การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้การปรับเปลี่ยนบรรยากาศ

นางสาว เนตรนรินทร์ ขุนสูงเนิน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-533-254-2

Quality Change of Tilapia Fillets Stored Under Modified Atmosphere

Miss Netnarin Khunsoongnern

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Master of Science in Food Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2003

ISBN 974-533-254-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้การปรับเปลี่ยนบรรยากาศ

สภามหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……..
(รองศาสตราจารย์ ดร. กนกอร อินทราพิเชฐ)
ประธานกรรมการ

……..
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวรรณ กาสลัก)
อาจารย์ที่ปรึกษา

…….
(รองศาสตราจารย์ ดร. กนกอร อินทราพิเชฐ)
กรรมการ

……..
(อาจารย์ เภสัชกร ดร. เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ)
กรรมการ

…….
(รองศาสตราจารย์ ดร. ทวิช จิตรสมบูรณ์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

……..
(รองศาสตราจารย์ ดร. กนกอร ผลารักษ์)
คณบดี สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

เนตรนรินทร์ ขุนสูงเนิน : การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้การปรับเปลี่ยนบรรยากาศ (Quality Change of Tilapia Fillets Stored Under Modified Atmosphere) อ. ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวรรณ กาสลัก, 105 หน้า
ISBN 974-533-254-2

การติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้การปรับเปลี่ยนบรรยากาศมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2), ไนโตรเจน (N_2) และอุณหภูมิ เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและรักษาคุณภาพความสดของเนื้อปลานิล ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดที่นิยมเพาะเลี้ยงมากที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยบรรจุเนื้อปลานิล (*Oreochromis niloticus*) อายุ 4-5 เดือน ในถุงพลาสติกโพลีเอไมด์ที่รีดร่วมด้วยโพลีเอทิลีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (PA/LDPE) และเปรียบเทียบอายุการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นจากการใช้ CO_2 และ N_2 ที่ความเข้มข้นดังนี้ 25% CO_2: 75% N_2, 50% CO_2: 50% N_2,75% CO_2: 25% N_2, 100% CO_2 และบรรยากาศปกติ ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0, 4 และ 10 องศาเซสเซียส โดยทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณก๊าซในภาชนะบรรจุ การสูญเสียน้ำหนัก (%) ไตรเมทิลเอมีน (TMA) ปริมาณไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB-N) %K- value ความเป็นกรด-ด่าง (pH) การเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียและจุลินทรีย์ก่อโรค

ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์และอุณหภูมิมีผลต่ออายุการเก็บรักษาเนื้อปลาอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) โดยที่สภาวะ 75% CO_2: 25% N_2 ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซสเซียส สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้นานที่สุดคือ ไม่เกิน 37 วัน โดยพิจารณาจากเกณฑ์คุณภาพทางกายภาพ, เคมี และจุลินทรีย์ และตัวอย่างยังมีความปลอดภัยจากการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ในขณะที่ตัวอย่างที่เก็บภายใต้บรรยากาศปกติ เก็บได้เพียง 10 วัน ที่อุณหภูมิเดียวกัน

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนักศึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

NETNARIN KHUNSOONGNERN : QUALITY CHANGE OF TILAPIA FILLET STORED UNDER MODIFIED ATMOSPHERE THESIS ADVISOR :
ASSIST. PROF. PIYAWAN GASALUCK, Ph.D. 105 PP.
ISBN 974-533-254-2

Monitoring the quality change of Tilapia fillet (*Oreochromis niloticus*)stored under modified atmosphere packaging (MAP) has been studying the effect of carbon dioxide (CO_2), nitrogen (N_2) and storage temperature for extend shelf life and keep Tilapia fillets freshness which widely feed in northeast of Thailand. The Tilapia fillets at the age period of 4-5 months were placed in Polyamide laminated with Low-Density Polyethylene (PA/LAPE) bag and compared the shelf life, which increased by applying the ratio of CO_2:N_2 as these following; 25% CO_2: 75% N_2, 50% CO_2: 50% N_2, 75% CO_2: 25% N_2, 100% CO_2 and normal air at low temperature 0, 4 and 10 $^{\circ}$C. Monitoring gas concentration, %weight loss, Trimethylamine (TMA), Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N), %K-value, pH and Spoilage and Pathogenic bacteria counts was performed.

The result of this research showed that the shelf life of fillets was lengthened ($p<0.01$) whilst increasing the percentage of CO_2 combine decreasing storage temperature refer the criteria of physical, chemical and microbial count. At 75% CO_2: 25% N_2 at 0°C is the most suitable condition giving shelf life 37 days and no growth of pathogenic microorganisms were found, while normal air condition is 10 days at the same storage temperature. The shelf life of this product concern with physical, chemical and microbial indicator.

สาขาวิชา เทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนักศึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้จะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงด้วยดี หากไม่ได้รับการอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวรรณ กาสลัก ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ช่วยเหลืออย่างดียิ่งทั้งในส่วนของเนื้อหาโครงร่างวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ และตรวจสอบวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเวทย์ นิงสานนท์ และรองศาสตราจารย์ ดร. กนกอร อินทราพิเชฐ อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ที่กรุณาให้คำปรึกษาโครงร่างวิทยานิพนธ์และตรวจสอบวิทยานิพนธ์ รวมถึง อาจารย์เภสัชกร ดร. เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จตุพร วิทยาคุณ อาจารย์ประจำสำนักวิชา วิทยาศาสตร์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาด้านวิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ ตรวจสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์ และวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และพนักงานประจำอาคารเครื่องมือ 1 และ 3 ที่กรุณาให้ความดูแลและบริการอุปกรณ์และเครื่องมือตลอดการทำวิทยานิพนธ์ ขอบคุณบัณฑิตศึกษาทุกท่านที่ให้กำลังใจมาโดยตลอด

และการทำวิจัยในครั้งนี้สามารถดำเนินการได้อย่างสมบูรณ์ โดยการรับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การเลี้ยงดูอบรม และส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดีตลอดมา จนทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จจนถึงทุกวันนี้

เนตรนรินทร์ ขุนสูงเนิน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)……ง
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)……จ
กิตติกรรมประกาศ……ฉ
สารบัญ……..ช
สารบัญตาราง……....ญ
สารบัญรูปภาพ……..……ฎ
บทที่

1. บทนำ……1
1.1 ความสำคัญของงานวิจัย……...……..1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย……..2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย……...2
1.4 สมมติฐานของการวิจัย……...2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……3
1.6 คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ……3
2. **ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**……..4
2.1 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลาในระหว่างการเก็บรักษา……..4
2.2 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพ……6
2.3 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมี……7
2.3.1 ไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ (Trimethylamine oxide : TMAO), ไตรเมทิลเอมีน (Trimethylamine :TMA) และ ไดเมทิลเอมีน (Dimethylamine : DMA)……7
2.3.2 สารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N)……8
2.3.3 %K-Value……8

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.4 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด – ด่าง (pH)……11
2.4 แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุในการเน่าเสียของปลา……11
2.4.1 แบคทีเรียทั่วไป (Microbial flora) ในปลาสด……...11
2.4.2 จุลินทรีย์ก่อโรคทั่วไป (Pathogen flora) ในปลาสด……..11
2.5 ลักษณะการเน่าเสียของปลา……..12
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อชนิดและอัตราเร็วของการเสียของปลา……..13
2.7 การบรรจุภายใต้การปรับเปลี่ยนบรรยากาศ ……..14
2.7.1 การบรรจุแบบปรับบรรยากาศ
(Modified Atmosphere Packaging :MAP)……...14
2.7.2 การบรรจุแบบควบคุมสัดส่วนก๊าซให้คงที่
(Control Atmosphere Packaging :CAP)……..15
2.7.3 การบรรจุแบบสุญญากาศ (Vacuum Packaging :VP)……...16
2.8 ก๊าซที่ใช้ในการบรรจุแบบปรับเปลี่ยนบรรยากาศ……16
2.9 ภาชนะบรรจุที่ใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในสภาพปรับบรรยากาศ…….18
2.10 ข้อดี ข้อเสียของการบรรจุแบบปรับบรรยากาศ……20
2.11 การประยุกต์ใช้เทคนิคการปรับบรรยากาศ (MAP) ในปลา……21
3. วัสดุ และ วิธีการทดลอง……31
3.1 วิธีทดลอง……...31
3.1.1 วัตถุดิบและเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์……...31
3.1.2 การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss)……31
3.1.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)……..32
3.1.4 ปริมาณก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์, ออกซิเจน และไนโตรเจน…….32
3.1.5 วิเคราะห์ปริมาณไตรเมทิลเอมีน (Trimethyamine : TMA)
ด้วยการวัดการดูดกลืนแสง……..……...……33

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1.6 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total Volatile Basic Nitrogen :TVB-N) ด้วยวิธีการกลั่น ……..33
3.1.7 %K-Value…….34
3.1.8 คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ ……..35
3.1.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ……38
4. ผลการทดลองและอภิปรายผล……...39
4.1 ผลการตรวจวัดดัชนีคุณภาพ (chemical indicator) ที่ยอมให้มีได้สูงสุด……...39
4.2 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพ……..…40
4.2.1 ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์,ออกซิเจนและไนโตรเจน……...40
4.2.2 การสูญเสียน้ำหนัก……42
4.3 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมี……44
4.3.1 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)…….44
4.3.2 %K-Value……..49
4.3.3 ปริมาณไตรเมทิลเอมีน (Trimethyamine : TMA)……...53
4.3.4 ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N)……56
4.4 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลินทรีย์……58
5. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ……65
รายการอ้างอิง…...……67
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ……74
ภาคผนวก ข ปริมาณก๊าซออกซิเจน ไนโตรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์……..78
ภาคผนวก ค ตารางวิเคราะห์วาเรียนซ์ (ANOVA)…...…….87
ประวัติผู้เขียน……104

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 สารประกอบที่ก่อให้เกิดกลิ่นรสผิดปกติที่ผลิตขึ้นจากการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ระหว่างการเก็บรักษาภายใต้ สภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic condition) ที่อุณหภูมิ 4°C ……..5

2.2 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเน่าเสียของปลา……12

2.3 องค์ประกอบของบรรยากาศปกติ วัดที่ระดับน้ำทะเล……15

2.4 อัตราส่วนของก๊าซที่ใช้ในการบรรจุแบบปรับบรรยากาศในปลาชนิดต่างๆ……..22

2.5 วันที่ตรวจพบสารพิษ (toxin) และ การเน่าเสียที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนคุณภาพทางประสาทสัมผัส (organoleptic spoilage) ในปลาที่ inoculate สปอร์ของ *C. botulinum* สายพันธุ์ E และเก็บไว้ที่สภาวะแตกต่างกัน……..28

2.6 วันที่ตรวจพบสารพิษ (toxin) และ การเน่าและเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางประสาทสัมผัส (organoleptic spoilage) ในเนื้อปลาดุก (catfish fillets) ที่ inoculate สปอร์ของ *C. botulinum* สายพันธุ์ E (100 สปอร์/กรัม ตัวอย่าง) และเก็บไว้ที่สภาวะแตกต่างกัน……..29

4.1 ดัชนีบ่งบอกคุณภาพของเนื้อปลาที่ยอมให้มีได้สูงสุด…..……39

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลา
และคะแนนที่ได้จากการประเมินด้วยคุณภาพทางประสาทสัมผัส……6

2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพทางประสาทสัมผัสและปริมาณสารประกอบ
ไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total Volatile Basic Nitrogen : TVB-N)
และ ไตรเมทิลเอมีน (TMA) ที่มีอยู่ในเนื้อปลาระหว่างการเก็บรักษา……9

2.3 เอนไซม์ที่มีบทบาทในการสลายตัวของ ATP ในเนื้อปลา……10

2.4 จำนวนจุลินทรีย์ทั่วไป (micro flora) ภายใต้สภาวะการเก็บรักษา
(a) สภาวะที่มีออกซิเจน(aerobic) (b) การปรับเปลี่ยนบรรยากาศ (MAP)
(80% CO_2:20% N_2) และ เก็บรักษาปลาเรนโบว์ เทราซ์ rainbow trout ที่ 5°C……23

2.5 จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด (Total viable count) ( ), lactobacilli
(■),Enterobacteriaceae (o), *Brochothrix thermosphacta* (Δ) ในปลาทูน่าแช่เย็นที่
อุณหภูมิ 4°C เมื่อเก็บไว้ในอากาศปกติ (A) และ (B) MAP (60% CO_2/40%O_2)……24

2.6 จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด (total viable counts) ใน เนื้อปลาดุก (catfish fillets)
ที่บรรจุใน ฟิล์มที่มีความสามารถในการอุ้มก๊าซสูง (high barrier film) และเก็บไว้
ในสภาวะต่างๆ……25

2.7 การเจริญของ *Shewanella putrefaciens* ในปลาที่บรรจุภายใต้สภาวะ
การปรับบรรยากาศ ที่ สภาวะต่างๆ และ เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 7° C นาน 7 วัน …….26

2.8 ปริมาณไตรเมทิลเอมีน (TMA) ที่ผลิตขึ้นจาก *Shewanella putrefaciens* ในปลา
ที่บรรจุภายใต้ MAP ที่สภาวะต่างๆ เก็บที่อุณหภูมิ 7° C นาน 7 วัน……...27

4.1 ระยะเวลาที่ก๊าซที่บรรจุในภาชนะบรรจุถูกหน่วงในคอลัมน์ (retention time)
ของก๊าซออกซิเจน, ไนโตรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยก๊าซโครมาโทกราฟฟี
(gas chromatography) ……...41

4.2 ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ภายในภาชนะบรรจุเนื้อปลานิลภายใต้สภาวะต่างๆ……43

4.3 การสูญเสียน้ำหนัก (%weight loss) ในเนื้อปลานิล ซึ่งเก็บรักษาภายใต้สภาวะต่างๆ……..45

4.4 การเปลี่ยนแปลง pH ในเนื้อปลานิล ซึ่งเก็บรักษาภายใต้สภาวะต่าง……...47

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.5 retention time ของ สารประกอบนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ซึ่งทำการแยก
ด้วย High Performance Liquid Chromatography : HPLC ด้วยคอลัมน์ μBondapak
RP-C18 stainless-steel ……50
4.6 การเปลี่ยนแปลง %K-Value ในเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้สภาวะต่างๆ……52
4.7 ปริมาณไตรเมทิลเอมีนในเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้สภาวะต่างๆ……55
4.8 ปริมาณไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมดในเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้สภาวะต่างๆ…..57
4.9 จำนวนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศทั้งหมด (Total anaerobic count)
ในเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้สภาวะต่างๆ……...59
4.10 ความแตกต่างของโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบและ แกรมบวก……..60
4.11 จำนวนแลคติก แอซิค แบคทีเรียในเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้สภาวะต่างๆ……63
5.1 กราฟ 3 มิติ แสดงแนวโน้มของอายุการเก็บรักษาที่เกิดจากการเก็บรักษาภายใต้
สัดส่วนของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และอุณหภูมิต่างๆ ……..65

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของงานวิจัย

ปลาน้ำจืด เป็นแหล่งอาหารที่สำคัญ และก่อให้เกิดอุตสาหกรรมประมง ซึ่งมีส่วนสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาประเทศ จากการสำรวจในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่า จังหวัดนครราชสีมาเป็นจังหวัดที่มีผู้ประกอบอาชีพเลี้ยงปลาน้ำจืดและมีปริมาณปลาน้ำจืดมากเป็นอันดับ 2 รองจากจังหวัดขอนแก่น ในปี พ.ศ. 2542 มีปริมาณสัตว์น้ำจืดที่จับได้ 14,290 ตัน และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น (กรมประมง, 2542) ซึ่งปลาน้ำจืดที่นิยมเลี้ยง คือ ปลานิล (23.20%) ปลาตะเพียน (17.75%) ปลาดุก (11.10%) ปลาช่อน (5.35%) และปลาอื่นๆ เช่น ปลาจีน ปลาสลิด ปลาชะโด เป็นต้น ส่วนใหญ่นิยมบริโภคปลาในรูปของปลาสด (85.7%) (วิไลภรณ์ สุทธานุลักษณ์, 2537)

สาเหตุที่ปลานิล (ชื่อพื้นเมือง : นิล, ชื่อวิทยาศาสตร์: *Oreochromis niloticus*, ชื่อสามัญ: Tilapia) ได้รับความนิยมเลี้ยงเนื่องจาก เป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว มีความแข็งแรง และสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี ราคาของปลานิลสดทั้งตัวประมาณ 30-40 บาทต่อกิโลกรัมขึ้นอยู่กับความสด ขนาด น้ำหนัก และ ฤดูกาล ในสภาพปัจจุบันการเก็บรักษาปลานิลสดระหว่างลำเลียงไปสู่ตลาด มักใช้เข่งบุด้วยถุงพลาสติกหรือใบตองรองพื้นด้วยเกล็ดน้ำแข็ง แล้ววางปลาสลับกับน้ำแข็งเป็นชั้นๆ (วิทย์ ธารชลานุกิจ, 2538) ซึ่งเป็นสภาวะการขนส่งและเก็บรักษาที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ส่งผลทำให้อายุการเก็บรักษาปลานิลสั้นลง และในปัจจุบันพบว่า ได้มีผู้จำหน่ายบางรายลักลอบใช้สารฟอร์มาลินเพื่อรักษาความสด ทำให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคและผู้จำหน่าย (มยุรี จัยวัฒน์, 2542) อีกทั้งปลาเป็นอาหารที่เน่าเสียได้ง่าย อายุการเก็บรักษาสั้น รูปแบบในการจำหน่ายไม่หลายหลาย การส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศหรือพื้นที่ไกลๆ ยังถูกจำกัด (พูลทรัพย์ วิรุฬหกุล, 2543)

พบว่าสาเหตุหลักของการเน่าเสียของเนื้อปลานั้นเกิดจากการเจริญและกิจกรรมของแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ (aerobic bacteria) หรือแบคทีเรียที่ต้องการอากาศเล็กน้อย (facultative bacteria) ส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส, ลักษณะทางกายภาพ, คุณภาพทางเคมี และคุณค่าทางโภชนาการ (Ashie, Smith, and Simpson, 1996) ดังนั้นหากสามารถยับยั้งหรือชะลอการเจริญของแบคทีเรียเหล่านี้ได้ จะส่งผลต่อการยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อปลา ซึ่งการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเหล่านั้น สามารถใช้เทคนิค การบรรจุแบบปรับเปลี่ยนบรรยากาศ (Modified Atmosphere Packaging : MAP) เนื่องจากเทคนิคนี้เป็นการลดหรือจำกัดปริมาณก๊าซ

ออกซิเจนที่มีอยู่ในภาชนะบรรจุให้ต่ำลง จึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียในอาหารได้ (งามทิพย์ ภู่วโรดม, 2538) อีกทั้งเทคนิคนี้ยังเป็นที่ยอมรับและนำมาใช้ยืดอายุการเก็บรักษาอาหารหลายชนิด เช่น ผัก-ผลไม้ (Petran, Sperber, and Davis, 1995) ผลิตภัณฑ์นม (Eliot and Emond, 1998) เนื้อสัตว์ (Holly, Gariepy, and Gagnon, 1994) ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ (Daifas, Smith, and Austin, 1999) รวมทั้งปลาและอาหารทะเล (Bank, Nickelson, and Finne, 1980, Gram and Huss, 1996, Gould, 1995)

ในปัจจุบันพบว่า ส่วนแบ่งทางการตลาดของเนื้อปลาบรรจุภายใต้สภาวะการปรับเปลี่ยนบรรยากาศมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น แต่ในประเทศไทยนั้นเทคนิคนี้กลับยังไม่แพร่หลายมากนัก อาจเป็นเพราะมีต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้น แต่ถ้าเรามีการส่งเสริม ทดลองและวิจัย ทำให้เทคนิคนี้เป็นที่นิยมแพร่หลายมากขึ้น จะทำให้สามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีรูปแบบในการจำหน่ายหลากหลาย ยืดอายุการเก็บรักษาและสามารถส่งเป็นสินค้าออกไปยังตลาดต่างประเทศและในพื้นที่ไกลๆ

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 หาอัตราส่วนของก๊าซที่เหมาะสมในการเก็บรักษาปลานิลด้วยเทคนิคการบรรจุแบบปรับบรรยากาศ (MAP) ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและรักษาคุณภาพของปลานิลให้ยังคงความสดและเป็นที่ต้องการของผู้บริโภคตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา อีกทั้งยังมีความปลอดภัยจากการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogenic microorganisms)

