแล็กติกความเข้มข้น 0.5M เป็นเวลา 0 6 และ 12 ชั่วโมง ติดตามปริมาณกากของแข็งที่เหลือจากการย่อยและของเหลวที่กรองแยกกากแล้ว จากสภาวะการย่อยหัวกุ้ง (ตารางที่ 5) และปริมาณร้อยละของแข็ง ปริมาณร้อยละของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด pH ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ร้อยละปริมาณไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน และปริมาณเถ้าในสารสกัดหัวกุ้ง โดยคำนวณเป็นปริมาณในหัวกุ้ง 100 กรัม(ตารางที่ 6) จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน(ตารางผนวกที่ 1)พบว่าชนิดกรด และ

ระยะเวลาการย่อยมีผลต่อค่าปริมาณร้อยละของแข็ง(TS) ปริมาณร้อยละของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด(TSS), pH ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด(TN) และร้อยละปริมาณไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน(NPN) ในสารสกัดหัวกุ้ง โดยพบการเปลี่ยนแปลงสอดคล้องกับการศึกษาในข้อ 1ในเรื่องปริมาณร้อยละของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด(TSS) และpH โดยกรดซิตริกจะให้ค่า TSS สูงกว่ากรดแล็กติก และค่าสูงขึ้นเมื่อเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น ของแข็งที่ละลายได้ในของเหลวที่ย่อยได้นี้น่าจะประกอบด้วยโปรตีนที่ละลายได้ในสารละลายกรด สารไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน(เปปไทด์ กรดอะมิโนอิสระ เอมีน กลูโคซามีน เป็นต้น) เม็ดสี astaxanthin และแร่ธาตุ จากการที่กรดซิตริก 0.5M มีpH ต่ำกว่ากรดแล็กติก 0.5M จึงน่าจะสกัดแร่ธาตุออกจากหัวกุ้งบดได้ดีกว่า ส่งผลให้ได้ปริมาณร้อยละของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดสูงกว่านั่นเอง ซึ่งผลการวิเคราะห์ปริมาณเถ้าสอดคล้องกับข้อสันนิษฐานที่กล่าวข้างต้น สำหรับกากจากการย่อย พบว่าเมื่อเพิ่มเวลาการย่อย กากที่เหลือจะลดลงโดยจะลดลงอย่างชัดเจนเมื่อย่อยนานมากกว่าหรือเท่ากับ 6 ชั่วโมง(กรดซิตริกที่ 0 ชม เหลือกาก 67.27 กรัม และลดลงเหลือ 19.55 กรัมใน 6 ชม) ปริมาณกลูโคซามีนพบไม่แตกต่างจากที่ได้รายงานในตารางที่ 4

ตารางที่ 5 ปริมาณกากของแข็งที่เหลือจากการย่อยและของเหลวที่กรองแยกกากแล้วจากสภาวะการย่อยสลายหัวกุ้งที่คัดเลือกแล้ว ที่ระยะเวลาต่างๆโดยใช้หัวกุ้งบด 75 กรัมต่อสารละลายกรด 200 มิลลิลิตร

ตัวอย่าง	กากของแข็งที่เหลือจากการย่อย (กรัม)	ของเหลวที่กรองแยกกากแล้ว (กรัม)
C0.5-RT-0	67.27	200.03
C0.5-RT-6	19.55	247.76
C0.5-RT-12	19.07	247.88
L0.5-RT-0	55.57	201.59
L0.5-RT-6	21.90	242.53
L0.5-RT-12	17.29	244.26

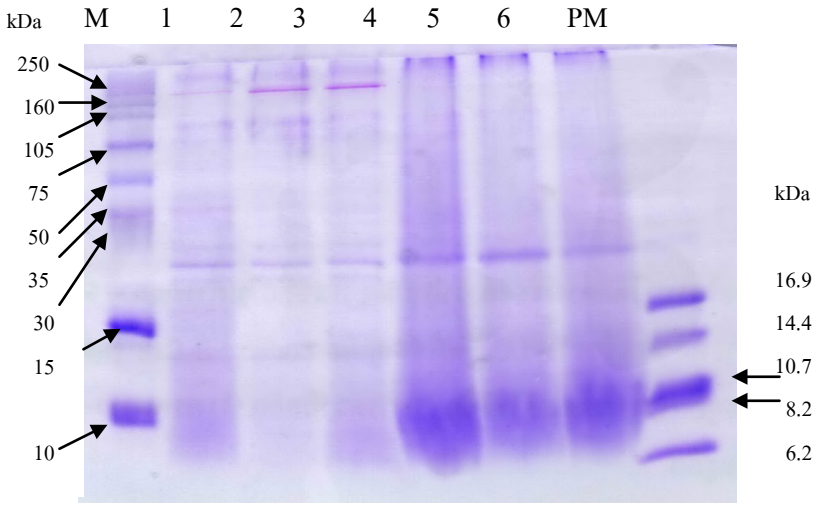
ตารางที่ 6 แสดงปริมาณ TS TSS ร้อยละปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ร้อยละปริมาณไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน ร้อยละเถ้า pH และ ปริมาณ glucosamine ในส่วนของเหลวที่ได้จากการย่อยสลายหัวกุ้งหลังจากคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสม

ตัวอย่าง	TS (กรัมต่อ 100 กรัม หัวกุ้งบด)	TSS (กรัมต่อ 100 กรัม หัวกุ้งบด)	ร้อยละปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (กรัมต่อ 100 กรัม หัวกุ้งบด)	ร้อยละปริมาณไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (กรัมต่อ 100 กรัม หัวกุ้งบด)	ร้อยละเถ้า (กรัมต่อ 100 กรัม หัวกุ้งบด)	pH	Glucosamine (mg/ml)
C0.5-RT-0	$22.9^{b} \pm 3.42$	$7.68^{e} \pm 1.09$	$1.18^{a} \pm 0.25$	$0.92^{a} \pm 0.15$	$1.61^{a} \pm 0.55$	$2.30^{a} \pm 0.16$	$0.009^{ns} \pm 0.01$
L0.5-RT-0	$17.95^{a} \pm 2.72$	$4.05^{a} \pm 0.27$	$1.39^{b} \pm 0.21$	$1.0^{a} \pm 0.16$	$1.42^{a} \pm 0.39$	$3.12^{c} \pm 0.20$	$0.010^{ns} \pm 0.00$
C0.5-RT-6	$36.07^{d} \pm 1.37$	$6.92^{d} \pm 0.44$	$1.73^{c} \pm 0.08$	$1.06^{ab} \pm 0.22$	$3.14^{c} \pm 0.67$	$2.75^{b} \pm 0.10$	$0.010^{ns} \pm 0.00$
L0.5-RT-6	$26.08^{c} \pm 1.03$	$4.63^{b} \pm 0.23$	$1.83^{d} \pm 0.15$	$1.37^{c} \pm 0.24$	$3.15^{c} \pm 0.73$	$3.88^{d} \pm 0.04$	$0.012^{ns} \pm 0.01$
C0.5-RT-12	$36.69^{d} \pm 0.74$	$7.79^{e} \pm 0.55$	$1.75^{cd} \pm 0.08$	$1.15^{b} \pm 0.11$	$2.70^{bc} \pm 0.85$	$2.70^{b} \pm 0.10$	$0.011^{ns} \pm 0.00$
L0.5-RT-12	$26.83^{c} \pm 0.92$	$5.31^{c} \pm 0.45$	$1.76^{cd} \pm 0.19$	$1.43^{c} \pm 0.19$	$2.58^{b} \pm 0.81$	$3.80^{d} \pm 0.11$	$0.013^{ns} \pm 0.00$

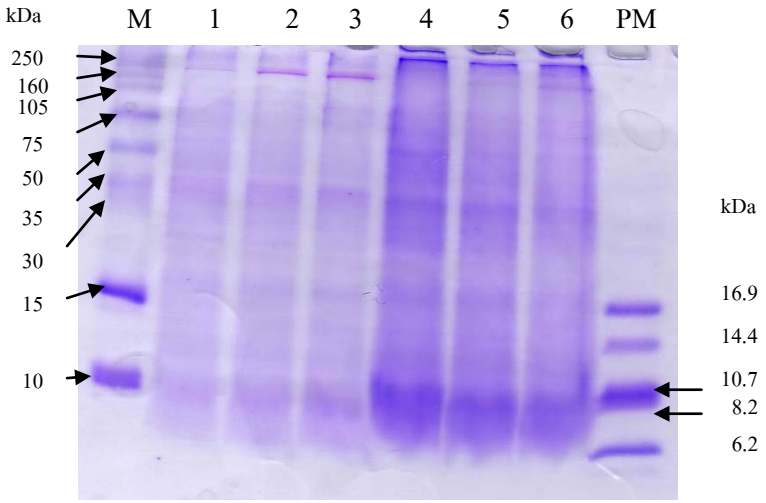
หมายเหตุ a, b เปรียบเทียบผลในแนวตั้ง ตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2.2 รูปแบบของโปรตีนและเปปไทด์บน SDS-PAGE