1.2.2 เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพ, เคมี และจุลินทรีย์ในตัวอย่างเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้การปรับเปลี่ยนบรรยากาศ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 หาอัตราส่วนของก๊าซและอุณหภูมิในการเก็บรักษาที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากคุณภาพทางเคมีและจุลินทรีย์

1.3.2 ติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพ เคมีและจุลินทรีย์

1.4 สมมุติฐานของการวิจัย

การบรรจุแบบปรับบรรยากาศโดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และไนโตรเจนในอัตราส่วนที่เหมาะสมร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำสามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาปลานิลสด และยังคงคุณภาพทางด้าน กายภาพ, เคมีและจุลินทรีย์ทั้งที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียและจุลินทรีย์ก่อโรค

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถยืดอายุและรักษาคุณภาพความสด ของเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้การปรับเปลี่ยนบรรยากาศ เป็นการเพิ่มรูปแบบการจำหน่ายเนื้อปลา เพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ เพิ่มพื้นที่การจำหน่ายทั้งภายในและต่างประเทศ และเป็นแนวทางในการนำสภาวะที่ได้จากการทดลองไปใช้กับเนื้อปลาและผลิตภัณฑ์จากปลาน้ำจืด เช่น ปลาส้ม เพื่ออีกทางเลือกในการยืดอายุการเก็บรักษา

1.6 คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ

$^{\circ}C$	=	องศาเซสเซียส
mg	=	มิลลิกรัม
g	=	กรัม
TMA	=	ไตรเมทิลเอมีน (Trimethyamine)
DMA	=	ไดเมทิลเอมีน (Dimethylamine)
TVB-N	=	สารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด
O_2	=	ก๊าซออกซิเจน
CO_2	=	ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
N_2	=	ก๊าซไนโตรเจน
MAP	=	การบรรจุแบบปรับเปลี่ยนบรรยากาศ (Modified Atmosphere Packaging)
ml	=	มิลลิลิตร
m^3	=	ตารางเมตร
hr	=	ชั่วโมง
atm	=	บรรยากาศปกติ
O.D.	=	เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก
min	=	นาที
rpm	=	ความเร็วรอบต่อนาที
i.d.	=	เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน
μl	=	ไมโครลิตร
CFU	=	Colony Forming Unit
μm	=	ไมโครเมตร
M	=	ความเข้มข้นของสารละลาย หน่วยเป็น โมลาร์

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลาในระหว่างการเก็บรักษา

ปลาเป็นอาหารที่เน่าเสียได้เร็วมาก การเน่าเสียเกิดจากการสลายตัวของโปรตีนด้วยเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวปลา (autolysis) การรวมตัวกับออกซิเจนของไขมัน ทำให้เกิดกลิ่นหืน และการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ (สุมาลี เหลืองสกุล, 2527, Dalgaard, Gram, and Huss, 1993, Pieriovanni and Fava, 1993) ดังนั้น จึงจำเป็นต้องถนอมปลาโดยเร็วหลังจากจับปลาได้

ภายหลังจากปลาตายใหม่ๆ จะเกิดการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ (rigor mortis) ระยะนี้มีความสำคัญมาก เนื่องจากเป็นระยะที่ยังไม่เกิดการสลายตัวของโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจนโดยเอนไซม์ของปลาเอง และจุลินทรีย์ยังไม่สามารถใช้เนื้อปลาเป็นอาหารได้ ดังนั้นถ้าเรายืดช่วงระยะนี้ให้ยาวออกไป ก็จะทำให้ปลามีอายุการเก็บนานขึ้น และอายุการเก็บรักษาจะเพิ่มมากขึ้นถ้าปลาไม่มีการสูญเสียกำลังมากในขณะถูกจับ และการขนส่งปลาทำด้วยความระมัดระวัง (สุมาลี เหลืองสกุล, 2527, Farber, 1991, Fraser and Sumar, 1998) และหลังจากผ่านระยะการเกร็งตัวแล้ว เอนไซม์ที่มีอยู่ภายในตัวปลาและเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ย่อยสลายองค์ประกอบของเนื้อปลาและผลิตสารประกอบที่ระเหยได้ (volatile compound) ซึ่งก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นเน่า นอกจากนี้การย่อยสลายโปรตีนในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน (putrefaciens) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบที่ระเหยและก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นเน่าได้เช่นกัน เช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulphide), เมทิลเมอแคปแทน(methylmercaptan), อินโดล (indole), เอมีน (amine) และแอมโมเนีย (ammonia) ซึ่งการเน่าเสียแบบนี้มักมีสาเหตุจาก *Clostridium spp.* หลายชนิด และ แบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญเล็กน้อย (facultative bacteria) เช่น *Pseudomonas spp.*, *Alcaligenas* และ *Proteus* บางชนิด (Fraser and Sumar, 1998, Gray, Hoover, and Mur, 1983, Manzano-mazorra, Aguilar, Roja, and Sanchez, 2000)

การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลาหลังการจับและหลังจากปลาตาย ขึ้นกับความเข้มข้นของสารประกอบและผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเมทาโบลิซึม ปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวปลา (endogenous enzymes) การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ และสภาวะ-ลักษณะหลังจากการจับปลา โดยปกติการเน่าเสียของปลาเราจะสังเกตเห็นการสูญเสียกลิ่นรสที่แสดงถึงความสด (fresh fish flavor)

เช่น รสหวาน (sweet) รสชาติคล้ายสาหร่าย (seaweedy) หลังจากนั้นกลิ่นเหม็นเน่าและรสที่ผิดปกติก็จะเกิดขึ้น ทำให้ปลาไม่เป็นที่ยอมรับแก่ผู้บริโภค ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สารประกอบที่ก่อให้เกิดกลิ่นรสผิดปกติที่ผลิตขึ้นจากการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ระหว่างการเก็บรักษาภายใต้ สภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic condition) ที่อุณหภูมิ 4°C

จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย	สารประกอบที่สร้างกลิ่นผิดปกติ
Shewanella putrefaciens	TMA, H_2S, CH_3SH, $(CH_3)_2S$, Hx
Photobacterium phosphoreum	TMA, Hx
Pseudomonas spp.	Ketones, aldehydes, esters, non-H_2S sulphide
Vibrionaceae	TMA, H_2S
Anaerobic spoilage bacteria	NH_3, acetic, butyric and propionic acid

หมายเหตุ TMA= trimethylamine, H_2S=hydrogen sulphide, CH_3SH=methylmercaptan, $(CH_3)_2S$=dimethylsulphide, Hx = hypoxanthine, NH_3=ammonia

แหล่งที่มา: Fraser, 1998.

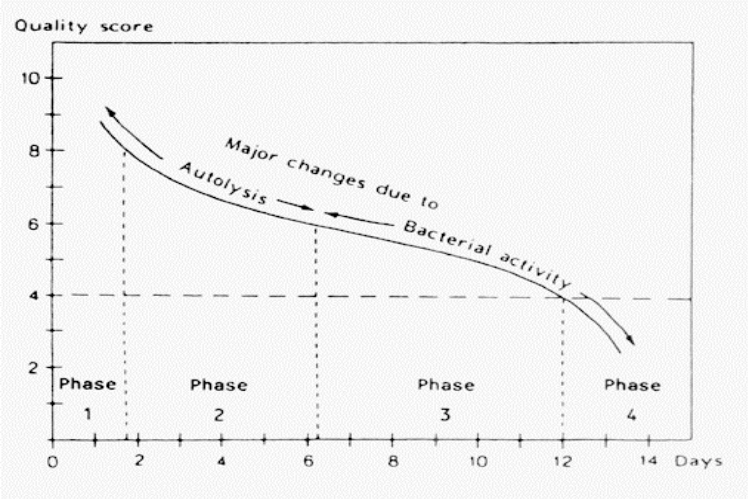
ลักษณะการเน่าเสียของปลาเมื่อเก็บรักษาภายใต้น้ำแข็งแบ่งเป็น 4 ระยะ ดังภาพที่ 2.1

ระยะที่ 1 (phase 1): ปลายังคงมีความสดมาก เนื้อปลายังคงความหวาน รสชาติอร่อย และมีรสคล้ายโลหะ (metallic) เล็กน้อย ส่วนมากระยะนี้อยู่ในช่วง 1-2 วันหลังจากปลาตาย

ระยะที่ 2 (phase 2): เนื้อปลาเริ่มสูญเสียความสดและรสหวาน แต่ยังไม่มีกลิ่นรสที่ผิดปกติและกลิ่นเหม็นเน่าเกิดขึ้น และเนื้อปลายังคงเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

ระยะที่ 3 (phase 3): สามารถสังเกตเห็นลักษณะการเน่าเสีย กลิ่นเหม็นเน่า กลิ่นรสที่ผิดปกติ และสารประกอบที่ระเหยได้ (volatile compound) ต่างๆ จะถูกผลิตขึ้น เช่น ไตรเมทิลเอมีน (Trimethylamine :TMA) เป็นต้น สำหรับปลาที่มีไขมันมากจะเริ่มมีกลิ่นหืนเกิดขึ้น ลักษณะเนื้อสัมผัสของปลาจะเละและมีน้ำเยิ้ม

ระยะที่ 4 (phase 4): ปลาเน่าจนไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค



ภาพที่ 2.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลาและคะแนนที่ได้จากการประเมินด้วยคุณภาพทางประสาทสัมผัส
แหล่งที่มา: Huss, 1976.

2.2 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพ

ลักษณะการเน่าเสียทางกายภาพของเนื้อปลาที่สามารถสังเกตเห็นได้ คือ เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีผิวและเนื้อปลา เป็นผลมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทั้งแบบที่เกิดโดยเอนไซม์ (enzymatic oxidation) และแบบที่เกิดโดยไม่มีเอนไซม์เกี่ยวข้อง (nonenzymatic oxidation) พบว่า สีเหลือง ส้ม แดง หรือ ไม่มีสีของปลาและสัตว์น้ำ เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบคาร์โรทีนอยส์ (carotenoids) ซึ่งมีในผิวหนัง และสีของปลาเนื้อขาว (white fish) อาจเปลี่ยนเป็นสีครีมหรือสีเทา เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบที่เกิดโดยเอนไซม์ของรงควัตถุฮีม (heme pigment) ส่วนกล้ามเนื้อแดง (dark red muscle) จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และพบว่าเนื้อปลาสดจะใส แต่ปลาที่เน่าเสียแล้วเนื้อจะขุ่น บางครั้งการเกิดการเปลี่ยนสีของเนื้อปลา มีสาเหตุจากการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น อาจมีเหลืองออกเขียว ที่เกิดจากการเจริญของ *Pseudomonas fluorescens*, สีเหลืองจาก *Micrococcus*, สีแดงหรือชมพูจาก *Sarcina*, *Micrococcus* และ *Bacillus* หรือจะเกิดจากราหรือยีสต์บางชนิด (Potter and Hotchkis, 1995)

การเปลี่ยนแปลงเนื้อสัมผัส (texture) ของปลา เกิดโดยสูญเสียการสปริงตัว (springiness) และความนิ่มจะเพิ่มขึ้น ปลาเน่าจะมีลักษณะเนื้อยุ่ย (paste-like texture) ซึ่งในระยะแรกของการเก็บรักษา ความนิ่มของเนื้อสัมผัสเกิดจากการย่อยของกล้ามเนื้อและการอ่อนตัวของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) และการเกิดการแยกตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibril) ในระยะหลังเกิดจาก

เอนไซม์โปรทีเอสในตัวปลาและเอนไซม์ประเภทเดียวกันนี้จากแบคทีเรีย (endogenous and bacterial proteinase) จนทำให้เกิดการเน่าเสีย (กนกอร อินทราพิเชฐ, 2538)

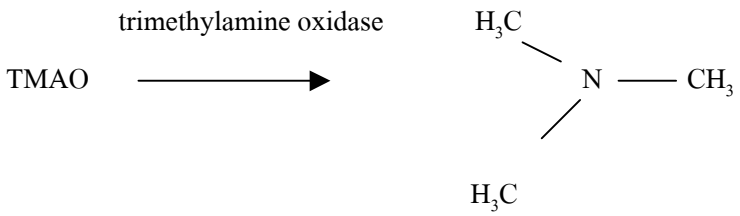
การเปลี่ยนแปลงกลิ่นรสของเนื้อปลาสด พบว่า กลิ่นของเนื้อปลาสดเกิดจากสารประกอบคาร์บอนิล (carbonyl compounds) และแอลกอฮอล์ ซึ่งประกอบด้วย hexanal, 1-octan-3-ol, 1,5-octadien-3-ol และ 2,5 –octadien-1-ol และกลิ่นผิดปกติ (offensive odors) ซึ่งแสดงว่าการเกิดเน่าเสียเกิดจากการย่อยและแตกตัวของกรดอะมิโน cysteine และ methionine ได้สารประกอบ mercaptan, trimethylsulfide และ H_2S กลิ่นเหม็นเน่าเกิดจากสารประกอบ indol, putrescine, cadaverine และ diamines อื่นๆ จากการย่อยกรดอะมิโนของแบคทีเรีย (Potter and Hotchkis, 1995)

2.3 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมี

การติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมี นิยมใช้ดรรชนีคุณภาพทางเคมี (chemical indicators) ซึ่งดัชนีที่นิยมตรวจวัด เพื่อใช้แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงคุณภาพในเนื้อปลามีดังนี้

2.3.1 ไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ (Trimethylamine oxide : TMAO), ไตรเมทิลเอมีน (Trimethylamine :TMA) และ ไดเมทิลเอมีน (Dimethylamine : DMA)

การสลายตัวของสารประกอบที่ไม่ใช่โปรตีนแล้วให้สารระเหยที่ก่อให้เกิดกลิ่นคาวและกลิ่นเหม็นเน่าของปลาและสัตว์น้ำ คือ การเปลี่ยนไตรเมทธิลเอมีนออกไซด์ (TMAO) ซึ่งเป็นสารที่ป้องกันการสูญเสียน้ำออกจากตัวปลา (water logout) พบมากบริเวณผิวหนัง โดย TMAO สามารถเปลี่ยนเป็น ไตรเมทธิลเอมีน (TMA) ด้วยเอนไซม์ไตรเมธิลเอมีน ออกซิเดส (trimethylamine oxidase) จากปฏิกิริยารีดักชันของแบคทีเรีย เช่น *Shewanella putrifaciens* ซึ่งจะได้รับพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญจากการเปลี่ยนแปลง TMAO ไปเป็น TMA ดังแสดงในสมการ



ซึ่ง TMA ที่ผลิตขึ้น ก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นเน่าและมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนแบคทีเรีย, คุณภาพทางประสาทสัมผัสและความสดของปลา และจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ในตัวปลา (endogenous enzyme) จะเปลี่ยน TMAO ไปเป็น DMA และ formaldehyde ดังแสดงในสมการ

$$(CH)_3NO \longrightarrow (CH_3)_2\,NH + HCHO$$

TMAO DMA formaldehyde

จากปฏิกิริยาทั้ง 2 จะทำให้ปริมาณเบสที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total Volatile bases) ค่อยๆ เพิ่มขึ้น โดยปกติ TMAO ที่พบในปลาจะมีปริมาณแตกต่างกัน คือ ในปลาคอดและ ปลาแซลมอล พบประมาณ 1% และ ปลาฉลาม ประมาณ 1.5% ปริมาณ TMA ที่ผลิตขึ้นสามารถใช้เป็นดัชนีคุณภาพทางเคมี (chemical indicator) เพื่อวัดการเสื่อมเสียของปลา ซึ่งกำหนดว่า ปลาที่มีความสดและยังมีคุณภาพดีจะมี TMA น้อยว่า 1.5 mg TMA-N/100g ตัวอย่าง แต่ถ้ามีปริมาณสูงถึง 10-15 mg TMA-N/100g ตัวอย่างจะมีลักษณะเป็นที่ไม่ยอมรับแล้ว เนื่องจากมีกลิ่นเหม็นเน่าและคาวปลาอย่างรุนแรง (Huss, 1998, Debever and Boskou, 1996, Sleat and Robinson, 1984.)

2.3.2 สารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total Volatile Basic Nitrogen :TVB-N)

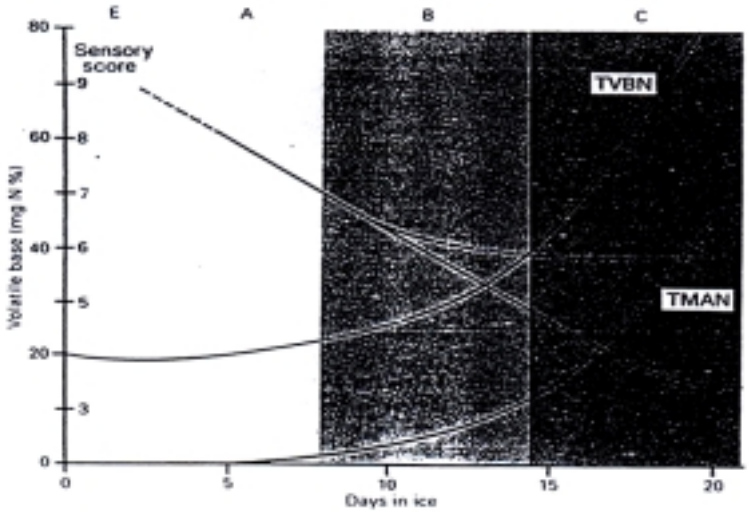
การสลายตัวของสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB-N) จัดเป็นดัชนีคุณภาพทางเคมีค่าหนึ่งที่ใช้วัดความสดของปลา โดยทำการตรวจวัดปริมาณ แอมโมเนีย เอมีน ไตรเมทิลเอมีน (TMA), ไดเมทิลเอมีน (DMA) และสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจน โดยปริมาณ TVB-N ที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กับคุณภาพทางประสาทสัมผัส, คุณลักษณะปรากฏของเนื้อปลาและการเจริญและการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ รวมถึงปริมาณ TMA ด้วย ดังแสดงในภาพที่ 2.2 โดยปริมาณ TVB-N ที่กำหนดให้มีได้สูงสุดในปลาคือ 25-30 mg TVB-N/100g (Ashie et al., 1996, Villarreal and Pozo, 1990)

2.3.3 %K-Value

ภายหลังจากปลาตายจะเกิดการสลายตัวของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ เริ่มต้นที่การกำจัดฟอสเฟต (dephosphorylation) ของ adenosine triphosphate (ATP) ไปเป็น adenosine diphosphate (ADP) และ adenosine monophosphate (AMP) (ดังแสดงในภาพที่ 2.3) จากนั้นเกิดการดึงหมู่แอมโมเนีย (deamination) เป็น Inosine monophosphate (IMP) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของ ATP เป็น IMP จะเป็นขบวนการที่รวดเร็วและจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายใน 3-5 วัน ด้วยเอนไซม์ในตัวปลา จากนั้นเอนไซม์จากจุลินทรีย์ จะทำหน้าที่เปลี่ยนแปลง IMP ให้กลายเป็น Hypoxanthine (Hx),

xanthine และ กรดยูริค (uric acid) แต่ในขั้นตอนนี้จะเกิดช้ากว่า พบว่าการสลายตัวหายไปของ IMP ทำให้เกิดการสูญเสียกลิ่นรสของปลาสดที่เป็นที่ต้องการ (Surette, Gill, and Blanc,1988)

โดยปกติ ATP และ ADP จะทำให้ที่เป็น plasticizer ช่วยป้องกันการเกิดรวมตัว (interaction) ระหว่าง actin และ myosin แต่ภายหลังจากการเกิดการเกร็งตัว (postmortem) ปริมาณ ATP และ ADP ลดลงทำให้เกิดการรวมตัวกันของ actin และ myosin เกิดเป็น actomyosin เนื่องจากไม่มีพลังงานในการแยกสลายพันธะระหว่าง actin และ myosin ทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสของเนื้อปลาเหนียวไม่มีความยืดหยุ่น นอกจากนี้พบว่า IMP ที่เกิดขึ้นจะเป็นสารก่อให้เกิดรสหวานขึ้นในเนื้อปลา แต่ในขณะที่ Ino และ Hx มีบทบาทสำคัญทำให้เกิดรสขม แสดงถึงความไม่สดของปลา โดยปกติ Hx จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเก็บรักษาปลาไว้เป็นเวลานาน ในการประเมินความสดของปลานั้นยอมให้มี Hx ได้ไม่เกิน 1.5 - 2 μmol/g (Parry, 1993)



ภาพที่ 2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพทางประสาทสัมผัสและปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total Volatile Basic Nitrogen : TVB-N) และ ไตรเมทิลเอมีน (TMA) ที่มีอยู่ในเนื้อปลาระหว่างการเก็บรักษา
แหล่งที่มา: Ruiter, 1995

%K-value เป็นค่าการวัดความสดของปลาและสัตว์น้ำ โดยวัดเป็น %อัตราส่วนของปริมาณIno และ Hx ต่อผลรวมของ ATP และสารประกอบอื่นๆ ที่เกิดจากการสลายตัวของ ATP ดังสมการ

$$\%\text{K-Value} = \frac{Hx + Ino}{ATP + ADP + AMP + IMP + Hx + Ino} \times 100$$

ซึ่งปลาสดที่เพิ่งจับมาใหม่ๆ จะมี %K-value ไม่เกิน 10% และในช่วงระยะแรกๆ จะมีการเพิ่มปริมาณอย่างช้าๆ จากนั้นจึงจะเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์ และปริมาณสูงสุดที่ยอมรับได้ (rejection limit) คือ 60% (Burt, 1977)

การวิเคราะห์ปริมาณของนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้นนิยมใช้ HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความเชื่อถือได้ และสามารถวิเคราะห์ปริมาณสารอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นถึงแม้ว่าจะมีปริมาณน้อย โดยจะใช้เวลาประมาณ 12-50 นาที โดยใช้ยูวี ดีเทคเตอร์ (UV detector) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (Ryder, 1985)

ภาพที่ 2.3 เอนไซม์ที่มีบทบาทในการสลายตัวของ ATP ในเนื้อปลา โดยที่ 1. ATP-ase; 2. myokinase; 3. AMP deaminase; 4.IMP phosphohydrolase; 5a. nucleoside phosphorylase; 5b. inosine nucleosidase; 6,7. xanthine oxidase.