เพื่อบ่งชี้ขนาดโมเลกุลของสารที่ให้กลิ่นรสในสารสกัดจากหัวกุ้งจึงนำสารสกัดจากการย่อยด้วย กรดซิตริก และกรดแล็กติก 0.5 M ที่เวลา 0, 6, 12 ชม ซึ่งปรับพีเอชเป็น 5.75 แล้ว ทั้งก่อนและหลังทำให้เข้มข้น มาศึกษาขนาดโมเลกุลของหน่วยย่อยของโปรตีนและเปปไทด์ที่มีในสารสกัดโดยวิธี SDS-PAGE ใช้ การแยกบน 18%เจล ได้ผลดังภาพที่ 1 และ 2 พบว่าก่อนทำให้สารสกัดเข้มข้นสารสกัดประกอบด้วยโปรตีนและเปปไทด์ขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 250-6 kDa หลังทำให้เข้มข้นโมเลกุลขนาดใหญ่หายไป พบเพียง เปปไทด์ขนาด 30-6.2 kDa โดยการสกัดด้วยกรดซิตริกจะมีสารที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 25 kDa ที่เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ และสารสกัดจากกรดแล็กติกมีสารที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 35 kDa ที่เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าการสกัดด้วยกรดต่างกันให้สารขนาดโมเลกุลเล็กคล้ายกัน แต่โมเลกุลขนาดกลางต่างกันอยู่บ้าง โดยการย่อยเกิดขึ้นในช่วงการบ่มที่อุณหภูมิห้อง และเกิดการย่อยต่อช่วงการเคี่ยวที่ 90-95 องศาเซลเซียสได้สารโมเลกุลเล็กๆจึงมีกลิ่น และกลิ่นรสหอมมากขึ้นหลังการทำสารสกัดให้เข้มข้น



ภาพที่ 1 ขนาดโมเลกุลของโปรตีนและเปปไทด์ที่พบในสารสกัดจากหัวกุ้งด้วยกรดซิตริกเป็นเวลา 0, 6, 12 ชั่วโมงปรับพีเอชเป็น 5.75 ก่อนทำให้เข้มข้น (lane 1, 2, 3 ตามลำดับ) และทำให้เข้มข้นแล้ว (lane 4, 5, 6 ตามลำดับ) M คือ standard marker proteins และ PM คือ peptides marker



ภาพที่ 2 ขนาดโมเลกุลของโปรตีนและเปปไทด์ที่พบในสารสกัดจากหัวกุ้งด้วยกรดแล็กติกเป็นเวลา 0, 6, 12 ชั่วโมงปรับพีเอชเป็น 5.75 ก่อนทำให้เข้มข้น (lane 1, 2, 3 ตามลำดับ) และทำให้เข้มข้นแล้ว (lane 4, 5, 6 ตามลำดับ) M คือ standard marker proteins และ PM คือ peptides marker