แหล่งที่มา: Gill ,1992

2.3.4 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด - ด่าง (pH)

หลังจากปลาตาย จะเกิดการใช้ไกลโคเจน (glycogen) ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic condition) เกิดเป็นกรดแลคติกขึ้น ทำให้ pH ของเนื้อปลาลดลง โดยทั่วไป pH จะลดลงต่ำที่สุดประมาณ 6.2 เพราะปริมาณของไกลโคเจนในเนื้อปลามีน้อย จึงทำให้ปริมาณกรดแลคติกมีไม่มากนัก และหลังจากนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงในช่วงหลังจากระยะการเกร็งตัว (postmortem) จะมีการสลายตัวของสารประกอบไนโตรเจน ที่มีคุณสมบัติเป็นเบส ส่งผลให้ให้ pH ของเนื้อปลาเพิ่มขึ้น โดยอัตราการเพิ่มขึ้นของ pH ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิในการเก็บรักษา (Sikorski, 1990)

2.4 แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุในการเน่าเสียของปลา

2.4.1 จุลินทรีย์ทั่วไป (microflora)

ปลาสดสามารถที่จะปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ทั่วไป (microflora) ในส่วนต่างๆ ได้ เช่น ลำไส้ เนื้อ ผิวหนัง พบว่าจุลินทรีย์ที่แยกออกมาได้จากลำไส้เล็กและผิวหนังปลาส่วนใหญ่ คือ *Pseudomonas* และ *Acinetobacter* (60% isolates) และ *Corynebacterium*, *Flavobacterium* และ M*icrococcus* (20% isolates) และเมือกของปลาจะมีแบคทีเรียพวก *Pseudomonas*, *Alcaligenes, Micrococcus, Flavobacterium, Corynebacterium, Saricina, Serratia, Vibrio* และ *Bacillus* และมักพบว่าจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวปลามักจะเป็นชนิดเดียวกับที่มีอยู่ในแหล่งน้ำที่ปลาอาศัยอยู่ ซึ่งจำนวนและชนิดของ microflora จะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่ปลาอาศัยอยู่ คุณภาพของน้ำ และพันธุ์ปลา (Ray, 1996) เช่น แบคทีเรียที่อยู่บนตัวปลาที่อาศัยอยู่ในเขตหนาวก็จะเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ (psychrotrophic) ปลาที่อยู่ในเขตน้ำอุ่นจะเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophile) และถ้าเป็นปลาน้ำเค็มก็จะพบแบคทีเรียพวก *Aeromonas, Lactobacillus, Brevibacterium, Alcaligenes* และ *Streptococcus* ซึ่งแบคทีเรียที่พบในเหงือกและผิวหนังของปลาจะมีจำนวนตั้งแต่ 10^3-10^5CFU/g (Ashie et al., 1996, Fraber, Warburton, Gour, and Milling, 1990, Molin, Stenstrom, and Ternstrom, 1983)

2.4.2 จุลินทรีย์ก่อโรคทั่วไป (pathogen flora)

แบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) ที่ปนเปื้อนในปลา เช่น *Vibrio parahaemolyticus, V. vulnificus, Listeria monocytogenes, Aeromonas hydrophilla, Yersinia enterocoltica, Clostridium perfringens* และ *C. botulinum* (Fraser and Sumar, 1998) ซึ่งการเจริญและกิจกรรม (activity) ของแบคทีเรียก่อโรคในปลาจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและสุขลักษณะในการเก็บ

รักษา พบว่าการเก็บรักษาปลาไว้ที่อุณหภูมิ <1°C ตลอดเวลา การเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านี้จะถูกยับยั้ง ส่วนใหญ่ปลาและอาหารทะเลมักจำเป็นต้องพิจารณาถึงความปลอดภัยจากการเจริญและการสร้างสารพิษจากแบคทีเรียที่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีน (non-proteolytic) ของ *C. botulinum* โดยเฉพาะ สายพันธุ์ E (Church and Parsons, 1995) เพราะสารพิษที่ผลิตขึ้นก่อให้เกิดอันตรายต่อระบบประสาท (neuroparalytic disease) และ *V. parahaemolyticus* ยังเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในลำไส้และระบบทางเดินอาหาร (gastroenteritis) นอกจากนี้ในระหว่างการเก็บรักษาและขนส่ง ปลาอาจมีการปนเปื้อนกับแบคทีเรียก่อโรค อื่นๆ เช่น *Salmonella typhimurium* และ *Escherichia coli* (Parry, 1993, Richter and Banwart, 1983)

2.5 ลักษณะการเน่าเสียของปลา

โดยปกติการเน่าเสียของปลาจะเริ่มต้นที่ การสูญเสียกลิ่นรสที่บ่งบอกถึงความสดของปลา (fresh fish flavor) หลังจากนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเกิดเป็นกลิ่นรสที่ผิดปกติขึ้น (off-flavor) เช่น กลิ่นเหม็นเน่า, กลิ่นคาวปลา รวมทั้งสารประกอบที่ระเหยได้ต่างๆ พบว่าส่วนของลำไส้ ระบบทางเดินอาหารของปลา และเหงือกเป็นส่วนที่ไวต่อการเน่าเสียมากที่สุด ส่วนใหญ่แล้วจะเกิดจากการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียร่วมกับเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวปลา (endogenous enzyme) ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีบทบาทต่อการเน่าเสียของปลา แสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเน่าเสียของปลา

จุลินทรีย์ทั่วไป	จุลินทรีย์ก่อโรค	จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย
Pseudomonas	*Vibrio paraheamolyticus*	*Pseudomonas*
Acinetobacter	*Listeria monocytogenes*	*Acinetobacter*
Corynebacterium	*Aeromonas hydrophilla*	*Moraxella*
Micrococcus	*Clostridium perfringens*	Alcaligenes
Flavobacterium	*C. botulinum*	

แหล่งที่มา: Fraser and Sumar, 1998

จากรายงานวิจัยพบว่า เนื้อปลาคอด (Cod fillet) แช่เย็นจะมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น เท่ากับ 10^5 เซลล์ต่อกรัม (ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Moraxella, Acinetobacter* และ *Corynebacterium*) หลังจากเก็บที่ 1°C นาน 14 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้นเป็น 2.1×10^8 เซลล์ต่อกรัม และ

สังเกตเห็นการเน่าเสียทางกายภาพอย่างชัดเจน อีกทั้งยังมีปริมาณของการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีเพิ่มสูงขึ้นด้วย (Villemure, Simard, and Picard, 1986)

Cai, Herrison, and Silva (1968) และ Ray Birnet (1996) กล่าวว่า แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในปลา ส่วนมากเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) คือ *Pseudomonas (Alteronomas) putrefaciens*, *Psychrobactor*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella spp*. และ *Vibrio* ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้สามารถย่อยสลายโปรตีน (proteolytic) ด้วยเอนไซม์โปรทีเนส (protease) ให้กลายเป็น เปปไทด์ (peptide) กรดอะมิโน (amino acid) อินโดล (indole) เอมีน (amine) สารประกอบซัลไฟด์ (sulfide compound) และ แอมโมเนีย (ammonia) ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นเน่า นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ไลเปส (lipase) ทำหน้าที่ย่อยสลายไขมันให้กลายเป็นกรดไขมัน (fatty acid) กลีเซอรอล (glycerol) และสารประกอบอื่นๆ ก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นหืนอีกด้วย (Gram and Huss, 1996)

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อชนิดและอัตราเร็วของการเสียของปลา

ชนิดและอัตราเร็วของการเสียของปลาจะแตกต่างกันด้วยปัจจัยดังต่อไปนี้ คือ (Fraser and Sumar, 1998)

2.6.1 ชนิดของปลา

ปลาแต่ละชนิดจะเน่าเสียได้ยากง่ายแตกต่างกัน พบว่า ปลาตัวแบนจะเน่าเสียเร็วกว่าปลาตัวกลม เนื่องจากผ่านระยะการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อได้เร็วกว่า และปลาที่มีไขมันมากจะเสียเร็วเนื่องจากมีไขมันที่ไม่อิ่มตัวจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจน เกิดการเหม็นหืนเกิดขึ้น

2.6.2 สภาพของปลาในขณะถูกจับ

ปลาที่ดิ้นมากในขณะที่ถูกจับจะอ่อนเพลีย ขาดออกซิเจนและบอบช้ำ จึงเสียเร็วกว่าปลาที่ตายทันทีและได้รับการระมัดระวังในการขนส่งเป็นอย่างดี ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการเสียกำลังดิ้นต่อสู้ ทำให้ไกลโคเจนเปลี่ยนไปเป็นกรดแลกติกหมดทำให้ pH ต่ำลง และเมื่อเปรียบเทียบปลาที่มีอาหารเต็มกระเพาะในขณะที่ถูกจับก็จะเสียเร็วกว่าปลาที่ไม่มีอาหารอยู่ในกระเพาะเลย

2.6.3 ชนิดและจำนวนของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับปลาสด

แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียส่วนใหญ่อาจมาจาก โคลน น้ำ เมือก ลำไส้ของปลา และการขนส่ง แบคทีเรียเหล่านี้อาจเข้าไปทางเหงือกผ่านเข้าเส้นเลือด และแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อ หรือมีการแทรกจากลำไส้เข้าสู่เนื้อเยื่อโดยผ่านช่องว่างของลำตัว การเจริญของแบคทีเรียมัก

จะเกิดขึ้นแบบเฉพาะที่ แต่ผลผลิตที่เกิดขึ้นจากการเจริญจะแพร่กระจายไปทั่วปลาอย่างรวดเร็ว และถ้ามีแบคทีเรียปนเปื้อนมามากการเน่าเสียจะเกิดขึ้นเร็วขึ้น ซึ่งการปนเปื้อนอาจมาจากอวนลาก เรือจับปลา ภาชนะบรรจุและโรงงาน ปลาตัวกลมที่ไม่ได้ชำแหละเอาไส้ออกและมีการปนเปื้อนกับแบคทีเรียในลำไส้จะมีกลิ่นเหม็น เมื่อมีการสลายตัวของอาหารในลำไส้ และผลผลิตที่เกิดขึ้นจะแพร่เข้าไปในเนื้อปลา ซึ่งกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเอนไซม์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารจะทำการย่อยสลายผนังลำไส้ การชำแหละไส้ทิ้งบนเรือจับปลาจะทำให้แบคทีเรียจากลำไส้และจากเมือกกระจายไปยังส่วนต่างๆ ของปลาได้และการแตกช้ำของผิวหนังปลาไม่ว่าจะเป็นแบบใดก็ตามจะทำให้การรักษาคุณภาพของปลาทำได้ลำบากมาก

2.6.4 อุณหภูมิ

การแช่เย็นปลา เป็นวิธีที่ใช้กันมากที่สุดในการป้องกันการเจริญของแบคทีเรีย การแช่เย็นปลาควรทำให้เร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้โดยให้มีอุณหภูมิ 0- -1°C และ คงที่ไว้ที่อุณหภูมิระดับนี้ตลอด ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้น อายุการเก็บของปลาจะสั้นลง ซึ่งแช่เยือกแข็งปลาอย่างรวดเร็ว จะทำให้การถนอมรักษาและอายุการเก็บรักษาปลาเพิ่มขึ้น

2.7 การบรรจุภายใต้สภาวะการปรับเปลี่ยนบรรยากาศ

การบรรจุอาหารภายใต้สภาวะการปรับแปลงบรรยากาศ สามารถแบ่งได้เป็น

2.7.1 การบรรจุแบบปรับบรรยากาศ (Modified Atmosphere Packaging :MAP)

เป็นการบรรจุอาหารภายใต้สภาวะการปรับเปลี่ยนบรรยากาศ โดยการดึง O_2 ออกจากภาชนะบรรจุ และแทนที่ด้วยก๊าซผสม (mixed gas) หรือ ก๊าซชนิดเดียว (single gas) ให้มีอัตราส่วนแตกต่างจากบรรยากาศปกติ (ตารางที่ 2.3) และควบคุมอัตราส่วนของก๊าซให้คงที่ในช่วงแรก แต่ในระหว่างการเก็บรักษาสัดส่วนของก๊าซในภาชนะบรรจุจะเปลี่ยนแปลงไปตลอดระยะเวลาการเก็บ เนื่องจาก การซึมผ่านเข้า-ออกของก๊าซ กิจกรรมของจุลินทรีย์ และการหายใจของผลิตภัณฑ์ อัตราส่วนของก๊าซที่ใช้ในการบรรจุชนิดนี้จะขึ้นอยู่กับ ชนิดของผลิตภัณฑ์ และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย (Church, 1994, Conye, 1932)

การบรรจุแบบปรับบรรยากาศ (Modified Atmosphere Packaging : MAP) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่เป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวาง ในแง่สามารถยืดอายุการเก็บรักษาอาหารได้นานขึ้น และถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารหลายชนิด เพื่อที่จะควบคุมและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ (undesirable microorganism) ทั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย (spoilage bacteria) เช่น

Pseudomonas, Enterobacteriaceae, *Acinetobacter*, *Moraxella* (Fraser and Sumar, 1998) และแบคทีเรียก่อโรค (pathogenic microorganism) เช่น *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* (Reddy, 1995, Church and Parson, 1995) โดยลดอัตราการเจริญ (growth rate) และเพิ่มระยะเวลาในช่วงการปรับตัว(lag phase) ของจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญ (aerobic microorganism)ให้นานขึ้น แต่การเก็บรักษาภายใต้สภาวะนี้ จะสนับสนุนการเจริญของ lactic acid bacteria สายพันธุ์ *Lactobacillus spp*. และอาจเสี่ยงต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *C. botulinum* นอกจากนี้พบว่าการใช้ CO_2 ในปริมาณสูง สามารถยืดยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียในปลาเรนโบว์เทราซ์ (rainbow trout) (Reddy, 1994) และเนื้อปลาแฮร์ริ่ง (herring fillets) (Molin et al., 1983)

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของบรรยากาศปกติ วัดที่ระดับน้ำทะเล

ก๊าซ	เปอร์เซ็นต์ (%)
Nitrogen (N_2)	78.03
Oxygen (O_2)	20.99
Argon (Ar)	0.94
Carbon dioxide (CO_2)	0.03
Hydrogen (H_2)	0.01

แหล่งที่มา: Parry, 1993

ในปัจจุบันนี้จะเห็นได้ว่าส่วนแบ่งทางการตลาดของปลาบรรจุแบบปรับเปลี่ยนบรรยากาศมีการขยายตัวอย่างรวดเร็วในต่างประเทศ เนื่องจาก ผู้บริโภคต้องการบริโภคอาหารสด หรืออาหารแช่เย็นที่ไม่ต้องการการเติมสารถนอมอาหาร (preservative) และเทคนิคนี้ยังสามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาอาหารได้ถึง 50-400 % ช่วยรักษาความสดและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ (งามทิพย์ ภู่วโรดม, 2538, Church, 1994, Parry, 1993, Gould, 1995)

2.7.2 การบรรจุแบบควบคุมสัดส่วนก๊าซให้คงที่ (Controlled Atmosphere Packaging : CAP)

เป็นการบรรจุอาหารภายใต้สภาวะการปรับเปลี่ยนบรรยากาศ โดยการดึง O_2 ออกจากภาชนะบรรจุ และแทนที่ด้วยก๊าซผสม (mixed gas) หรือ ก๊าซชนิดเดียว (single gas) ให้มีอัตรา

ส่วนแตกต่างจากบรรยากาศปกติ และควบคุมอัตราส่วนของก๊าซให้ได้สัดส่วนที่แน่นอนและคงที่ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (Parry, 1993) ในปัจจุบันเทคนิค CAP ได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ๆ เช่น การใช้ฟิล์มที่มีความสามารถต้านทานการซึมผ่านของก๊าซสูง (high-barrier film) ตัวกำจัดก๊าซ (gas scavenger) และ ตัวผลิตก๊าซ (gas producer) ใส่ลงไปในภาชนะบรรจุ (Church, 1994)

2.7.3 การบรรจุแบบสุญญากาศ (Vacuum Packaging :VP)

เป็นการบรรจุผลิตภัณฑ์ลงในฟิล์มที่มีความสามารถในการต้านทานการซึมผ่านของก๊าซ O_2 สูงจากนั้นดึงอากาศออกจากภาชนะบรรจุและปิดผนึกเพื่อให้บรรยากาศภายในภาชนะบรรจุจะมีสภาพเป็นสุญญากาศ จะเกิดการยุบตัวของฟิล์มรอบๆ ผลิตภัณฑ์ เนื่องจากความดันภายในภาชนะบรรจุน้อยกว่าความดันบรรยากาศภายนอก โดยปกติปริมาณ O_2 ที่อยู่ในภาชนะบรรจุจะน้อยกว่า 1% ที่สภาวะนี้จะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศเช่น *Pseudomonas*, *Aeromonas* แต่ในระหว่างการเก็บรักษาอัตราส่วนของก๊าซจะเปลี่ยนแปลงไป (Douglas and Nagel, 1967)

2.8 ก๊าซที่ใช้ในการบรรจุแบบปรับเปลี่ยนบรรยากาศ

การบรรจุอาหารแบบวิธีการปรับเปลี่ยนบรรยากาศนั้น จะมีการแทนที่อากาศปกติภายในภาชนะบรรจุด้วยก๊าซผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ก๊าซที่ใช้จะมีผลต่อการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ โดยปกติชนิดของก๊าซที่ใช้ในการบรรจุภายใต้สภาวะการปรับเปลี่ยนบรรยากาศ มีดังนี้คือ

2.8.1 คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)

CO_2 เป็นก๊าซที่ไม่มีสี กลิ่น ไม่ติดไฟ ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 10% และ ไม่มีสารพิษตกค้างเมื่อนำไปใช้สัมผัสกับอาหาร ละลายได้ดีทั้งในน้ำและน้ำมัน และที่ความเข้มข้นของก๊าซนี้สูงๆ ก่อให้เกิดผลกระทบและยับยั้งการเจริญ (bacteriostatic effect) ของจุลินทรีย์ ซึ่ง CO_2 จะช่วยยืดระยะเวลาในช่วงระยะการปรับตัวของจุลินทรีย์ (lag phase) ลดอัตราการเจริญเติบโต (growth rate) ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการเมทาโบลิซึม (metabolism) โดยเฉพาะ succunic oxidase ลด pH ทั้งภายในและภายนอกเซลล์แบคทีเรีย ทำให้ผนังเซลล์แห้ง ส่งผลต่อการส่งผ่านสารอาหารถูกขัดขวาง และมีผลต่อกระบวนการ carboxylation ของเซลล์ (Tortora, Funke, and Case, 1992, Parry, 1993, Parkin, Wells, and Brown, 1981) โดยทั่วไปพบว่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ รา และแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ จะใช้ CO_2 ที่ความ

เข้มข้น 5-50% และจะยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ที่ 50% CO_2 ขึ้นไป (Fraber, 1991) และเมื่อใช้ CO_2 ที่ความเข้มข้นสูงๆ ยังช่วยชะลออัตราการหายใจของพืช ทำให้อายุการเก็บรักษาของผักและผลไม้สดเพิ่มขึ้น (Gould, 1996) ซึ่งประสิทธิภาพของ CO_2 ในการยับยั้งหรือชะลอการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย จะขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้นของก๊าซ, ปริมาณน้ำและไขมันที่มีอยู่ภายในตัวอาหาร และอุณหภูมิ พบว่าอาหารที่มีไขมันหรือความชื้นสูงๆ เช่น เนื้อ ไก่ และอาหารทะเล จะเกิดการดูดซับ CO_2 เป็นจำนวนมาก (Sorheim, Nissen, and Nesbakken, 1999) ทำให้เกิดการยุบตัวของถุงหรือฟิล์มที่ใช้บรรจุ หรือที่เรียกว่า pack collapse (Dixon and Kell, 1989)

2.8.2 ออกซิเจน (O_2)

ออกซิเจนเป็นก๊าซที่จำเป็นต่อการเจริญและกิจกรรมของแบคทีเรียที่ชอบอากาศ (aerobic bacteria) และเชื้อราทุกชนิด แต่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ (anaerobic bacteria) นอกจากนี้ O_2 ยังสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ไขมัน ทำให้เกิดกลิ่นหืนในอาหารที่มีไขมันสูง ดังนั้นในการบรรจุแบบปรับบรรยากาศ (MAP) จำเป็นต้องลดปริมาณก๊าซ O_2 ให้ต่ำหรือกำจัดออกจากภาชนะบรรจุ (Parry, 1993) พบว่าในบางครั้งเราจำเป็นต้องเพิ่มปริมาณ O_2 20-30% เพื่อรักษาเนื้อสัตว์ให้มีสีแดงสด (Sorheim et al., 1999) ปกติจะแนะนำให้เติม O_2 10-15% เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่สามารถเจริญภายใต้สภาวะที่มี CO_2 เช่น *C. botulinum* (Church, 1994)

2.8.3 ไนโตรเจน (N_2)

N_2 เป็นก๊าซเฉื่อย ไม่มีกลิ่นรส มีความสามารถในการละลายในน้ำและไขมันต่ำ และมีความสามารถในการเป็นยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เพียงเล็กน้อย ในสภาวะการปรับบรรยากาศ จะใช้ N_2 แทนที่ O_2 เพื่อป้องกันการเกิดการหืนและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ (aerobic bacteria) เนื่องจากก๊าซชนิดนี้มีความสามารถในการละลายในน้ำและไขมันต่ำ จึงใช้เป็นฟิลเลอร์ก๊าซ (filler gas) เพื่อป้องกันการยุบตัวของผลิตภัณฑ์ (pack collapse) (Church, 1994)

2.8.4 ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2)

SO_2 เป็นก๊าซที่ไม่มีสี ไม่ติดไฟ เมื่อซึมผ่านเข้าไปภายในเซลล์ของจุลินทรีย์แล้วจะทำให้เกิดความเสียหายและบาดเจ็บแก่เซลล์จุลินทรีย์ เนื่องจาก SO_2 จะรวมตัว (interaction) กับ thiol group และยึดจับกับพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) ภายในโครงสร้างโปรตีน (protein

structure) สารประกอบอินทรีย์และเอนไซม์ โดยจะเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ในเซลล์จุลินทรีย์ พบว่า SO_2 จะมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แกรมลบ เช่น *Escherichia coli* นิยมใช้ SO_2 ในผลไม้ ไส้กรอก และกุ้ง เพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบที่เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง (gram-negative mesophile) ยีสต์ รา และยังใช้ควบคุมการเกิดจุดดำ (black spot) ในกุ้ง และใช้เป็นสารรีดิวซ์ซิง (reducing agent) เพื่อป้องกันการเปลี่ยนสี (Church, 1994)

2.8.5 เอทธิลีนออกไซด์ (Ethylene oxide)

เป็นก๊าซที่ไม่มีสี ผลของการทำลายจุลินทรีย์ของ ethylene oxide ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น อุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ โดย ethylene oxide เป็น alkylation agent ไปหยุดปฏิกิริยาการสร้าง การใช้พลังงานและสารอาหารในเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยจะไปทำปฏิกิริยากับ carbonyl, amine, sulfhydryl และ hydroxyl group รวมทั้ง guanine/adenine ของ DNA นิยมใช้ควบคุมจุลินทรีย์และแมลงในอาหารแห้ง โดยเฉพาะในเครื่องเทศ แต่ผลตกค้างของ ethylene oxide ต้องไม่เกิน 50 ppm และไม่อนุญาติให้ใช้ ethylene oxide ในอาหารที่เป็นโปรตีน เพราะ ethylene oxide จะทำลายวิตามินและกรดอะมิโนในอาหาร (Church, 1994)

2.8.6 โอโซน (O_3)

เป็นก๊าซที่ไม่เสถียร อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นรสที่ไม่เป็นที่ยอมรับ เนื่องจากเกิดการออกซิไดซ์กับสารประกอบที่ไม่อิ่มตัว (unsaturated compounds) พบว่าผลของการทำลายจุลินทรีย์ของโอโซนจะมีมากที่ pH ต่ำและอุณหภูมิต่ำจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลาย กลไกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากโอโซน ไปทำลายเอนไซม์ dehydrogenases และโอโซนยังเป็นสารออกซิไดซ์ (oxidizing agent) ก่อให้เกิดการออกซิไดซ์กับ sulfhydryl group ของโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์หรือไปรบกวนการสังเคราะห์พลังงานในขั้นตอนการหายใจของเซลล์จุลินทรีย์ (Church, 1994)

2.9 ภาชนะบรรจุที่ใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในสภาพปรับบรรยากาศ

ในการเก็บรักษาอาหารในสภาพปรับเปลี่ยนบรรยากาศ จำเป็นต้องเลือกใช้ภาชนะบรรจุที่มีคุณสมบัติในการรักษาสภาพปรับบรรยากาศให้ใกล้เคียงกับการบรรจุเริ่มแรกให้นานที่สุด เพื่อช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

ภาชนะบรรจุซึ่งใช้สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารส่วนใหญ่จะเป็นประเภทฟิล์มพลาสติกซึ่งมีคุณลักษณะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของพลาสติก คุณสมบัติที่สำคัญของฟิล์มพลาสติกที่ต้องคำนึงถึงคือ คุณสมบัติการซึมผ่านของก๊าซ (gas permeability) ได้แก่ ออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และไนโตรเจน, คุณสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำ (moisture proofness) คุณสมบัติในการปิดผนึกได้ด้วยความร้อน (heat sealability) ความต้านทานการซึมผ่านของน้ำมัน (oil resistance) คุณสมบัติเชิงกล (mechanical strength) คุณสมบัติในการพิมพ์ (printing suitability) และความใส (light transmission) (งามทิพย์ ภู่วโรดม, 2523) ซึ่งพลาสติกที่นิยมใช้กันมาในการผลิตบรรจุภัณฑ์หรือฟิล์มพลาสติก มีดังนี้

2.9.1 ฟิล์มพลาสติกชนิด PE หรือ โพลีแอทธิลีน

เป็นพลาสติกที่มีการใช้กันในปริมาณมากที่สุด และกว้างขวาง ไม่ว่าจะเป็นผลิตผลสด ผลิตภัณฑ์อาหาร และผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมต่างๆ คุณสมบัติโดยทั่วไปมีความเหนียวสูง ทนทานต่อสารเคมีจำพวกกรด-ด่าง สามารถกันการซึมผ่านของไอน้ำได้ดี แต่กันการซึมผ่านของก๊าซและไขมันต่ำ มีความปลอดภัยและสามารถใช้กับอาหารและยาได้ สามารถนำไปใช้เป็นถุงบรรจุอาหาร หรือบรรจุสินค้าหนักๆ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้ร่วมกับวัสดุอื่นๆ เช่น อะลูมิเนียม ในลักษณะการรีดร่วม หรือการประกบ เพื่อเสริมคุณสมบัติการใช้งาน

2.9.2 ฟิล์มพลาสติกชนิด PP หรือโพลีโพรพิลีน

เป็นพลาสติกที่มีโครงสร้างเช่นเดียวกับโพลีเอทธิลีน ดังนั้นจึงมีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน ที่รู้จักกันมี 2 ชนิดคือ OPP (Oriented polypropylene) ผลิตโดยวิธีเป่าทำให้โมเลกุลจัดเรียงตัวกันทั้งสองทิศทาง และ CPP (Cast polypropylene) ผลิตโดยกรรมวิธีการหล่อ คุณสมบัติโดยทั่วไปมีความทนทานต่อสารเคมีได้ดี กันการซึมผ่านไอน้ำ ฟิล์มชนิด CPP สามารถปิดผนึกด้วยความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 135-150 $^{\circ}$C ส่วนฟิล์มชนิด OPP ไม่สามารถปิดผนึกด้วยความร้อนได้เนื่องจากเกิดการหดตัวของฟิล์ม การใช้งานสามารถนำไปบรรจุอาหารสำเร็จรูป เช่น ขนมปัง ลูกกวาด เป็นต้น ใช้ร่วมกับวัสดุอื่น เช่นพลาสติกต่างชนิด กระดาษ อลูมิเนียม ในลักษณะการประกบ หรือการรีดร่วม เพื่อเสริมคุณสมบัติการใช้งาน

2.9.3 ฟิล์มพลาสติกชนิด PVC หรือโพลีไวนิลคลอไรด์

เป็นพลาสติกชนิดหนึ่งในกลุ่มไวนิล (Vinyl) ซึ่งมีการใช้อย่างกว้างขวาง ในกรณีที่ต้องการให้ฟิล์มมีคุณสมบัติยืดหยุ่นและอ่อนตัวจะต้องเติมสารพลาสติกไซเซอร์ ในปริมาณมากกว่า

ร้อยละ 25 ลงไปในกระบวนการผลิต เนื่องจาก PVC มีลักษณะแตกต่างจากพลาสติกอื่นคือสามารถใช้ผสมกับสารเติมแต่งอื่นๆ (additive) ได้มากมาย จึงทำให้สามารถปรับฟิล์ม PVC ให้มีคุณสมบัติต่างๆ ตามต้องการได้ อย่างไรก็ตามหากต้องการนำไปใช้กับการบรรจุอาหารจะต้องระมัดระวังไม่ให้สารเติมแต่งหลุดออกมาปนเปื้อนกับอาหารที่บรรจุอยู่ซึ่งจะเป็นอันตรายได้ สำหรับอุณหภูมิเหมาะสมกับการใช้งานไม่เกิน 80°C ส่วนใหญ่มีการนำไปใช้ผลิตถุงพลาสติกบรรจุผักและผลไม้สด เพื่อให้ไอน้ำผ่านเข้าออกได้

2.9.4 ฟิล์มพลาสติกชนิด PS หรือโพลีสไตรีน

เป็นพลาสติกชนิดหนึ่งในกลุ่มซไตรีน (styrene) เนื่องจากมีลักษณะเด่นในด้านความใส มีความสามารถในการพิมพ์และยังใช้กับเครื่องจักรที่ต้องการความเร็วสูงในการผลิตได้ นอกจากนี้ยังดูดซึมน้ำได้ต่ำ ทำให้ไม่ก่อปัญหาในด้านการเปลี่ยนแปลงขนาด การใช้งานสามารถนำไปทำถุงพลาสติกบรรจุผลไม้สด

2.9.5 ฟิล์มพลาสติกชนิด PET หรือโพลีเอทธิลีนเทอร์ฟะทาเรด

เป็นพลาสติกชนิดหนึ่งในกลุ่มโพลีเอสเทอร์ ได้มาจากทำปฏิกิริยาของเอทธิลีนไกลคอนและไดเมทธิลเทอร์ฟะทาเลด มีคุณสมบัติโปร่งใส มีความเหนียวสูง สามารถกันการซึมผ่านไอน้ำได้ดี และกันการซึมผ่านก๊าซได้ดีมาก นิยมใช้ห่ออาหารประเภทเนื้อที่ปรุงสุกแล้ว และทำถุงบรรจุผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการแช่แข็ง นอกจากนี้นำไปใช้เป็นวัสดุหลักในการเคลือบ หรือประกบพลาสติกชนิดอื่น หรือกระดาษสำหรับทำถุงที่ต้องการใช้งานที่อุณหภูมิสูง เช่น ถุงที่หุงต้มได้ หรือถุงที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน เป็นต้น

2. 10 ข้อดี ข้อเสียของการบรรจุแบบปรับเปลี่ยนบรรยากาศ (MAP)

ในปัจจุบันพบว่าผลิตภัณฑ์ที่บรรจุแบบปรับบรรยากาศได้มีการยอมรับและนิยมใช้มากขึ้น เนื่องจากการบรรจุผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค MAP นั้นก่อให้เกิดผลดีทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค ซึ่งสามารถสรุป ได้ดังนี้ คือ (Parry, 1993, Farber, 1991, Gould, 1995)

1. เพิ่มอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เป็น 2-3 เท่า
2. รักษาความสดและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา เช่น การรักษาสีแดงสดในเนื้อ
3. ช่วยให้ลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์เป็นที่สะดุดตาของผู้บริโภค เนื่องจากภาชนะบรรจุ (package) ที่ใช้มีหลายรูปแบบ

4. ช่วยลดการสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจ ลดจำนวนผลิตภัณฑ์ที่เน่าเสีย เพิ่มพื้นที่การจำหน่าย ลดค่าขนส่ง เนื่องจากลดความถี่ในการส่งสินค้า

5. ไม่ต้องการหรือต้องการสารเคมีถนอมอาหาร (chemical preservative) เพียงเล็กน้อย ซึ่งข้อเสียของการบรรจุแบบปรับบรรยากาศ (MAP) มีดังนี้ คือ

1. ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น เนื่องจากต้องใช้เครื่องมือสำหรับการบรรจุและการปิดผนึก
2. จำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการเก็บรักษา
3. อัตราส่วนของก๊าซแต่ละชนิดไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์
4. จำเป็นที่จะต้องควบคุมและพิจารณาถึงการเจริญและผลิตสารพิษ (toxin) จากจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogenic microorganism) ที่มีความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่มี CO_2 เช่น *C. botulinum*

2.11 การประยุกต์ใช้เทคนิคการปรับบรรยากาศ (MAP) ในปลา

อายุการเก็บและคุณภาพของปลาสดจะถูกจำกัดเมื่อมีก๊าซ O_2 เนื่องจาก O_2 เป็นก๊าซที่จำเป็นต่อการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของปลา พวกแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ (Gram-negative psychrotrophic bacteria) เช่น *Pseudomonas, Achromobacter, Flavobacterium* และ *Moraxella* เป็นต้น พบว่าแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียเหล่านี้สามารถที่จะถูกยับยั้งการเจริญได้โดยบรรจุปลาสดไว้ในภาชนะบรรจุที่มีความต้านทางการซึมผ่านของก๊าซสูง ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของ CO_2 สูงๆ เนื่องจาก CO_2 และลดอัตราการเจริญ (growth rate) และเพิ่มระยะเวลาในช่วงระยะการปรับตัวของจุลินทรีย์ (lag phase) พบว่าแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) จะไว (sensitive) และถูกยับยั้งได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) (Parry, 1993) ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ CO_2 จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ CO_2 อุณหภูมิ และชนิดและช่วงอายุของจุลินทรีย์ เมื่อเราสามารถยับยั้งกิจกรรมและการเจริญของที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียได้ เมทาบอไลต์และสารประกอบที่ระเหยได้ที่เป็นสาเหตุของกลิ่นเหม็นเน่าต่างๆ ที่ผลิตขึ้นจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ก็จะถูกลดปริมาณลงด้วย ซึ่ง ตัวอย่างการใช้และสัดส่วนของก๊าซในการบรรจุแบบปรับบรรยากาศในเนื้อปลาและปลาทั้งตัวแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 อัตราส่วนของก๊าซที่ใช้ในการบรรจุแบบปรับบรรยากาศในปลาชนิดต่างๆ

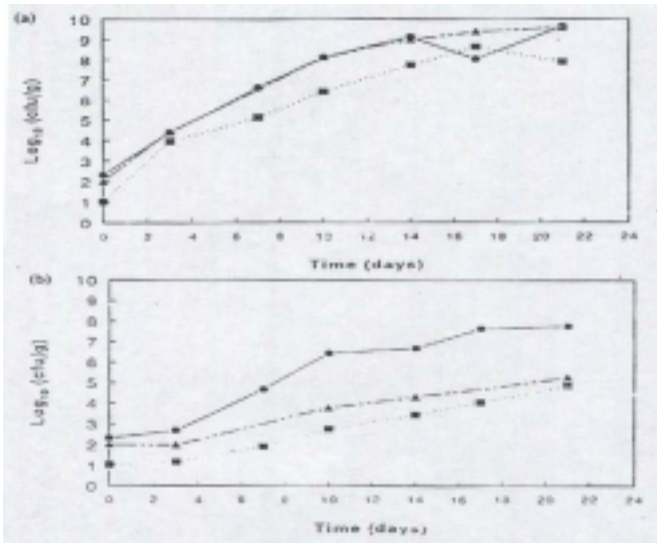
ชนิดปลา	อุณหภูมิ (°C)	อัตราส่วนของก๊าซ	อายุการเก็บรักษา (วัน)	
			บรรยากาศปกติ	ปรับเปลี่ยนบรรยากาศ
Trout	1.7	80% CO_2:20% O_2	12	20
Rockfish fillets	1.7	80% CO_2:20% O_2	≤6	≥13
Rock cod	4	80% CO_2:20% O_2	5	≥10
Cooked crayfish	1.7	80% CO_2:20% O_2	14	≥21

แหล่งที่มา: Ashie et al., 1996.