2.3 การเปลี่ยนแปลงทางจุลชีววิทยา

จากตารางที่ 7 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยไคตินได้ ที่พบในการย่อยสลายหัวกุ้งด้วยกรดซิตริกและกรดแล็กติก 0.5 M เป็นเวลา 0 6 12 ชั่วโมง เทียบกับหัวกุ้งสด พบว่า หัวกุ้งสดมีจุลินทรีย์ทั้งหมด 1.8 x 10^5 และ 3.0 x 10^5 cfu/g บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PCA และ Chitin agar ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวนโคโลนีที่ย่อยไคตินได้ 2.0 x 10^4 cfu/g เมื่อเติมกรดทั้งสองชนิด (ที่เวลา 0 ชั่วโมง) ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด(PCA และ Chitin agar)ลดลง และปริมาณจุลินทรีย์ที่ย่อยไคตินก็ลดลงเมื่อเทียบกับวัตถุดิบ โดยพบน้อยกว่า 10 cfu/g การที่ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดลดลงเนื่องจากกรดอินทรีย์มีผลในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ โดยเมื่อกรดเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ กรดจะแตกตัวให้โปรตอนจึงมีแนวโน้มที่จะทำให้เซลล์มีสภาวะเป็นกรด ซึ่งเซลล์จะพยามยามรักษาสภาวะ pH ที่เป็นกลางไว้ โดยขับโปรตอนออกไปจากเซลล์ กลไกนี้ทำให้เซลล์เติบโตช้าลง เนื่องจากต้องใช้พลังงานส่วนหนึ่งขับไล่โปรตอนออกไป ยิ่งถ้าภายนอกเซลล์มี pH ต่ำมากเท่าใด เซลล์ก็ต้องทำงานหนักมากขึ้นเท่านั้น (สุมณฑา, 2545) กฤติยา (2542) กล่าวว่า เฉพาะกรดอินทรีย์ที่ไม่แตกตัวเท่านั้น ที่มีผลในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ (กรณี การแตกตัวของกรดที่เกิดภายนอกเซลล์) การแตกตัวของกรดจะเพิ่มขึ้น เมื่อ pH สูงขึ้นจึงทำให้เหลือปริมาณกรดที่มีฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์ลดลง จุลินทรีย์จึงเจริญได้ดีขึ้น ดังนั้นตัวอย่างที่ใช้กรดย่อยหัวกุ้งด้วยเวลามากขึ้นที่ 6 และ 12 ชั่วโมง จะพบว่า ปริมาณจุลินทรีย์มีแนวโน้มสูงขึ้นตามค่า pH ที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 7) แต่ปริมาณโคโลนีที่ย่อยไคตินได้ยังพบน้อยกว่า 10 cfu/g นอกจากนั้นพบว่าปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PCA และ Chitin agar มีปริมาณต่างกันซึ่งอธิบายได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PCA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะกับการตรวจสอบแบคทีเรียทั้งหมด (Wikipedia, 2009) ซึ่งในการตรวจสอบจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จะไม่พบเชื้อรา แต่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด chitin agar พบว่าจุลินทรีย์ที่ขึ้นบนอาหารนี้มีทั้งแบคทีเรียและรา นอกจากนั้นความแตกต่างของจุลินทรีย์ทั้งหมดอาจเป็นเพราะหัวกุ้งที่นำมาใช้

ในกระบวนการย่อยสลายอาจมี ชนิด และจำนวนจุลินทรีย์ตั้งต้นในแต่ละซ้ำของการทดลองต่างกัน การพบโคโลนีที่ย่อยไคตินได้ในหัวกุ้งสดถึง 2.0 x 10^4 cfu/g บ่งชี้ว่าถ้าทำการคัดแยกจุลินทรีย์จากวัตถุดิบหัวกุ้งสดอาจใช้เป็นกล้าเชื้อในการย่อยไคตินในหัวกุ้ง เพื่อเพิ่มปริมาณกลูโคซามีนในสารสกัดจากหัวกุ้งซึ่งเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค

ตารางที่ 7 ปริมาณเชื้อทั้งหมด และเชื้อที่สามารถย่อยไคตินได้และเกิดเคลียร์โซน ที่พบในการย่อยหัวกุ้งด้วยกรดซิตริกและแลกติก 0.5 M นาน 0 6 12 ชั่วโมงและในผลิตภัณฑ์แต่งกลิ่นกุ้งบรรจุขวดผ่านการฆ่าเชื้อ

ตัวอย่าง	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PCA (cfu/g)	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Chitin agar (cfu/g)	จำนวนโคโลนีที่เกิดโซนใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Chitin agar (cfu/g)
C0.5-RT-0	1.4 x 10^2	4.1 x 10^3	< 10 est
C0.5-RT-6	6.7 x 10^2	9.4 x 10	< 10 est
C0.5-RT-12	6.7 x10^3	8.3 x 10^3	< 10 est
L0.5-RT-0	3.0 x 10^3	9.7 x 10^3	11.1 est
L0.5-RT-6	4.2 x 10^3	3.0 x 10^2	< 10 est
L0.5-RT-12	4.1 x 10^5	3.0 x 10^4	< 10 est
หัวกุ้งสด	1.8 x 10^5	3.0 x 10^5	2.0 x 10^4
ผลิตภัณฑ์, 0 เดือน	0	-	-
ผลิตภัณฑ์, 6 เดือน	1x 10	-	-

3. การศึกษาแนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยหัวกุ้งโดยใช้ความร้อนภายใต้ความดันสูง

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยหัวกุ้งด้วยกรดอินทรีย์ จึงเปรียบเทียบการย่อยหัวกุ้งในน้ำ และ กรดซิตริก 0.5 M ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 6 ชม พบว่าสารสกัดที่ได้มีกลิ่นหอมกุ้งเข้มกว่าสารสกัดที่อุณหภูมิห้องที่เวลาเท่ากัน แต่พบรสขมเกิดขึ้นทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับในการใช้เป็นสารให้กลิ่นรส เข้าใจว่าการย่อยแบบรุนแรงทำให้ได้สารโมเลกุลเล็กที่ให้รสขม

4. การทดสอบการยอมรับผลิตภัณฑ์สารสกัดกลิ่นรสกุ้ง

ในการทำผลิตภัณฑ์สารสกัดกลิ่นรสกุ้งจะต้องนำของเหลวที่ได้จากการย่อยหัวกุ้ง มาปรับ พีเอชอยู่ในช่วง 5.5-7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 N แต่เนื่องจากของเหลวที่ย่อยได้มีรสเปรี้ยวและการปรับพีเอชทำให้เกิดรสฝาด ในการทดลองจึงนำของเหลวจากการย่อย ด้วยกรดซิตริก 0.5 M 12 ชั่วโมง ซึ่งมี พีเอชต่ำที่สุดมาทดสอบการปรับพีเอช พบว่าที่พีเอช 5.75 ของเหลวมีรสเปรี้ยว และรสฝาดน้อยดังนั้นในการเตรียมผลิตภัณฑ์จึง ทำโดยกรองของเหลว ที่ย่อยได้จากสภาวะที่คัดเลือกไว้คือ กรดซิตริกและกรดแล็กติก

ความเข้มข้น 0.5 M เวลา 6 และ12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง นำมาปรับ pH ให้เท่ากับ 5.75 ก่อนนำไปทำให้เข้มข้นโดยกวนบนเตาจนของเหลวมีอุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส เคี่ยวจนปริมาตรของผสมเปลี่ยนจาก 100 มล เป็น 30 มล จึงนำมาทดสอบความชอบโดยใช้ผู้ทดสอบ 9 คน ให้คะแนนความชอบด้าน ลักษณะปรากฏ สี กลิ่นรส โดยคะแนน 1= ไม่ชอบมากที่สุด และ 7=ชอบมากที่สุด ผลดังตารางที่ 8 พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ย่อยด้วยกรดซิตริกมีสีส้ม ข้นหนืดกลิ่นหอมกุ้งและกลิ่นรสเป็นที่ชื่นชอบมากกว่า ผลิตภัณฑ์จากกรดแล็กติก ซึ่งมีสีน้ำตาลและเป็นของเหลวใส เข้าใจว่าสีส้มเกิดจากเม็ดสี astaxanthin ซึ่งยังคงให้สีในผลิตภัณฑ์ ขณะที่การย่อยด้วยกรดแล็กติกมีการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง astaxanthin กับสารอื่นให้สีน้ำตาล สีและความหนืดที่ต่างกันมีผลต่อความชอบผลิตภัณฑ์ทำให้ผลิตภัณฑ์จากกรดซิตริกย่อยนาน 12 ชม ได้รับคะแนนความชอบรวมสูงที่สุด จึงนำไปศึกษารูปแบบการทำผลิตภัณฑ์ในข้อ 5 ต่อไป

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์กลิ่นรสกุ้ง

ตัวอย่าง	ปัจจัยคุณภาพ				
	สี	กลิ่นกุ้ง	กลิ่นรส	ความอร่อย	ความชอบรวม
L0.5,6	$3.22^{a} \pm 1.09$	$3.78^{a} \pm 1.86$	$3.56^{ab} \pm 1.67$	$2.89^{a} \pm 1.62$	$3.00^{a} \pm 1.66$
L0.5,12	$3.00^{a} \pm 1.12$	$3.33^{a} \pm 1.58$	$3.33^{a} \pm 1.12$	$3.33^{ab} \pm 1.50$	$3.44^{a} \pm 1.42$
C0.5,6	$5.78^{b} \pm 0.83$	$4.78^{a} \pm 1.56$	$4.67^{b} \pm 0.87$	$4.56^{b} \pm 1.51$	$4.78^{b} \pm 0.97$
C0.5,12	$5.56^{b} \pm 1.33$	$5.00^{a} \pm 1.5$	$4.22^{ab} \pm 1.09$	$4.33^{ab} \pm 1.32$	$4.22^{ab} \pm 1.09$

หมายเหตุ a, b เปรียบเทียบผลในแนวตั้ง ตัวอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