จากตารางที่ 2.4 เห็นได้ว่าปลาเทราซ์ ที่เก็บไว้ในสภาวะปกติ (air) จะมีอายุการเก็บเพียง 12 วัน แต่เมื่อทำการเก็บด้วยภายใต้สภาวะการปรับเปลี่ยนบรรยากาศ ที่ 80% CO_2:20% O_2 อายุการเก็บรักษาจะเพิ่มขึ้นเป็น 20 วัน และให้ผลเช่นเดียวกันในปลาชนิดอื่นๆ และนอกจากนี้พบว่า เนื้อปลาคอด (Cod fillets) ที่เก็บที่อุณหภูมิ 0 °C ร่วมกับ 75% CO_2:25% O_2 จะช่วยเพิ่มอายุการเก็บรักษาขึ้นอีก 8 วันเมื่อเทียบกับเก็บรักษาที่บรรยากาศปกติ (Hendricks and Hotchkiss, 1997)

จากการศึกษาพบว่า *Pseudomonas* และแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียสายพันธุ์อื่นๆ เช่น *Achromobacter, Flavobacter, Micrococcus, Bacillus* จะถูกยับยั้งที่ 25% CO_2 และการยับยั้งจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ที่ 50% CO_2ในขณะที่ lactic acid bacteria และ *C. botulinum* สามารถที่จะเจริญได้ภายใต้ CO_2 ที่ความเข้มข้นสูงๆ Gould Wonderal (1996) และ Villemure et al. (1986) พบว่า CO_2 ที่ความเข้มข้นมากกว่า 50% สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ โดยเฉพาะถ้าใช้ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ และสรุปว่า ที่ 75% CO_2: 25% O_2 เป็นอัตราส่วนของก๊าซที่เหมาะสมเพื่อใช้เก็บรักษาปลาคอด เนื่องจากจำนวนของแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ (psychrotrophic bacteria) (CFU/g) จะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างช้าๆ เมื่อเทียบกับการเก็บรักษาไว้ที่บรรยากาศปกติ และ Gould Wonderal (1995) พบว่า *Pseudomonas* และ Enterobacteriaceae จะถูกยับยั้งและเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างช้าๆ เมื่อเก็บรักษาปลาเรนโบว์เทราซ์ (rainbow trout) ภายใต้ 80% CO_2:20% N_2 และ 5°C แต่จะพบว่า lactic acid bacteria สามารถที่จะเจริญและเพิ่มจำนวนได้ที่สภาวะดังกล่าว และเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเสียของปลาขึ้น เนื่องจาก lactic acid bacteria เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มที่สามารถเจริญได้ที่สภาวะที่มีความเข้มข้นของ CO_2สูงๆ และมี O_2 เพียงเล็กน้อย (microaerophile) ดังแสดงในภาพที่ 2.4

Galvez, Hoz, and Ordonez (1995) ได้ทำการศึกษาผลของ CO_2 และ O_2 ที่มีต่ออายุการเก็บรักษาปลาทูน่า (tuna) ที่อุณหภูมิ 4°C พบว่า เมื่อเก็บปลาทูน่า ภายใต้สภาวะปกติจะเกิดการเน่าเสียภายใน 9 วัน โดยที่จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (TVC) เพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 10^7 CFU/g และมีกลิ่นเหม็นเน่าเกิดขึ้น (putrid, stale) และในวันที่ 11 ผิวของปลา จะมีเมือกปกคลุมโดยรอบ เนื่องจากมีการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผิวเป็นจำนวนมาก (> 10^8 CFU/g) และ Enterobacteriaceae จะเพิ่มสูงถึง 10^7 CFU/g หลังจากเก็บรักษาไว้ 9 วัน และเมื่อทำการยืนยันสายพันธุ์โคโลนีที่ตรวจพบ (identified colonies) บน อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA พบว่าจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย คือ *Brochothrix thermosphacta* (5%), *Lactobacillus spp.* (<1%) และ แบคทีเรียแกรมลบที่เจริญภายใต้อุณหภูมิต่ำ (gram-negative psychrotrophs) (94%) (ในกลุ่ม *Pseudomonas, Alteromonas, Shewanella spp*.) แต่เมื่อทำการบรรจุปลาทูน่าภายใต้สภาวะที่มี CO_2 สูงถึง 60% จะพบว่าสามารถที่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ โดยจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดจะเพิ่มสูงถึง 10^7 CFU/g ภายหลังจากการเก็บ 20 วัน และเมื่อทำการยืนยันสายพันธุ์ (identified colonies) บน PCA plates พบว่าสัดส่วนของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการเน่าเสียเปลี่ยนไปเป็น gram-negative psychrotrophs (1.2%) และ *Br. Thermosphacta* และ *Lactobacillus spp*. (> 60%) ดังแสดงในภาพที่ 2.5

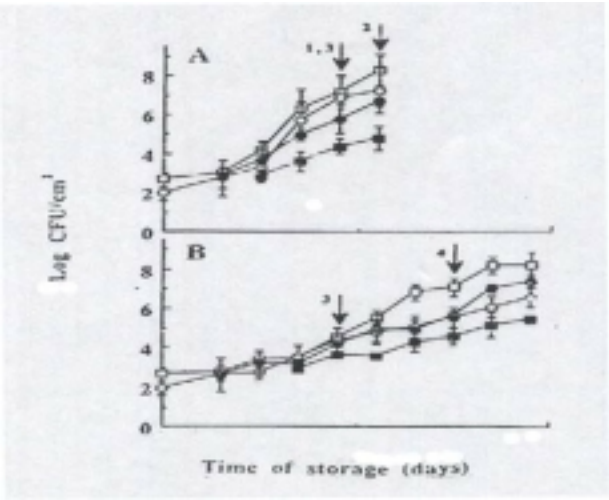


ภาพที่ 2.4 จำนวนจุลินทรีย์ทั่วไป (micro flora) ภายใต้สภาวะการเก็บรักษา (a) สภาวะที่มีออกซิเจน(aerobic) (b) การปรับเปลี่ยนบรรยากาศ (MAP) (80% CO_2:20% N_2) และ เก็บรักษาปลาเรนโบว์ เทราซ์ (rainbow trout) ที่ 5°C เมื่อ ■...■ = Enterobacteriaceae, ▲—— -- ——▲ = *Pseudomonas spp*., ●-● = lactic acid bacteria

จาก Gould, 1995

Dalgaard, Munoz, and Mejlhom (1998) พบว่า *Photobacterium phosphoreum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียเฉพาะ (specific spoilage bacteria) และจะถูกยับยั้งการเจริญเมื่อบรรจุเนื้อปลาคอด (cod fillets) ภายใต้การปรับเปลี่ยนบรรยากาศ (modified atmosphere) ที่ 50% CO_2 : 50% N_2 ร่วมกับการใช้สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial) คือ 500 ppm Na_2Ca EDTA โดยสามารถลดอัตราการเจริญ (growth rate) ของ *P. phosphoreum* ลดได้ 40% และสามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ถึง 40% จาก 15-17 วันเป็น 21-23 วัน เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0°C

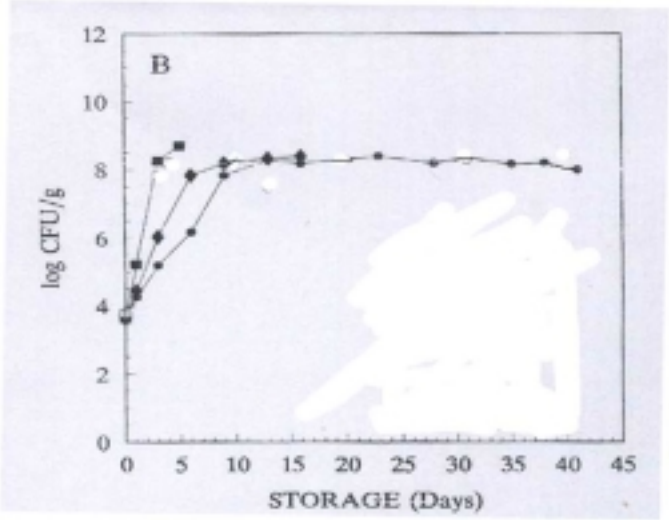
Bank et al., (1980) พบว่าการบรรจุปลาเทราซ์ (trout) ด้วยเทคนิค MAP สามารถที่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ที่มีรูปร่างเป็นท่อน (gram-negative rod) เช่น *Pseudomonas* แต่จะสนับสนุนการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) เช่น *Lactobacillus* และพบว่าปลาที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ภายใต้สภาวะที่มี CO_2 เข้มข้นสูงจะมีปริมาณสารไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (total volatile base nitrogen: TVB-N) ต่ำกว่าปลาที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิเดียวกันที่บรรยากาศปกติ จากผลที่ได้สามารถสรุปได้ว่า MAP สามารถที่จะยืดอายุการเก็บรักษาปลาสด, ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย และสามารถยืดระยะเวลาการผลิตสารระเหย (volatile compound) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดกลิ่นรสที่ผิดปกติและกลิ่นเหม็นเน่า



ภาพที่ 2.5 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total viable count) ( ), lactobacilli (■),Enterobacteriaceae (o), *Brochothrix thermosphacta* (Δ) ในปลาทูน่าแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เมื่อเก็บไว้ในอากาศปกติ (A) และ (B) MAP (60% CO_2/40%O_2), เมื่อ 1, กลิ่นรสผิดปกติ (off-flavor)(กลิ่นเหม็นเน่า); 2, เมือก ; 3. เกิดการเปลี่ยนสีของเนื้อปลา เช่น สีเขียวและน้ำตาลอ่อน; 4, เกิดกลิ่นคาวและเหม็นเน่าอย่างรุนแรง

จาก Galvez, 1995

Reddy (1994) ได้ศึกษาผลของการเก็บรักษาเนื้อปลาดุก (catfish fillets) ภายใต้สภาวะที่มีการปรับบรรยากาศที่ 75% CO_2 : 25% N_2, 50% CO_2 : 50% N_2, 25% CO_2 : 75% N_2 และ 100% อากาศ (air) ในฟิล์มที่มีความสามารถในการอุ้มก๊าซสูงและเก็บที่อุณหภูมิ 4°C (ดังแสดงในภาพที่ 2.6) พบว่า เมื่อบรรจุปลาในบรรยากาศปกติ 100% air จะมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด เริ่มต้น (total count) เท่ากับ log 4.3 CFU/g และจะเพิ่มสูงถึง log 7.8 CFU/g ภายหลังจากเก็บรักษา 9 วัน พร้อมกับสังเกตเห็นการเน่าเสีย แต่เมื่อทำการเก็บภายใต้ MAP โดยเพิ่มความเข้มข้นของ CO_2 จะเห็นว่าการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์จะถูกยืดระยะเวลาขึ้น ที่ 75% CO_2 : 25% N_2 เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษา โดยมีอายุการเก็บนานถึง 24 วัน และเป็นสภาวะที่จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนช้าที่สุด ซึ่งเนื้อปลาดุกจะเกิดการเน่าเสียเมื่อมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ log 7.5 CFU/g



ภาพที่ 2.6 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (total counts) ใน เนื้อปลาดุก (catfish fillets) ที่บรรจุในฟิล์มที่มีความสามารถในการอุ้มก๊าซสูง (high barrier film) และเก็บไว้ในสภาวะต่างๆ
จาก Reddy, 1994

จากรูปจะเห็นว่า ที่ 75% CO_2 : 25% N_2 ในช่วง 6 วันแรก การเพิ่มขึ้นของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (total counts) จะเพิ่มอย่างช้าๆ เนื่องจากจุลินทรีย์พวกที่ต้องการอากาศในการเจริญถูกยับยั้ง แต่หลังจากนั้นจำนวนของจุลินทรีย์ทั้งหมดจะค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์พวกที่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) และพวกที่เจริญได้ภายใต้สภาวะที่มี CO_2 สูง (anaerobic bacteria) เริ่มเจริญและเพิ่มจำนวน

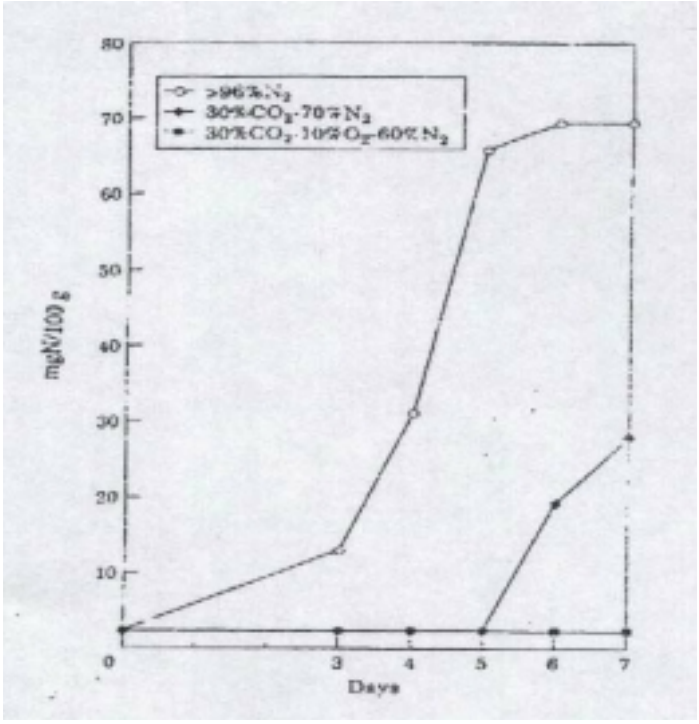
King (1967) สรุปว่า CO_2 ที่ความเข้มข้น 70% สามารถที่จะยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* ใน glucose salt medium ได้ และ ประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas, Acinetobacter, Moraxella, Brochothrix thermosphacta* และ *yersinia enterocolitica* ด้วย CO_2 จะเพิ่มขึ้น เมื่อลดอุณหภูมิในการเก็บรักษา เพราะการแตกตัวของ CO_2 จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อลดอุณหภูมิให้ต่ำลง

Boskou and Debevere (1997) พบว่า MAP สามารถยับยั้งการเจริญของ *Shewanella putrefaciens* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียเฉพาะ (specific spoilage microorganism) ในปลาน้ำเค็ม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ O_2 จะสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. putrefaciens* และที่ 30% CO_2-70% O_2 เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งการเจริญของ *S. putrefaciens* (ดังแสดงในภาพที่ 2.7) และสภาวะนี้ปริมาณของ TMA ที่ผลิตขึ้นจาก *S. putrefaciens* มีปริมาณที่ต่ำที่สุด (ภาพที่ 2.8)

Storage day

ภาพที่ 2.7 การเจริญของ *Shewanella putrefaciens* ในปลาที่บรรจุภายใต้สภาวะการปรับบรรยากาศที่สภาวะต่างๆ และ เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 7° C นาน 7 วัน

จาก Boskou and Debevere, 1997



ภาพที่ 2.8 ปริมาณไตรเมทิลเอมีน (TMA) ที่ผลิตขึ้นจาก *Shewanella putrefaciens* ในปลาที่บรรจุภายใต้ MAP ที่สภาวะต่างๆ เก็บที่อุณหภูมิ 7° C นาน 7 วัน O-O= >96% N_2, ◆-◆= 30% CO_2-10% O_2-60% N_2 and ■-■ =30% CO_2-70% O_2

จาก Boskou and Debevere, 1997

Dalgaard et al. (1993) พบว่า MAP ที่สภาวะ 50% CO_2-50% O_2 สามารถยับยั้งการเจริญและยับยั้งความสามารถในการรีดิวซ์ TMAO (TMAO-reducing activity) ของ *S. putrefaciens* และ *Shewanella spp*. ถูกยับยั้งการเจริญที่ 60-70% CO_2: 30-40% O_2 และ Debevere and Boskou (1996) พบว่าจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารไนโตรเจนที่ระเหยได้/ไตรเมทิลเอมีน (TVB/TMA) และ H_2S จะถูกยับยั้งการเจริญที่ 60% CO_2-40% O_2 ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 6° C และ Pastoriza, Sampedro, and Cabo (1998) พบว่าเมื่อเก็บปลาไว้ที่บรรยากาศปกติ ปริมาณของ TMA จะเพิ่มสูงถึง 85.23 mg/100g หลังจากการเก็บนาน 2 สัปดาห์ แต่เมื่อเก็บไว้ที่สภาวะ 50% CO_2-50% O_2 ปริมาณของ TMA ที่ตรวจพบ มีปริมาณน้อยกว่าเก็บไว้ที่บรรยากาศปกติถึง 2 เท่า

นอกจากนี้เรายังพบว่า การรักษาปลาด้วยเทคนิค MAP ยังมีความเสี่ยงต่อการเจริญและการสร้างสารพิษจากแบคทีเรียก่อโรคที่สามารถเจริญภายใต้สภาวะที่มี CO_2 สูงๆ (anaerobic pathogen) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *C. botulinum* สายพันธุ์ A, B, E เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญและสร้าง

สารพิษภายใต้สภาวะที่มี CO_2 ความเข้มข้นสูงได้ และสารพิษที่ผลิตขึ้นสามารถทำให้เกิดโรค Botulism ซึ่งก่อให้เกิดอันตรายแก่ระบบประสาทและตายได้ ดังนั้นจึงต้องให้ความสำคัญและควบคุมสภาวะการเก็บรักษา เพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนี้

Post, Lee, and Solberg (1985) ได้ทำการ inoculate สปอร์ของ *C. botulinum* สายพันธุ์ E ในปลาและเก็บไว้ที่สภาวะที่แตกต่างกัน คือ บรรยากาศปกติ, สุญญากาศ (vacuum) และการปรับบรรยากาศ (MAP) ที่ประกอบด้วย 65-90% CO_2: 1-15% O_2 และเก็บไว้ที่อุณหภูมิแตกต่างกันที่ 4-26 $^{\circ}$ C (แสดงในตารางที่ 2.5)

ตารางที่ 2.5 วันที่ตรวจพบสารพิษ (toxin) และ การเน่าเสียที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนคุณภาพทางประสาทสัมผัส (organoleptic spoilage) ในปลาที่ inoculate สปอร์ของ *C. botulinum* สายพันธุ์ E และเก็บไว้ที่สภาวะแตกต่างกัน

อุณหภูมิ ($^{\circ}$C)	สภาวะการเก็บรักษา	วันที่ตรวจพบสารพิษ[a]	วันที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางประสาทสัมผัส[a]
26	Air	2	2
	Vacuum	2	2
	90% CO_2:8% N_2:1% O_2	3	2
	65% CO_2:31% N_2:4% O_2	1	2
22.2	Air	2	1
	60% CO_2:25% N_2:15% O_2	2	2
8	Air	>10	6
	90% CO_2:8% N_2:1% O_2	8	17
	65% CO_2:31% N_2:4% O_2	9	16
4.4	Air	>57	6
	60% CO_2:25% N_2:15% O_2	>57	12
4	80% CO_2:15% N_2:5% O_2	53,40[b]	21,18[b]

[a] จำนวนวันที่ตรวจพบสารพิษและการเน่าเสีย

[b] ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

แหล่งที่มา: Post, 1985

จากตารางสามารถสรุปได้ว่า การตรวจพบสารพิษ (toxin) นั้นจะตรวจพบพร้อมๆกับการเน่าเสียของปลา และเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำร่วมกับการใช้ MAP นั้นสามารถที่จะยืดอายุการเก็บรักษาและยืดระยะเวลาการผลิตสารพิษ ซึ่งให้ผลที่คล้ายกับการทดลองของ Hintlian and Hotchkiss (1986) ได้ทำการ inoculate สปอร์ของ *C. botulinum* สายพันธุ์ E และเก็บที่ 70% CO_2:30% O_2 และ 4°C พบว่า *C. botulinum* จะผลิตสารพิษ หลังจากเก็บรักษานาน 60 วันซึ่งผู้บริโภคไม่ยอมรับปลานั้นแล้ว แต่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิในการเก็บรักษาขึ้นเป็น 16°C จะตรวจพบสารพิษก่อนวันที่ปลาจะเน่าเสีย และ Post et al. (1995) พบว่า *C. botulinum* สายพันธุ์ E จะผลิตสารพิษหลังจากการเก็บ 30 วัน ที่ 70% CO_2:30% O_2 ร่วมกับเก็บที่ 4°C ในปลาฉลามแดง (red snapper) และสรุปว่า *C. botulinum* สายพันธุ์ E ไม่สามารถที่จะเจริญและสร้างสารพิษ เมื่อเก็บรักษาที่ 70% CO_2:30% O_2 ร่วมกับเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4°C ตลอดเวลา

Reddy (1994) ได้ทำการศึกษาการผลิตสารพิษ ของ *C. botulinum* Type E ในปลาดุก (catfish) ซึ่งเก็บไว้ที่สภาวะแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 วันที่ตรวจพบสารพิษ (toxin) และ การเน่าและเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางประสาทสัมผัส (organoleptic spoilage) ในเนื้อปลาดุก (catfish fillets) ที่ inoculate สปอร์ของ *C. botulinum* สายพันธุ์ E (100 สปอร์/กรัม ตัวอย่าง) และเก็บไว้ที่สภาวะแตกต่างกัน

อุณหภูมิการเก็บรักษา (ºC)	บรรยากาศ	จำนวนวันที่ตรวจพบการเน่าเสีย	จำนวนวันที่ตรวจพบสารพิษ
16	100% air	3	3
	MA[a]	4	4
	Vacuum	3	3
8	100% air	3	3
	MA[a]	6	9
	Vacuum	13	18
4	100% air	13	>54
	MA[a]	34-40	>75

[a] MA = การปรับเปลี่ยนบรรยากาศที่สภาวะ 75% CO_2: 25% N_2

แหล่งที่มา: Reddy, 1994

จากตารางจะเห็นว่า การเก็บรักษาปลาสดด้วย MAP สามารถช่วยยืดอายุการเน่าเสียและการผลิตสารพิษ ซึ่งประสิทธิภาพของ MAP จะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ Stier, Bell, Ito and Brown (1981) สรุปว่าการใช้เทคนิค MAP เพียงอย่างเดียวไม่สามารถที่จะรับประกันได้ว่าปลานั้นจะปลอดภัยจากการปนเปื้อนและสร้างสารพิษ จาก *C. botulinum* สายพันธุ์ E แต่ถ้ามีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 °C ร่วมด้วย *C. botulinum* สายพันธุ์ E จะไม่สามารถเจริญและสร้างสารพิษ ก่อนวันที่ปลาจะเน่าเสีย

บทที่ 3
วัสดุ และ วิธีการทดลอง

3.1 วิธีทดลอง

3.1.1 วัตถุดิบและเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์

จัดซื้อปลานิลสด ซึ่งมีน้ำหนักตั้งแต่ 0.5 กิโลกรัม / ตัว ขึ้นไป อายุประมาณ 5-6 เดือน จากตลาดย่าโม จังหวัดนครราชสีมา ทำการขอดเกร็ด แล่เป็นชิ้น โดยสภาวะและอุปกรณ์ที่ใช้ เช่น มีด เขียง จะต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และต้องเช็ดทำความสะอาดด้วย 95% ethyl alcohol แล้วทำการบรรจุเนื้อปลานิลสด 150 กรัม ลงในถุงพลาสติกซึ่งเป็นฟิล์มรีดร่วมระหว่าง Polyamide และ Low Density Polyethylene (PA/LDPE) ขนาด 15 x 25 cm. ความหนา 80 micron ซึ่งมีความสามารถในการซึมผ่านของก๊าซ CO_2 32 ml/m^3/24 hr/1atm ที่อุณหภูมิ 37°C, ความสามารถในการซึมผ่านของก๊าซ N_2 36 ml/m^3/24 hr/1atm ที่อุณหภูมิ 37°C และความสามารถในการซึมผ่านของก๊าซ O_2 52 ml/m^3/24 hr/1atm ที่อุณหภูมิ 37°C และอัตราการซึมผ่านของไอน้ำเท่ากับ 4.09 g/m^3/24 hr ที่อุณหภูมิ 37°C ความชื้นสัมพันธ์ 90% ระหว่างรอการบรรจุแช่ตัวอย่างเนื้อปลาใต้น้ำแข็ง ทำการบรรจุภายใต้สภาวะดังนี้