คะแนน 1=ไม่ชอบมากที่สุด 4=เฉย ๆ 7=ชอบมากที่สุด

5. การทำผลิตภัณฑ์กลิ่นรสกุ้ง

จากการคัดเลือกสภาวะการย่อยสลายและติดตามการเปลี่ยนแปลง จึงทำผลิตภัณฑ์โดยใช้การย่อยด้วยกรดซิตริก 0.5 M นาน 12 ชม ที่อุณหภูมิห้อง กรองสารสกัดด้วยตะแกรงกรองกากแบบหยาบ ปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 N จนสารละลายมี pH เป็น 5.75 ก่อนนำไปทำให้เข้มข้นโดยกวนบนเตาจนของเหลวมีอุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส เคี่ยวจนปริมาตรของผสมเปลี่ยนจาก 100 มล เป็น 30 มล จึงบรรจุลงในขวดแก้วที่ต้มฆ่าเชื้อในน้ำเดือด บรรจุขณะของเหลวร้อนจัด ปิดฝาให้แน่น นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดนาน15 นาที ทำเย็นและเก็บรักษาในตู้เย็น (5-10 องศาเซลเซียส) ผลิตภัณฑ์ที่ได้นำมาประกอบอาหารได้หลายแบบ เช่น ทำเป็นมันกุ้ง หรือทาบนขนมปังกรอบแล้วอบแห้งจะได้ขนมปังกรอบรสกุ้ง หรือใช้เติมในข้าวผัด และอาหารอื่นๆที่ต้องการให้มีกลิ่นรสกุ้ง เป็นต้น

5. องค์ประกอบของกรดอะมิโนในผลิตภัณฑ์

Table 4 แสดงองค์ประกอบของกรดอะมิโนในผลิตภัณฑ์แต่งกลิ่นกุ้งที่ผ่านการให้ความร้อนฆ่าเชื้อและเก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบทั้ง 9 ชนิด โดยมี Lys, Leu สูง และกรดอะมิโนไม่จำเป็นรวม 8 ชนิด ทั้งนี้พบ Glu สูงสุด คือ 28.08 มิลลิกรัม/กรัมตัวอย่างแห้ง รองลงมาคือ Asp, Arg, Lys, Leu และ Ala ตามลำดับ กรดอะมิโนที่ให้กลิ่นรสที่ดี ประกอบด้วย Glu, Asp, Gly, Ser, Thr, Ala และ Pro ซึ่งให้ความหวาน (Pan,1989) ซึ่งพบในผลิตภัณฑ์ของการศึกษานี้ในปริมาณสูง ดังนั้นจึงเป็นแหล่งของกลิ่นรสที่ดี เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่อไป ในผลิตภัณฑ์มีกรดอะมิโน พวกไฮโดรโฟบิก ได้แก่ ลิวซีน และอะลานีน ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้แสดงสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันได้อีกด้วย (Rajapakse *et al*.,2005)

Table 4 Amino acid composition of shrimp flavor product.

Amino acid	Content (mg/g sample dry basis)	Amino acid	Content (mg/g sample dry basis)
Essential		Nonessential	
Lysine	14.59	Aspartic acid	18.80
leucine	13.60	Glutamic acid	28.08
isoleucine	7.24	Serine	8.90
methionine	4.56		
Amino acid	Content (mg/g sample dry basis)	Amino acid	Content (mg/g sample dry basis)
Essential		*Nonessential*	
phenylalanine	9.90	Glycine	12.55
threonine	7.79	Alanine	12.80
tryptophan	3.47	Proline	9.46
valine	8.89	Tyrosine	5.85
Histidine	5.35	Arginine	17.61
Total	70.04	Total	119.40

สรุปผลการทดลอง

หัวกุ้งขาวที่ใช้เป็นวัตถุดิบ มีความสดและพบจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไคตินและเป็นจุลินทรีย์ที่ย่อยไคตินได้ เมื่อย่อยหัวกุ้งด้วยกรดอินทรีย์ คือกรดซิตริกและกรดแล็กติกความเข้มข้น 0.5 M นาน 0 6 และ 12 ชั่วโมง ได้สารสกัดที่มี ปริมาณของแข็งที่ละลายได้(TSS) อยู่ในช่วง 4.05-7.93 กรัมต่อหัวกุ้ง 100 กรัม วัดค่า pH ได้น้อยกว่า 4.5 และยังคงพบจุลินทรีย์ ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไคตินและเป็นจุลินทรีย์ที่ย่อยไคตินได้แต่มีปริมาณต่ำกว่าในวัตถุดิบมาก พบกลูโคซามีนในส่วนใสจากการหมักหัวกุ้งแต่ปริมาณต่ำ สารที่ให้กลิ่นรสกุ้งมีขนาดโมเลกุล ประมาณ 6-10 kDa ทำผลิตภัณฑ์กลิ่นรสกุ้งโดยนำสารสกัดจากการย่อยหัวกุ้งด้วยกรดซิตริก 0.5 M นาน 12 ชั่วโมง มาปรับพีเอช ทำให้ข้น บรรจุขวดขณะร้อน ให้ความร้อนฆ่าเชื้อ และเก็บในตู้เย็นได้ประมาณ 6 เดือน และมีข้อดีคือผลิตภัณฑ์แต่งกลิ่นกุ้งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบทั้ง 9 ชนิด