1. 25% CO_2 : 75% N_2
2. 50% CO_2 : 50% N_2
3. 75% CO_2 : 25% N_2
4. 100%CO_2
5. บรรยากาศปกติ ซึ่งใช้เป็นตัวอย่างควบคุม (control)

ด้วยเครื่อง Vacuum packaging รุ่น S225 และปิดผนึกด้วยความร้อน ซึ่งก๊าซที่ใช้บรรจุเป็นก๊าซที่มีความบริสุทธิ์สูง High purity grade (99.995%) โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ (triplicate) ซึ่งระยะเวลาในการเตรียมตัวอย่าง ไม่ควรเกิน 1 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 0,4 และ 10°C ในช่วงสัปดาห์แรกของการทดลองตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางด้านกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ทุกวัน หลังจากนั้นตรวจวิเคราะห์ทุกๆ 3 วัน

3.1.2 การสูญเสียน้ำหนัก (%weight loss)

การสูญเสียน้ำหนักของตัวอย่างมีสาเหตุจาก การเยิ้มน้ำของเนื้อปลา (exudation loss) สำหรับการติดตามการสูญเสียน้ำหนักของตัวอย่างเนื้อปลาทำได้โดย เปรียบเทียบน้ำหนักของเนื้อปลาก่อนและหลังจากการเก็บรักษาตามระยะเวลาที่กำหนด และคำนวณออกมาเป็น % การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss)

สูตรการคำนวณ weight loss (%)

$$\frac{\text{น้ำหนักของตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม) - น้ำหนักของตัวอย่างหลังจากที่เก็บรักษา (กรัม)}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

3.1.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ปั่นตัวอย่างเนื้อปลาให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย homogenizer โดยชั่งเนื้อปลา10 กรัม ปั่นผสมกับน้ำกลั่นที่กำจัดอิออน (deionized water) 90 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ได้วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วย pH meter (500 series, cole Parmer) โดยทำการ calibrate เครื่องมือก่อนใช้ทุกวัน

3.1.4 ปริมาณก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์, ออกซิเจน และ ไนโตรเจน

วิเคราะห์ปริมาณก๊าซซึ่งบรรจุอยู่ในถุง PA/LDPE ด้วยก๊าซโครมาโทกราฟฟี (Gas chromatrography: GC) รุ่น 6890 Perkin Elmer ซึ่งต่อกับ Thermal Conductivity Detector (TCD) ด้วยคอลัมน์ ขนาด 20 m x 18 mm. O.D. บรรจุด้วย Activated Alumina 60/80 mesh โดยใช้ ฮีเลียม (Helium) เป็นก๊าซพา (carrier gas) (EPA Method 3C, 1991). ดูดก๊าซที่มีอยู่ในภาชนะบรรจุด้วยไซริง ชนิดป้องกันการรั่วของก๊าซ (air lock syringe) ดูดก๊าซจากภาชนะบรรจุ 2 มิลลิลิตร ปิดปลายไซริงด้วยเซปตัมทันที แล้วนั้นฉีดตัวอย่างก๊าซ 1 มิลลิลิตร เข้าสู่ GC ทำการตรวจวิเคราะห์ภายใต้สภาวะดังนี้

อุณหภูมิเตาเริ่มต้น (Initial oven temperature)	35 $^{\circ}$C
อุณหภูมิเตาสุดท้าย (Final oven temperature)	165 $^{\circ}$C
อุณหภูมิส่วนฉีดสาร (injection port temperature)	35 $^{\circ}$C
อุณหภูมิดีเทคเตอร์ (Detector Temperature)	170 $^{\circ}$C
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ (Temperature program rate)	20 $^{\circ}$C/min.
อัตราเร็วการเคลื่อนที่ของก๊าซพา (Carrier gas flow)	17 ml/min

ระยะเวลาที่สารอยู่ในคอลัมน์ (Hold time) 20 min.

สภาพความเป็นขั้วของดีเทคเตอร์ (TCD polarity) A-B

สำหรับเปอร์เซนต์ของก๊าซแต่ละชนิดที่มีอยู่ในภาชนะบรรจุนั้นคำนวณจาก

$$\% \text{ ความเข้มข้นของก๊าซ} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟของพีคตัวอย่าง X ความเข้มข้นของก๊าซมาตรฐาน}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟของพีคของก๊าซมาตรฐาน}} \times 100$$

3.1.5 วิเคราะห์ปริมาณ ไตรเมทิลเอมีน (Trimethyamine : TMA) ด้วยการวัดการดูดกลืนแสง (Colorimetric method) (AOAC, 1995)

ชั่งตัวอย่างเนื้อปลา 100 กรัม เติม 7.5% trichloroacetic acid (TCA) 200 มิลลิลิตร นำไปปั่นเนื้อปลาให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยโฮโมจีไนเซอร์ (AM-8 Ace Homogenizer, Nissei) ที่ความเร็วสูงนาน 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 4000 rpm นาน 15 นาที ปิเปตส่วนที่กรองได้ 4 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เติม HCHO (ฟอร์มาลิน) 1 มิลลิลิตร, โทลูอีน (toluene) 10 มิลลิลิตร และโพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) 3 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ ตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้นของโทลูอีน จากนั้นปิเปตชั้นของ toluene ประมาณ 7-9 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุ 0.1 กรัมของ anhydrous Na_2SO_4 ปิดฝาและเขย่าสารละลายอีกครั้ง เพื่อเป็นการทำแห้ง จากนั้นปิเปต toluene 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วเติม 2 %picric acid 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร(Ultraspec 2000, UV/Visible Spectrophotometer Pharmacia Biotech, England) และสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายไตเมทิลเอมีนมาตรฐาน (standard solution) โดยพลอต ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (standard solution) เพื่อใช้คำนวณหาปริมาณ TMA ที่มีอยู่ในตัวอย่างและแสดงค่าออกมาเป็น TMA/100 g ตัวอย่าง

3.1.6 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total Volatile Basic Nitrogen : TVB-N) ด้วยวิธีการกลั่น (distillation) Malle (1989)

ชั่งตัวอย่างเนื้อปลา 100 กรัม และเติม 7.5% trichloroacetic acid (TCA) 200 มิลลิลิตร ปั่นเนื้อปลาให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย โฮโมจีไนเซอร์ที่ความเร็วสูงนาน 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 4000 rpm นาน 15 นาที นำส่วนใส 25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดกลั่น (distillation tube) ทำการกลั่นด้วย Kjeldahl-type distillator (VAP 30) เติม 10% โซเดียมไฮดอกไซด์ (NaOH) 6 มิลลิลิตร ลงในหลอดกลั่น ระวังอย่าให้เนื้อปลาติดที่ด้านข้างหลอด จากนั้นนำบีกเกอร์ที่บรรจุ 4% กรดบอริค

(boric acid) 10 มิลลิลิตรและหยดโปรตีน อินดิเคเตอร์ 2-3 หยด (protein indicator) (methyl red ผสมกับ bromocresol green) ไปวางที่ปลายคอนเดนเซอร์ (condenser) เริ่มทำการกลั่นจนกระทั่งได้สารละลายที่กลั่นได้ (distillate) 40 มิลลิลิตร โดยทำการกลั่นภายใต้สภาวะดังต่อไปนี้ (ก่อนที่จะทำการกลั่นควรทำการกลั่นด้วยน้ำกลั่น เพื่อล้างทำความสะอาด)

ขั้นตอนที่ 1. เวลาในการเติมน้ำ	0	วินาที
ขั้นตอนที่ 2 . เวลาในการเติมด่าง NaOH	0	วินาที
ขั้นตอนที่ 3. เวลาในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างน้ำกับด่าง	0	วินาที
ขั้นตอนที่ 4. เวลาในการกลั่น	300	วินาที
ขั้นตอนที่ 5. การผลิตไอน้ำ (Steam generation)	80	%

จะสังเกตเห็นว่าสารละลายกรดบอริค (boric acid solution) จะเปลี่ยนเป็นสีเขียว จากนั้นไทเทรตกับ 0.1 N กรดซัลฟูริค (sulfuric acid) จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู

คำนวณ TVB-N content จาก (แสดงค่าออกเป็น mg TVB-N/100 g ตัวอย่าง)

$$\text{mg TVB-N (mg/100 g ตัวอย่าง)} = \frac{\text{(ปริมาณของกรดที่ใช้ x 14 x ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ไทเทรต)}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้}}$$

3.1.7 % K-value

วิเคราะห์ปริมาณ Adenosine Triphophate (ATP) และ สารที่ได้จากการสลายตัวของ ATP ซึ่งประกอบด้วย Adenosine diphosphate (ADP), Adenosine monophosphate (AMP), hypoxanthine (Hx), Inosine monophosphate (IMP) และ inosine (Ino) ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ตามวิธีของ Ryder, 1985 โดยทำตัวอย่างเนื้อปลาให้เป็นเนื้อเดียวกัน ด้วยโฮโมจีไนซ์เซอร์ โดยผสมเนื้อปลา 5 กรัม กับ 0.6 M perchloric acid 25 มิลลิลิตร ที่ 0° C นาน 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 9000 rpm นาน 10 นาที นำส่วนใส 10 มิลลิลิตร มาทำให้เป็นกลาง (pH 6.5-6.8) ด้วย 1M potassium hydroxide เพื่อตกตะกอน potassium perchlorate เก็บที่ 0°C นาน 30 นาที กรองเพื่อกำจัดตะกอนด้วยกระดาษกรอง Whatman no.0 เก็บตัวอย่างที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ –70 °C เพื่อรอการตรวจวัดกรองตัวอย่างด้วยเมมเบรนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 μm แล้วฉีดตัวอย่างสู่ HPLC ที่บันทึกข้อมูลด้วย Dial array Detector (DAD) ที่ 254 นาโนเมตร ใช้คอลัมน์ RP-C18 stainless-steelขนาด 25 เซนติเมตร x 3.9 มิลลิเมตร i.d. โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ

0.04 M KH_2PO_4 และ 0.06 M K_2HPO_4 pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 30 °C, ปริมาณตัวอย่างที่ฉีด(injection volume) 5 μl และอัตราเร็วการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ (flow rate) เท่ากับ 0.5 ml/min.

การหาระยะเวลาของสารแต่ละชนิดที่ถูกหน่วงอยู่ในคอลัมน์ (retention time) ทำโดยฉีดสารมาตรฐานของ ATP,ADP, AMP, IMP, Hx และ Ino ที่สภาวะดังกล่าว การวิเคราะห์ปริมาณ ATP และสารอนุพันธ์ที่เกิดขึ้น จะทำการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานและพีค (peak) ของตัวอย่างที่ตรวจวัดได้ โดยการทำ external standard curve คือ ฉีดสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น ที่ 0, 2, 4,6, 8 และ 10 ppm นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้พลอตกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้น จากนั้นคำนวนออกมาในรูปของ % K-value ตามสูตร คือ

$$\text{K-value (\%)} = \frac{\text{Hx} + \text{Ino}}{\text{ATP+ADP+AMP+IMP} + \text{Ino} + \text{Hx}} \times 100$$

3.1.8 คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ (ปิยะวรรณ, 2540)

3.1.8.1 การตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด (Total viable cell count)

ชั่งตัวอย่างเนื้อปลา 25 กรัม ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ ทำการเจือจางโดยปั่นผสมกับ 0.1% peptone 225 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องตีบดอาหาร (stomacher) จะได้ตัวอย่างเนื้อปลาที่มีความเจือจางที่ระดับ 10 เท่า ทำการเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) ตามความเหมาะสม เพื่อให้จำนวนโคโลนีที่มีอยู่ในเพาะเชื้อมีจำนวนอยู่ในช่วงระหว่าง 30-300 โคโลนี เลือกความเจือจางที่ระดับที่เหมาะสม 3 ระดับ จากนั้นปิเปตตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงในจานเพาะเชื้อ (spread plate) ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) ทำการทดลองระดับความเจือจางละ 3 ซ้ำ สำหรับตัวอย่างควบคุม (บรรจุภายใต้สภาวะปกติ) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ในตู้บ่มเชื้อปกติ และเพื่อการตรวจนับจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศในตัวอย่างที่บรรจุแบบปรับเปลี่ยนบรรยากาศ นำจานเพาะเชื้อบ่มใน โถบ่มสุญญากาศ (anaerobic jar) ที่บรรจุ สารผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2-generator) เพื่อปรับสภาะภายในโถบ่มให้เป็นสภาวะไร้อากาศ และใส่อินดิเคเตอร์เป็นตัวทดสอบสภาวะภายใน (CO_2-indicator) และบ่มที่ อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัมอาหาร (CFU/g)

3.1.8.2 การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรีย Coliform และ *Escherichia coli* ด้วยวิธี MPN (Most Probable Number) ระบบ 3 หลอด

1. การวิเคราะห์ขั้นแรก (Presumptive test)

ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างเนื้อปลาที่เจือจางด้วยฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (phosphate buffer) 10, 1, 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่บรรจุอาหารเหลว lactose broth ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า (double strength) และความเข้มข้นปกติ (single strength) พร้อมหลอดดักก๊าซ อย่างละ 1 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง อ่านผลหลอดที่เกิดก๊าซ นับจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซแล้วเปรียบเทียบกับตาราง MPN ซึ่งเป็นจำนวนของ Coliform ที่คาดว่าพบของการวิเคราะห์ขั้นแรก

2. การวิเคราะห์ขั้นยืนยัน (Confirm test)

เลือกหลอดที่เกิดก๊าซจากข้อ 1. ของแต่ละชุด เขย่าหลอดทดลอง แล้วใช้ ลูป (loop) ถ่ายเชื้อจาก lactose broth ลงในหลอดอาหาร (Brillient green lactose bile broth :BGLB) ที่มีหลอดดักก๊าซ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 48 ชั่วโมง อ่านผลหลอดที่เกิดก๊าซภายใน 48 ชั่วโมง แสดงว่าให้ผลบวกแล้วเปรียบเทียบกับตาราง MPN ซึ่งเป็นจำนวนของ Coliform ที่คาดว่าพบของการวิเคราะห์ในขั้นยืนยัน

3. การตรวจวิเคราะห์ขั้นสมบูรณ์ (Complete test)

ใช้ลูป (loop) ถ่ายเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกในหลอด BGLB ลงในจานอาหารเพาะเชื้อที่มีอาหาร EMB agar ด้วยการ streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่มีสีเขียวมันวาวเหมือนรอยตัดของโลหะ (metallic sheen) ซึ่งเป็นโคโลนีของ *E.coli* จากนั้นเก็บโคโลนีที่มี metallic sheen เลี้ยงบน Nutrient agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 24 ชั่วโมง เพื่อใช้ย้อมสี (gram staining), ดูลักษณะของแบคทีเรีย และทำการทดสอบชีวเคมี ด้วยการทดสอบปฏิกิริยา IMViC ถ้าผลทดสอบ IMViC ถ้าให้ผลเป็น ++-- และ เป็นแบคทีเรียรูปท่อน ย้อมติดสีแกรมลบ แสดงว่าพบ *E.coli* คำนวณค่า MPN ของ *E.coli* ต่อกรัมของอาหารจากหลอดที่ทดสอบ

3.1.8.3 การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella spp.*

Salmonella ที่มีในอาหารโดยปกติจะพบในปริมาณน้อยและในตัวอย่างอาหารที่นำมาทดสอบเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิต่ำ ทำให้เซลล์บาดเจ็บได้ จากการถูกทำลายด้วยความเย็นจัด ฉะนั้นจึงต้องทำการปรับสภาพเซลล์ให้คืนสภาพจากการบาดเจ็บ ใน pre-enrichment medium ดังนี้

1. Pre-enrichment เพื่อปรับสภาพเซลล์ให้คืนสู่สภาพปกติ พร้อมที่จะเพิ่มจำนวนได้ โดยชั่งตัวอย่างเนื้อปลา 25 กรัม ปั่นผสมกับ 0.1% peptone 225 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง

2. Enrichment เป็นการเพิ่มจำนวนเพื่อง่ายต่อการตรวจนับ โดยปิเปตตัวอย่างจากข้อ 1. 10 มิลลิลิตร ลงในฟลาส (flask) ที่บรรจุ enrichment broth 100 ml เขย่าผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 8-10 ชั่วโมง

3. Selective plating เพื่อทำการแยกโคโลนีของ *Salmonella* ใช้ลูป (loop) แตะส่วนบนของอาหาร enrichment broth แล้ว steak บนอาหาร Xylose lysine desoxycholate agar (XLD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีสีแดง ที่มีจุดสีดำอยู่ตรงกลาง ขนาดประมาณ 3-3.5 mm.

3.1.8.4 การตรวจวิเคราะห์ *Vibrio* spp.

เจือจางตัวอย่างเนื้อปลาที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตตัวอย่าง 0.1มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ระดับการเจือจางๆ ละ 3 ซ้ำ ลงบน Thiosulphate citrate bile-salt sucrose (TCBS) agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 24 ชั่วโมง ตรวจนับจุลินทรีย์ที่มีลักษณะเป็นโคโลนีสีเหลือง ขนาดประมาณ 2.5-3 mm.

3.1.8.5 การตรวจวิเคราห์ *Staphylococcus aureus*

เจือจางตัวอย่างเนื้อปลา ด้วย 0.1% peptone จนได้ระดับการเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker medium เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่ว (spread plate) ทำการทดลอง 3 ระดับการเจือจางๆ ละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีสีดำ กลม ขนาด1-1.5 mm. รอบๆ โคโลนีจะเห็นเป็นสีขาวขุ่น กว้างประมาณ 2-4 mm. และมีวงใสๆ อยู่รอบนอกอีกชั้นหนึ่ง (วงขาวขุ่นจะพบภายในระยะเวลา 36 ชั่วโมงเท่านั้น)

3.1.8.6 การตรวจวิเคราะห์ *Clostridium perfringens* และ *Clostridium botulinum*

เจือจางตัวอย่างเนื้อปลาที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) agar และ Trypticase Peptone Glucose Yeast Extract (TPYG medium) เพื่อตรวจนับ *C. perfringens* และ *C. botulinum* ตามลำดับ ทำการทดลอง 3 ระดับการเจือจางๆ ละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ37°C 24 ชั่วโมง ภายใต้โถบ่มสุญญากาศ (anaerobic jar) และใส่สารผลิตก๊าซ CO_2 และ อินดิเคเตอร์ สังเกตลักษณะโคโลนีสีดำ กลม ขนาด1-1.5 mm.