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง 2554. **ข่าวกรมประมง** 14/02/2554 แหล่งที่มา: http://www.fisheries.go.th 13 ตุลาคม 2556

กฤติยา มลาสานต์. 2542. **จุลินทรีย์** แหล่งที่มา:http://www.elibonline.com/doctors/food_biology01.html. 7 พฤษภาคม 2553.

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 2553. บทความเผยแพร่ความรู้สู่ประชาชน : กลูโคซามีนซัลเฟตกับโรคข้อเสื่อม. แหล่งที่มา: http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/thai/knowledgeresearch.php 2 กุมภาพันธ์2553

จรินทร์ สว่างแจ้ง. 2544. **การพัฒนาซุปกึ่งสำเร็จรูปรสกุ้งจากหัวกุ้ง** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ.

นิตยา บุญทิม. 2547. น้ำปูในมุมมองของงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์. RISE-AT Newsletter. แหล่งที่มา: http://www.ist.cmu.ac.th/riseat/nl/2004/05/01.php. 17 ตุลาคม 2550.

พวงชมพู ชูเกียรติวัฒนา. 2545. **การเพิ่มความบริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากเฮพาโทแพนเครียสของกุ้งกุลาดำ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พัชรี ธีรสุนทรวัตน์.2536. **การผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารจากหัวกุ้ง** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ.

เพียงใจ หาญวัฒนาวุฒิ . 2537. **การศึกษาการใช้ประโยชน์จากของเสียจากกุ้ง** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ.

รวิพิมพ์ ฉวีสุข และ ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม. 2538. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากน้ำต้มกุ้งเพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร. เกษตรพระจอมเกล้า.

วันวิสา บินสัน. 2550. **กิจกรรมการต้านออกซิเดชันของมันกุ้งจากหัวกุ้งขาว** (*Litopenaeus vannamei*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน. 2547. **มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน มันกุ้ง**. มผช. 324/2547.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, นนทบุรี.

Adler-Nissen, J. 1986. **Enzymatic Hydrolysis of Food Protein.** Vanderblit, New York.

AOAC. 1995. **Official Method of Analysis, 16 ed.** Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.

AOAC. 2000. **Official Method of Analysis, 17 ed.** Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.

Bueno-Solano, C, J. Lopez Cervantes, O.N. Campas-Baypoli, R. Lauterio-Garcia. 2008. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products แหล่งที่มา: http://www.aseanfood.info/Articles/11023608.pdf 13 ตุลาคม 2556

Binsan, W., S. Benjakul, W. Visessanguan, S. Roytrakul, N. Faithong, M. Tanaka and H. Kishimura. 2008. Composition, antioxidative and oxidative rancidity of Mungoong, a shrimp extract paste, from the cephalothorax of white shrimp. **J. Food Lipids** 15:97-118.

Hagen, S.R., B. Frost and J. Augustin. 1989. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 72(6):912-918.

Hasegawa, H. 1987. **Labboratory Manual on Analytical Methods and Procedures for Fish and Fish Products.** Marine Fisheries Research Department Southeast Asian Fisheries Development Center, Singapore.

Haynes, C.A., P. Aloise and A.L. Creagh. 1999. **Process for Producing N-acetyl-D-glucosamine.** U.S. Patent 5,998,173. แหล่งที่มา: http://www.patentstorm.us/patents/5998173.html 7 พฤษภาคม 2553.

Kim, S.K, A.K. Anal, A. Noomhorm and P. Vongswasdi. 2013. Protein hydrolysates and bioactive peptides from seafood and crustacean waste: Their extraction, bioactive properties and industrial perspectives p 716. *In* S.K Kim ed. **Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications**, John Wiley and Sons, Ltd. UK.

Laemmli, U.K.1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, **Nuture**: 277: 680–685.

Mojarrad, J.S., M. Nemati, H. Valizadeh, M.Ansarin and S. Bourbour. 2007. Preparation of glucosamine from exoskeleton of shrimp and predicting production yield by response surface methodology. **J. Agric. Food Chem**. 55(6): 2246-2250.

Naczk, M. and F. Shahidi. 1990. Chemical composition and chitin content of Crustacean offal., pp 299-304. *In* M.S. Voigt and J.R. Botta eds. **Advances in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased Profitability**. Technomic Pub., Lancaster, PA USA.

Pan,B.S. 1989 Recovery of shrimp waste for flavourant. pp 437-447, In N. Michael and J. Richard eds. **Advances in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased Profitability**. Taiwan.

Rajapakakse, N., E.Mendts, W.K. Jung, J.Y.Je and S.K. Kim. 2005. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. **Food Res. Int.** *38*, 175–182.

Ronald, M. 2010. **Handbook of Microbiological Media**. 4th edition. Atlas Publisher: CRC Press, USA, 2040p.

San-Lang W. and H. Jau-Ren. 2001. Microbial reclamation of shellfish wastes for the production chitinases. **Enz. Microbiol. Tech**. 28:376-382.

Van de Loo, H.M. 1976. An improve method for the quantitative determination of hexosamine according to Elson and Morgan. **Anal. Biochem**. 76:556-560.

Wakunaga, M. and Y. Nishimura. 1987. **Microorganism of new species of genus Streptomyces and use thereof for production of chitinase**. U.S. Patent 4,686,185. แหล่งที่มา: http://www.wikipatents.com/4686185.html 7 พฤษภาคม 2553.

Wikipedia the free encyclopedia. 2009. **Plate count agar**. แหล่งที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/Plate_count_agar. 7 พฤษภาคม 2553.

ภาคผนวก

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 1 ค่าทางสถิติของการเปรียบเทียบปริมาณ %TS %TSS ร้อยละปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและร้อยละปริมาณไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน ร้อยละเถ้า ปริมาณ glucosamine ในส่วนของเหลว ที่ได้จากการหมักหัวกุ้งที่ชนิดกรดอินทรีย์และเวลาต่างๆกัน

Variables	SOV	df	SS	MS	F-Value	Sig.
%TS	TIME	2	1287.150	643.575	164.732**	.00
	ACID	1	824.026	824.026	210.921**	.000
	ACID * TIME	2	64.500	32.250	8.255**	.001
	Error	42	164.085	3.907		
	Total	48	39334.959			
% TSS	TIME	2	5.147	2.574	7.665**	.001
	ACID	1	99.677	99.677	296.865**	.000
	ACID * TIME	2	6.030	3.015	8.980**	.001
	Error	42	14.102	.336		
	Total	48	1915.309			
%TN	TIME	2	2.064	1.032	37.446**	.000
	ACID	1	.123	.123	4.460*	.041
	ACID * TIME	2	.073	.036	1.323^{ns}	.278
	Error	38	1.047	.028		
	Total	44	121.268			
% NPN	TIME	5	.796	.398	11.370**	.000
	ACID	1	.536	.536	15.306**	.000
	ACID * TIME	2	.112	.056	1.596^{ns}	.216
	Error	1	1.331	.035		
	Total	2	63.366			

หมายเหตุ ns = Not significantly different at the confidence intervals of 95% ($p > 0.05$)

* = Significantly different at the confidence intervals of 95% ($p < 0.05$)

** = Highly significantly different at the confidence intervals of 99% ($p < 0.01$)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Variables	SOV	df	SS	MS	F-Value	Sig.
% Ash	TIME	2	18.575	9.288	18.833**	.000
	ACID	1	.116	.116	.235^{ns}	.631
	ACID * TIME	2	.073	.037	.074^{ns}	.928
	Error	38	18.740	.493		
	Total	44	316.302			
pH	TIME	2	3.533	1.767	102.525**	.000
	ACID	1	12.332	12.332	715.742**	.000
	ACID * TIME	2	.238	.119	6.898**	.003
	Error	42	.724	.017		
	Total	48	475.321			
Glucosamine	TIME	2	7.079E-05	3.540E-05	1.742^{ns}	.188
	ACID	1	2.408E-05	2.408E-05	1.185^{ns}	.283
	ACID * TIME	2	1.542E-06	7.708E-07	.038^{ns}	.963
	Error	42	.001	2.032E-05		
	Total	48	.006			

หมายเหตุ ns = Not significantly different at the confidence intervals of 95% ($p > 0.05$)

* = Significantly different at the confidence intervals of 95% ($p < 0.05$)

** = Highly significantly different at the confidence intervals of 99% ($p < 0.01$)