3.1.8.7 การตรวจวิเคราะห์แลคติก แอซิด แบคทีเรีย (Lactic acid bacteria)

เจือจางตัวอย่างเนื้อปลาที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตตัวอย่าง 0.1 ml ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่ว (spread plate) ทำการทดลอง 3 ระดับการเจือ

จางๆ ละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 วัน ภายใต้โถบ่มสุญญากาศ (anaerobic jar) และใส่สารผลิตก๊าซ CO_2 และ อินดิเคเตอร์ ตรวจนับโคโลนีที่เกิดขึ้น รายงานผลเป็น CFU/g

3.1.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (มนต์ชัย, 2537)

วิเคราห์ความแตกต่างของจำนวนวันในการเก็บรักษาแต่ละสภาวะความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บ โดยใช้ดัชนีคุณภาพทางด้านต่างๆ ที่ทำการตรวจวัด ด้วยโปรแกรม Statistical Analysis System (SAS) ซึ่งเป็นโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยออกแบบการทดลองชนิดแฟกทอเรียล CRD (Factorial experimental in CRD) ซึ่งมี 2 ตัวแปร คือ ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 ระดับคือ 0% (ภายใต้บรรยากาศปกติ), 25%, 50%, 75% และ 100% อุณหภูมิในการเก็บรักษา 3 ระดับ คือ 0,4 และ 10 °C ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of Variance (ANOVA) ,เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอายุการเก็บรักษาด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) และทำการพลอตกราฟ 3 มิติ เพื่อศึกษาแนวโน้มการเพิ่มอายุการเก็บรักษาของคาร์บอนไดออกไซด์ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลการตรวจวัดดัชนีคุณภาพ (indicator) ที่ยอมให้มีได้สูงสุด

การกำหนดดัชนีคุณภาพของเนื้อปลาที่ไม่เป็นที่ยอมรับแล้วนั้น จะทำการบ่มตัวอย่างเนื้อปลาที่อุณหภูมิห้อง นาน 12-16 ชั่วโมง จนกระทั่งเนื้อปลาลักษณะปรากฏเน่าเสีย คือ เนื้อสัมผัสนิ่มเละ มีกลิ่นเหม็นเน่า สีของเนื้อปลาเปลี่ยนไป และใช้จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ที่กำหนดตามมาตรฐานคุณภาพของผลิตภัณฑ์ประมง คือ ต้องไม่เกิน 1 x 10^7 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2538) เป็นเกณฑ์กำหนดว่า เนื้อปลานั้นเน่าเสีย จากนั้นทำการวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณของดัชนีคุณภาพ (indicator) ด้านต่างๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้นและกำหนดเป็นปริมาณที่ยอมให้มีได้สูงสุด (rejection limit) โดยดัชนีซึ่งแสดงถึงการเน่าเสียของเนื้อปลาที่ตรวจวิเคราะห์ได้แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ดัชนีบ่งบอกคุณภาพของเนื้อปลาที่ยอมให้มีได้สูงสุด

ดัชนีต่างๆ	ปริมาณที่ตรวจวัด
% การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss)	5.13
ความเป็นกรด ด่าง	8.3
ไตรเมทิลเอมีน :TMA (mg/ 100 g sample)	3.5
สารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด: TVB-N (mg/100 g sample)	25.10
%K-value	85.0

สำหรับคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อปลาแช่เยือกแข็งได้กำหนดจำนวนจุลินทรีย์ที่ยอมให้มีได้สูงสุด ดังนี้ (มัทนา, 2538)

1. จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด ต้องไม่เกิน 1 x 10^7 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม
2. *Escherichia coli* ค่า MPN ต้องไม่เกิน 100 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม
3. *Staphylococcus aureus* น้อยกว่า 200 โคโลนี

4. *Vibrio cholerae* ต้องตรวจไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัมทุกตัวอย่าง

5. *Salmonella* ต้องตรวจไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัมทุกตัวอย่าง

6. *Clostridium perfringens* และ *Clostridium botulinum* type E ต้องตรวจไม่พบในทุกตัวอย่าง

จะใช้ดัชนีคุณภาพทุกค่าที่กำหนดไว้ในตารางที่ 4.1 และดัชนีคุณภาพทางจุลินทรีย์เป็นตัวกำหนดอายุการเก็บรักษาเนื้อปลานิลที่เก็บรักษาภายใต้สภาวะการปรับเปลี่ยนบรรยากาศ สาเหตุที่ต้องตรวจวัดและกำหนดเกณฑ์คุณภาพต่างๆ ขึ้นใหม่ เนื่องจากเนื้อปลาแต่ละชนิดจะมีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีและมีปริมาณเมทาบอไลต์ต่างๆ ที่แสดงให้เห็นถึงการเน่าเสียที่แตกต่างกัน เนื่องจากเนื้อปลาแต่ละชนิดมีสัดส่วนของโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจนที่จะใช้เป็นสารตั้งต้น (substrate) ซึ่งจะก่อให้เมทาบอไลต์ในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น ปลาทะเลจะมีปริมาณ TMAO มากกว่าปลาน้ำจืดและปลาน้ำกร่อย เป็นต้น (Krzymien and Elias, 1990)

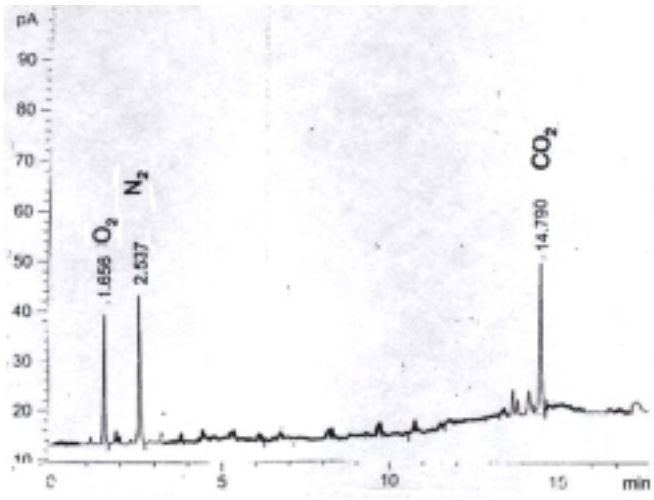
4.2 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพ

4.2.1 ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์,ออกซิเจนและไนโตรเจน

ภายใต้บรรยากาศปกติจะมีสัดส่วนของก๊าซ CO_2 ในปริมาณต่ำคือ 0.03% จากการทดลองวัดปริมาณก๊าซ O_2, CO_2 และ N_2 ในตัวอย่างด้วยก๊าซโครมาโทกราฟฟี (gas chromatography) (Jerferry, 1995, Obermiller and Freedman, 1965.) พบว่าเวลาที่ก๊าซแต่ละชนิดถูกหน่วงไว้ในคอลัมน์ (retention time) ของก๊าซทั้ง 3 ชนิดคือ 1.656, 2.537 และ 14.790 นาที ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.1 เมื่อทำการวัดปริมาณก๊าซในตัวอย่างควบคุมพบว่า มีสัดส่วนของก๊าซทั้ง 3 ชนิดเริ่มต้นดังนี้ O_2 20.02%, CO_2 0.02% และ N_2 77.96% จากนั้นติดตามการเปลี่ยนแปลงของก๊าซทั้ง 3 ชนิดในตัวอย่าง ดังแสดงในตารางภาคผนวก ข. และเมื่อเปรียบเทียบผลของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า การเปลี่ยนแปลงของปริมาณก๊าซไนโตรเจนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้ง 3 อุณหภูมิ เนื่องจาก คุณสมบัติของก๊าซไนโตรเจนเป็นก๊าซเฉื่อย ไม่ละลายเข้าไปในส่วนน้ำและไขมันของอาหาร (Church,1994, Fuji, Hirayama, Okuzumi, Yasuda and Yokoyama, 1989) และให้ผลเช่นเดียวกันกับตัวอย่างที่บรรจุภายใต้การปรับบรรยากาศทุกสภาวะ

ส่วนก๊าซออกซิเจนในตัวอย่างควบคุมนั้น พบว่าก๊าซออกซิเจนมีปริมาณลดลงเล็กน้อยตลอดช่วงเวลาการเก็บรักษา และเมื่อทำการเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิของการเก็บรักษาต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของออกซิเจน พบว่า ความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยที่อุณหภูมิ 10° C มีการลดลงของการออกซิเจนมากที่สุด รองลงมาคือ ที่ 4

และ 0 °C ตามลำดับ Ashie et al. (1996) อธิบายถึงการลดลงของก๊าซออกซิเจนในภาชนะบรรจุระหว่างการเก็บรักษาเนื่องจาก มีการเจริญและใช้ก๊าซออกซิเจนในการเจริญของแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญ (aerobic bacteria) และแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative bacteria) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะใช้ก๊าซออกซิเจนในภาชนะบรรจุ เป็นตัวรับอิเล็คตรอนตัวสุดท้าย (terminal electron acceptor) ในกระบวนการขนส่งอิเลคตรอน (electron transport) เพื่อใช้การหายใจและสังเคราะห์พลังงาน (Fraber et al., 1990, Fraser and Sumar, 1998) ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนที่อุณหภูมิต่างๆ แสดงในตารางภาคผนวก ข. และในส่วนของตัวอย่างที่รักษาภายใต้การปรับเปลี่ยนบรรยากาศในแต่ละสภาวะ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) แต่ปริมาณก๊าซออกซิเจนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย อาจเนื่องจากเกิดการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนจากบรรยากาศภายนอกเข้าสู่ภาชนะบรรจุ เนื่องจากภาชนะบรรจุแบบ LDPE/PA ไม่สามารถป้องกันการซึมผ่านของก๊าซต่างๆ ได้ 100% (งามทิพย์ ภู่วโรดม, 2538)



ภาพที่ 4.1 ระยะเวลาที่ก๊าซที่บรรจุในภาชนะบรรจุถูกหน่วงในคอลัมน์ (retention time) ของก๊าซออกซิเจน, ไนโตรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ จากการวิเคราะห์ด้วยก๊าซโครมาโทกราฟฟี (gas chromatography)

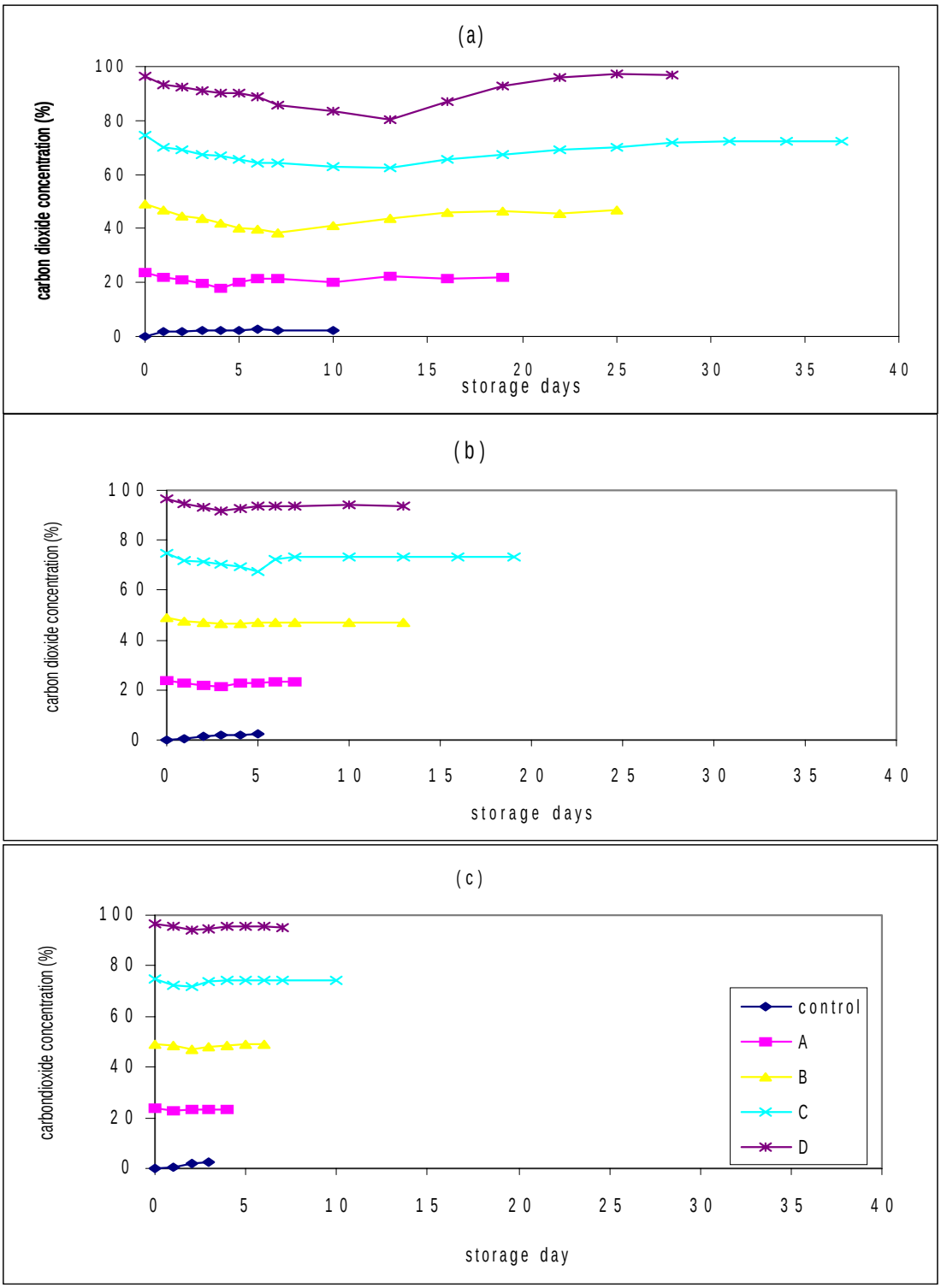
สำหรับการเปลี่ยนแปลงปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในตัวอย่างควบคุมพบว่า เริ่มต้นความเข้มข้นของก๊าซ CO_2 มีปริมาณที่ต่ำมากคือ 0.02% ซึ่งสัดส่วนของก๊าซในระดับนี้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการเน่าเสียในเนื้อปลาได้ และเมื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของก๊าซ CO_2 ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ยิ่ง ($p<0.01$) และเพิ่มขึ้นจากการเจริญของจุลินทรีย์และสร้างก๊าซ $C0_2$ (Gram and Huss, 1996, Gray et al., 1983)

ได้มีผู้แนะนำถึงการใช้ก๊าซ CO_2 ในสัดส่วนที่มากกว่า 25% เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหารที่มีความชื้นสูงและเน่าเสียง่าย และนักวิจัยหลายท่านได้ทำการทดลองถึงผลของก๊าซ CO_2 ต่อการยืดอายุการเก็บรักษารวมทั้งติดตามการเปลี่ยนแปลงของก๊าซชนิดนี้ในตัวอย่างปลาทะเลซึ่งมีไขมันสูงและต่ำในปริมาณที่แตกต่างกันอย่างแพร่หลาย (Hall, 1997, Vermeiren et al., 1999, Hendricks and Hotchkiss, 1997) แต่การทดลองในปลาน้ำจืดที่มีไขมันต่ำเช่น ปลานิล นั้นยังไม่แพร่หลายมากนัก จึงได้ทำการทดลองเริ่มต้นศึกษาผลของก๊าซ CO_2 ในสัดส่วนตั้งแต่ 25% และติดตามการเปลี่ยนแปลงของก๊าซ CO_2 ดังแสดงในภาพที่ 4.2 พบว่า อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษามีผลต่อการลดลงของก๊าซ CO_2 อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยพบว่า ที่ อุณหภูมิ 0° C ทำให้เกิดการลดลงของ CO_2 มากที่สุด รองลงมาคือ 4 และ 10 $^\circ$C ตามลำดับ โดยในช่วงแรกของการเก็บรักษามีการลดลงของก๊าซ CO_2 ซึ่งเกิดจากการละลายของก๊าซเข้าสู่ส่วนน้ำของตัวอย่างเนื้อปลาและเซลล์จุลินทรีย์ โดย CO_2 ที่ละลายเข้าไปนั้นจะเป็นส่วนที่มีบทบาทในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งจะก่อให้เกิดการเน่าเสียในตัวอย่างอาหาร และส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างในอาหารและเซลล์จุลินทรีย์ โดยที่อุณหภูมิต่ำจะเพิ่มการละลายของก๊าซเข้าไปในส่วนน้ำของอาหาร ทำให้ประสิทธิภาพของ CO_2 เพิ่มสูงขึ้น (King,1967, Wang and Brown,1983) และเมื่อทำการเก็บรักษาต่อไป สัดส่วนของก๊าซ CO_2 ค่อนข้างที่จะคงที่ โดยการละลายเข้าไปในส่วนน้ำของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในตัวอย่างเนื้อปลา จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้น อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาและปริมาณน้ำที่มีอยู่ในตัวอย่าง (Church, 1994)

4.2.2 การสูญเสียน้ำหนัก

ภายใต้สภาวะบรรยากาศปกติ การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อปลา เกิดเนื่องจากการเยิ้มน้ำซึ่งเป็นผลจากการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ รวมทั้งการย่อยสลายองค์ประกอบในส่วนที่เป็นโปรตีน ด้วยเอนไซม์ที่มีอยู่ในเนื้อปลา (กนกอร อินทราพิเชฐ, 2538) ลักษณะการเยิ้มน้ำของเนื้อปลานี้จะบ่งบอกถึงการเน่าเสียของเนื้อปลา โดยทั่วไปเนื้อปลาเน่าจะมีการสูญเสียน้ำหนักประมาณ 3-5% (Parry, 1993) แต่ในการสูญเสียน้ำหนักของเนื้อปลาจะเพิ่มขึ้นเมื่อทำการบรรจุภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูง เนื่องจากเมื่อมีการใช้ CO_2 จะส่งผลทำให้เกิดการลดต่ำลงของ pH ส่งผลทำให้ความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity) ของกล้ามเนื้อ



ภาพที่ 4.2 ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ภายในภาชนะบรรจุเนื้อปลานิลภายใต้สภาวะต่างๆ (A) 25%N_2:75%CO_2 (B) 50%CO_2:50%N_2 (C) 75%CO_2:25%N_2 (D) 100%CO_2 โดยทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ (a) 0 $^{\circ}$C, (b) 4 $^{\circ}$C และ (c) 10 $^{\circ}$C ตามลำดับ

ส่วนที่เป็นโปรตีน (muscle protein) ในเนื้อปลาลดลง จึงเกิดการเยิ้มน้ำออกจากเนื้อปลา และเกิดการสูญเสียน้ำหนักขึ้น ส่งผลถึงเนื้อสัมผัสของเนื้อปลา ทำให้เกิดลักษณะนิ่มเละ (Barnertt et al., 1991, Baker and Genigeorgis, 1990) และนอกจากนี้การเก็บเนื้อปลาไว้ภายใต้อุณหภูมิแช่แข็ง (0° C) ยังเพิ่มการเยิ้มน้ำของผลิตภัณฑ์อีกด้วย (Villemure et al., 1986)

จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างควบคุมซึ่งเก็บรักษาภายใต้บรรยากาศปกติ เมื่อเน่าเสียจะมีการสูญเสียน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 5.13% เมื่อใช้เกณฑ์นี้เป็นตัวกำหนดอายุการเก็บรักษา พบว่า ตัวอย่างควบคุมมีอายุการเก็บรักษาดังนี้คือ 3,5 และ 6 วัน ที่อุณหภูมิ 10, 4 และ 0 °C ตามลำดับ

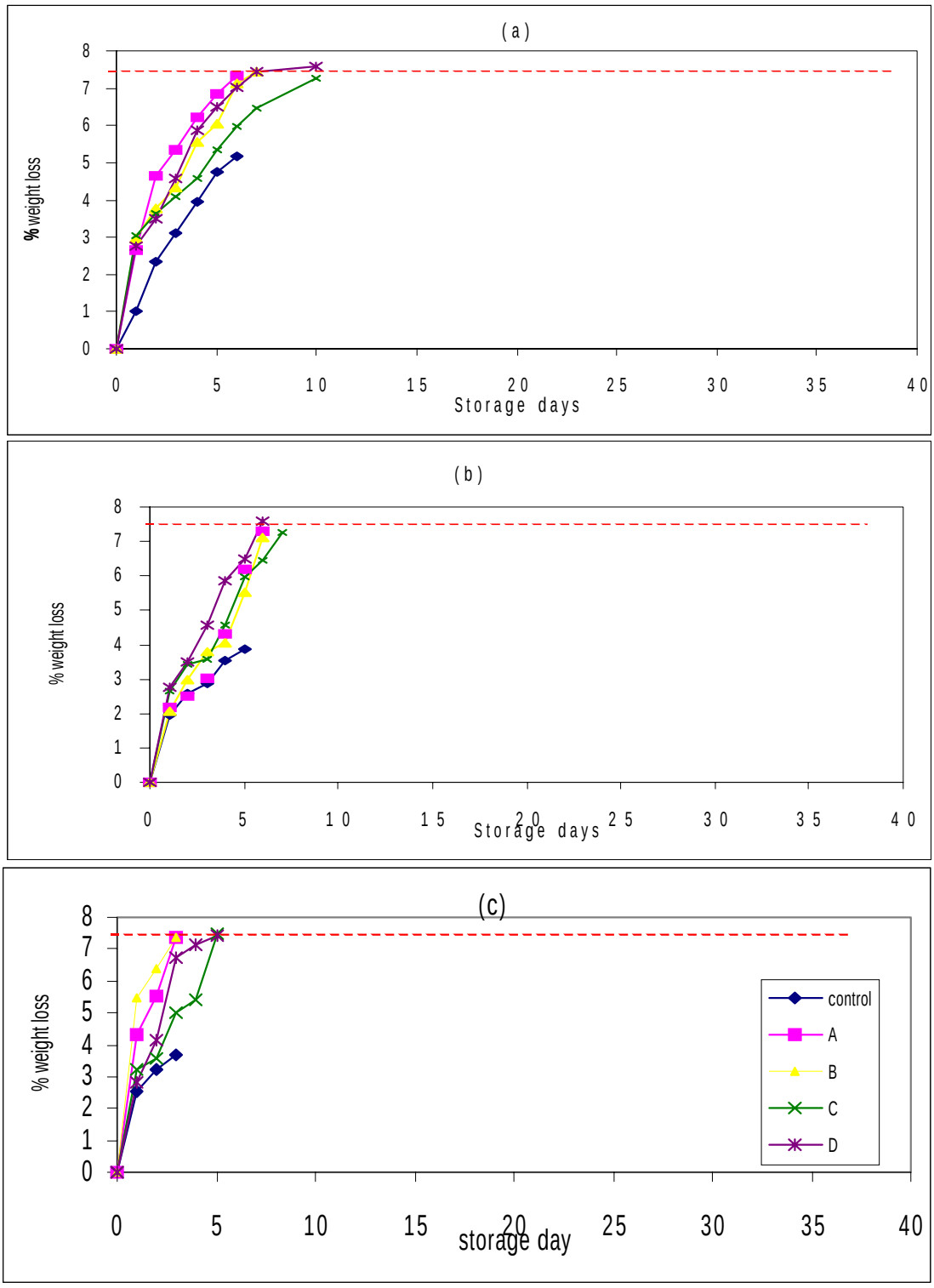
สำหรับตัวอย่างที่เก็บภายใต้การปรับบรรยากาศ พบว่าการสูญเสียน้ำหนักเพิ่มขึ้นตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา ดังแสดงในภาพ 4.3 และเนื้อปลานิลที่เน่าเสียแล้วจะมีการสูญเสียน้ำหนักเฉลี่ย เท่ากับ 7.5% และเมื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของ CO_2 และอุณหภูมิต่อการสูญเสียน้ำหนักพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) เมื่อใช้การสูญเสียน้ำหนักที่ 7.5% เป็นเกณฑ์กำหนดอายุการเก็บรักษา พบว่า ที่สภาวะ 75% CO_2 : 25% N_2 มีอายุการเก็บรักษา เท่ากับ 5, 7 และ 10 วัน ที่อุณหภูมิ 10, 4 และ 0 °C ตามลำดับ, ที่ 100 % CO_2 (5, 6 และ 10 วัน ที่อุณหภูมิ 10, 4 และ 0 °C ตามลำดับ), 50% CO_2 : 50% N_2 (3, 6 และ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 10, 4 และ 0 °C ตามลำดับ), 25% CO_2 : 75% N_2 (3, 6 และ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 10, 4 และ 0 °C ตามลำดับ)

จากการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Villemure et al. (1986) ซึ่งได้ทำการทดลองเก็บรักษาปลาคอด ภายใต้บรรยากาศที่มีการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณสูงมากกว่า 25%ร่วมกับการลดอุณหภูมิการเก็บรักษา พบว่า คาร์บอนไดออกไซด์มีผลโดยตรงต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของเนื้อปลาคอด จะสังเกตเห็นว่า เนื้อปลานิ่ม มีน้ำเยิ้มออกมาสู่พลาสติกที่บรรจุ และการเยิ้มน้ำจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเก็บรักษาเนื้อปลาภายใต้อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง

4.3 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมี

4.3.1 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลง pH ในตัวอย่างเนื้อปลานิลสดเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 6.54 และเมื่อเก็บภายใต้สภาพบรรยากาศปกติพบว่า pH จะเพิ่มขึ้นตลอดช่วงอายุการเก็บรักษาเป็น 8.3 ที่ 10 °C ภายใน 3 วัน และมีลักษณะปรากฏที่บ่งบอกถึงการเน่าเสีย สาเหตุการเพิ่มขึ้นของ pH หลังจากการเปลี่ยนแปลงในระยะหลังจากการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อปลา (post mortem) เนื่องจากมีการเจริญของจุลินทรีย์พร้อมๆ กับการผลิตสารเมทาโบไลท์ ต่างๆ ขณะเดียวกันจะเกิดการสลายตัวของสารประกอบไนโตรเจน (nitrogenous compounds) เช่น TVB-N ทำให้ pH เพิ่มสูงขึ้น (Sikorski, 1990, Burns and Ke, 1985, Dalgaard et al., 1993) และ Ray (1996) กล่าวว่าการเพิ่มของ



ภาพที่ 4.3 การสูญเสียน้ำหนัก (%weight loss) ในเนื้อปลานิล ซึ่งเก็บรักษาภายใต้สภาวะต่างๆ คือ (A) 25%N_2:75%CO_2 (B) 50%CO_2:50%N_2 (C) 75%CO_2:25%N_2 (D) 100%CO_2 โดยทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ (a) 0 °C, (b) 4 °C และ (c) 10 °C ตามลำดับ, ------- = ปริมาณสูงสุดที่ยอมรับได้ (rejection limit) = 7.5%

pH จะสัมพันธ์กับอุณหภูมิการเก็บรักษา คือ อุณหภูมิต่ำสามารถชะลอการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ได้ทำให้การเพิ่มขึ้นของ pH เป็นไปอย่างช้าๆ สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ในตัวอย่างควบคุม

เมื่อเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อการเพิ่มขึ้นของ pH พบว่า อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษามีผลในการยืดช่วงระยะเวลาการเพิ่มขึ้นของ pH อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) โดยที่อุณหภูมิ 0 $^{\circ}$C สามารยืดระยะเวลาการเพิ่มของ pH จนถึงระดับสูงสุดที่ยอมรับได้ ได้นานถึง 10 วัน ขณะที่ 4 และ 10 $^{\circ}$C คือ 5 และ 3 วัน ตามลำดับ

ผลการเปลี่ยนแปลง pH แสดงในภาพที่ 4.4 ในตัวอย่างที่เก็บรักษาภายใต้การปรับเปลี่ยนบรรยากาศนั้น จะมีลักษณะการเปลี่ยนแปลง pH ที่แตกต่างจากการเก็บรักษาภายใต้บรรยากาศปกติ คือ ในช่วงแรกของการเก็บรักษา pH จะลดต่ำลง โดยการลดต่ำลงของ pH จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และอุณหภูมิ (Wang and Brown, 1983, Daniels, Krishnamurthl and Rizvi,, 1985) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้คือ ที่สภาวะ 100% CO_2 pH ลดต่ำลงถึง 6.03, 6.27 และ 6.33 ที่อุณหภูมิ 0, 4 และ 10 $^{\circ}$C ตามลำดับ, สภาวะ 75% CO_2 : 25 % N_2 pH ลดต่ำลงที่ 6.05,6.28 และ 6.37 ที่อุณหภูมิ 0, 4 และ 10 $^{\circ}$C ตามลำดับ, สภาวะ 50% CO_2 : 50 % N_2 pH ลดต่ำลงที่ 6.25, 6.34 และ 6.43 ที่อุณหภูมิ 0, 4 และ 10 $^{\circ}$C ตามลำดับ และ ภายใต้สภาวะ 25% CO_2 : 75 % N_2 มีการลดต่ำลงของ pH น้อยที่สุดคือ 6.33, 6.4 และ 6.52 ที่อุณหภูมิ 0, 4 และ 10 $^{\circ}$C ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้ สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลง pH เนื่องจากคาร์บอนไดออกไซด์ในปลา finfish (Bank et al., 1980), ปลาคอด (Dalgaard et al., 1993), ปลาทะเลและผลิตภัณฑ์ปลาอื่น (Fraser and Sumar, 1998)

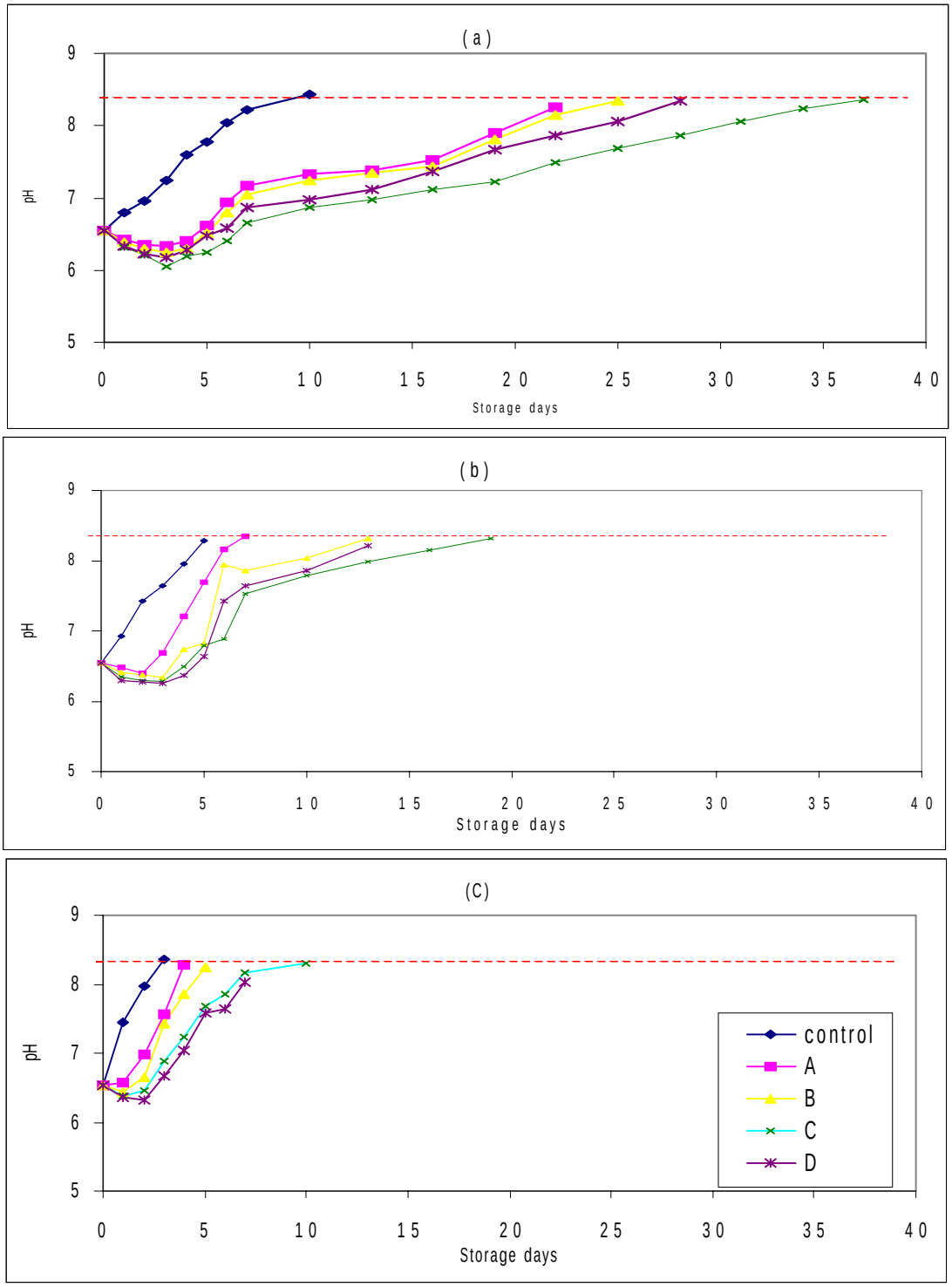
เหตุผลของการลดต่ำลงของ pH ในช่วงแรกของการเก็บรักษานั้น เนื่องจากเมื่อมีการใส่ CO_2 ลงไป CO_2 จะละลายเข้าไปในเนื้อปลา และเกิดการแตกตัวกลายเป็นกรดคาร์บอนิคโดยลำดับการแตกตัวของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แสดงได้ดังนี้

ขั้นที่ 1

$$CO_2 \text{ (dissolved)} + H_2O \xrightarrow{K_{hyd} = 2.6 \times 10^{-3}} H_2CO_3$$

ขั้นที่ 2

$$H_2CO_3 \underset{}{\overset{K_{hyd} = 4.3 \times 10^{7}}{\rightleftharpoons}} H^+ + HCO_3^-$$



ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลง pH ในเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้สภาวะต่างๆ คือ (A) 25%N_2:75%CO_2 (B) 50%CO_2:50%N_2 (C) 75%CO_2:25%N_2 (D) 100%CO_2 โดยทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ (a) 0 °C, (b) 4 °C และ (c) 10 °C ตามลำดับ, ------- = ปริมาณสูงสุดที่ยอมรับได้ (rejection limit) = 8.3

ขั้นที่ 3

$$K_{hyd} = 5.61 \times 10^{-11}$$

$$HCO_3^- \rightleftharpoons H^+ + CO^{2-}_3$$

จากปฏิกิริยาในขั้นตอนที่ 1. ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะละลายในน้ำของอาหารและเกิดการไฮเดรชั่น (Hydration) เป็นกรดคาร์บอนิก แต่จากค่าคงที่สมดุล (equilibrium constant) การเกิดไฮเดรชั่นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำแสดงว่ามีกรดคาร์บอนิคในสารละลายเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับการละลายของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ขณะที่เกิดกรดคาร์บอนิคก็จะมีกรดคาร์บอนิค ส่วนหนึ่งแตกตัวต่อไปเป็นไบคาร์บอเนตอิออนและไฮโดรเจนอิออนอย่างรวดเร็ว เนื่องจากกรดคาร์บอนิคเป็นกรดแก่ดังแสดงในปฏิกิริยาขั้นที่ 2 และในปฏิกิริยาขั้นที่ 3 จะมีการแตกตัวของไบคาร์บอเนตอิออนบางส่วนต่อไปอีก เกิดเป็นไฮโดรเจนอิออนกับคาร์บอเนตอิออน ซึ่งการแตกตัวของกรดคาร์บอนิคไปเป็นอิออนชนิดต่างๆนั้นขึ้นกับค่า pH ของตัวอย่างหรือสารละลาย พบว่า ที่ค่า pH ต่ำกว่า 7 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สามารถละลายน้ำได้ดีจึงเกิดเป็นกรดคาร์บอนิคและกรดคาร์บอนิคจะเกิดการแตกตัวต่อไปเป็นไบคาร์บอเนตและไฮโดรเจนอิออน ซึ่งการแตกตัวจะเกิดได้ดีที่ pH ระหว่าง 7-11 และที่ pH ประมาณ 8-14 ไบคาร์บอเนตจะมีการแตกตัวต่อเป็นคาร์บอเนตอิออนและไฮโดรเจนอิออน Danial et al. (1986) รายงานว่าเมื่อใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในการเก็บรักษาเนื้อสัตว์นั้น ในขั้นแรกก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะละลายในส่วนของของเหลวในเนื้อเยื่อเกิดเป็นกรดคาร์บอนิคแล้วกรดนี้บางส่วนจะซึมผ่านเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ในรูปที่ยังไม่แตกตัว เมื่อเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์แล้วจะเกิดการแตกตัวได้เป็นไบคาร์บอเนตอิออนและไฮโดรเจนอิออน ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ส่งผลทำให้ค่า pH ภายในเซลล์จุลินทรีย์ลดลง และพบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไบคาร์บอเนตอิออนด้วย อีกทั้งเมื่อลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาให้ต่ำลงจะเพิ่มความสามารถในการละลายของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นด้วย แต่อย่างไรก็ตาม การลดอุณหภูมิในการเก็บรักษานั้นไม่ควรต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส เพราะถึงแม้ว่าจะลดอุณหภูมิให้ต่ำกว่านี้ประสิทธิภาพในการละลายก็ไม่เพิ่มขึ้น (Wolfe, 1980)

ซึ่งเมื่อ pH ลดต่ำลงก็จะมีผลต่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถทนกรดได้ และนอกจากนี้ CO_2 ยังมีผลต่อการรบกวนเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ทำให้ความสามารถในการซึมผ่านเปลี่ยนแปลงไป และมีผลต่อการเข้า-ออกของสารที่จำเป็นในการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้ชะลอและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย และทำให้การเพิ่มขึ้นของ pH ช้าลง และ ประสิทธิภาพของ CO_2 ที่จะทำให้ pH ของอาหารลดลงนั้นจะมีเพิ่มขึ้นถ้าเก็บรักษาอาหารไว้ที่อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากการละลายและการแตกตัวของ CO_2 จะเพิ่มสูงขึ้น Ray (1996) และ Gould

(1995) พบว่า ก๊าซคาร์บอนออกไซด์ควรมีปริมาณสูงมากกว่า 25% จึงจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง pH ในตัวอย่างอาหารและในเซลล์ของจุลินทรีย์

จากนั้นเมื่อเก็บรักษาต่อไป จะพบว่า อุณหภูมิและสภาวะการปรับบรรยากาศมีผลต่อระยะเวลาการเพิ่มขึ้นของ pH อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ pH จะสัมพันธ์กับการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ รวมถึงการสร้างเมทาบอไลต์ (metabolite) ต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์กับคุณภาพของเนื้อปลา ซึ่งผลการทดลองที่ได้คือ สภาวะ 75% CO_2 : 25 % N_2 สามารถยืดระยะเวลาการเพิ่มขึ้นของ pH จนถึงระดับสูงสุดที่ยอมรับได้ 37, 19 และ 10 วัน ที่อุณหภูมิ 0, 4 และ 10 $^{\circ}$C ตามลำดับ รองลงมาคือ ที่สภาวะ 100 % CO_2 เท่ากับ 28, 13 และ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 0, 4 และ 10 $^{\circ}$C ตามลำดับ, ภายใต้สภาวะ 50% CO_2 : 50 % N_2 เท่ากับ 25, 13 และ 5 วัน ที่อุณหภูมิ 0, 4 และ 10 $^{\circ}$C ตามลำดับ,และ สภาวะ 25% CO_2 : 25 % N_2 คือ 14, 9 และ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 0,4 และ 10 $^{\circ}$C ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ภายใต้สภาวะ สภาวะ 75% CO_2 : 25 % N_2 ที่อุณหภูมิ 0°C สามารถชะลอการเพิ่มขึ้นของ pH ได้มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Galvez,1995 ศึกษาผลของ CO_2 ต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH ในตัวอย่างปลาทูน่า ที่ความเข้มข้นของ CO_2 และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน พบว่า สภาวะ 75% CO_2 : 25 % N_2 ที่อุณหภูมิ 0°C เป็นสภาวะที่ดีที่สุดในการเก็บรักษาและยังชะลอการเพิ่มขึ้นของ pH ได้นานที่สุดอีกด้วย

จะเห็นว่าเมื่อเราทำการบรรจุเนื้อปลาลงในสภาวะบรรยากาศต่างๆ ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ อัตราการเพิ่มขึ้นของ pH จะถูกชะลอ/หน่วงให้ช้าลง ทำให้เราสามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้ สาเหตุเพราะ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ส่งผลกระทบในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย เนื่องมาจากผลของการเปลี่ยนแปลง pH ในช่วงแรกของการเก็บรักษา และได้มีผู้พยายามอธิบายเหตุผลของการเพิ่มขึ้นของ pH อย่างช้าๆ ในตัวอย่างที่บรรจุสภาะการปรับเปลี่ยนบรรยากาศ (MAP) แตกต่างจากตัวอย่างควบคุม คือ ภายใต้ MAP จะมีสภาวะเป็นแบบไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) ทำให้จุลินทรีย์ที่เจริญได้เป็นจุลินทรีย์พวกที่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย ซึ่งได้แก่พวก lactic acid bacteria เมื่อมีการเจริญของจุลินทรีย์พวกนี้จะมีการสร้างกรดแลคติกทำให้ pH ของอาหารลดต่ำลงด้วย (Fraber, 1991, Fraser and Sumar, 1998, Gram and Huss, 1996, Parry, 1993)

4.3.2 %K-Value

ทำการวิเคราะห์ปริมาณของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และสารประกอบที่เกิดขึ้นด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ RP-C18 stainless-steel ขนาด 25 cm x 3.9 mm. i.d. สามารถแยกสารประกอบนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้นได้ที่เวลาต่างๆ กันดังนี้

ATP = 16.905, ADP = 17.720, AMP = 19.299, IMP = 15.217, Ino = 47.0739 และ Hyp = 21.953 นาที

ดังแสดงในภาพที่ 4.5 ซึ่งการใช้ HPLC ในการแยกสารชนิดต่างๆนั้น อาศัยหลักความสามารถในการกระจายตัวในเฟส 2 เฟสที่แตกต่างกัน คือ เฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยภายในคอลัมน์ที่ใช้ในครั้งนี้จะมีสภาพที่ไม่มีขั้ว (non polar) ในขณะที่เฟสเคลื่อนที่จะมีสภาพขั้ว (polar) ดังนั้นจะเกิดการแยกของสารแต่ละชนิดในตัวอย่างสารสกัดเนื้อปลา จากความแตกต่างของสภาพขั้วนี้เอง สารที่มีความเป็นขั้วมากกว่า จะเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าสารที่มีสภาพความเป็นขั้วน้อย (Potter and Hotchkis, 1995, Ryder, 1985)

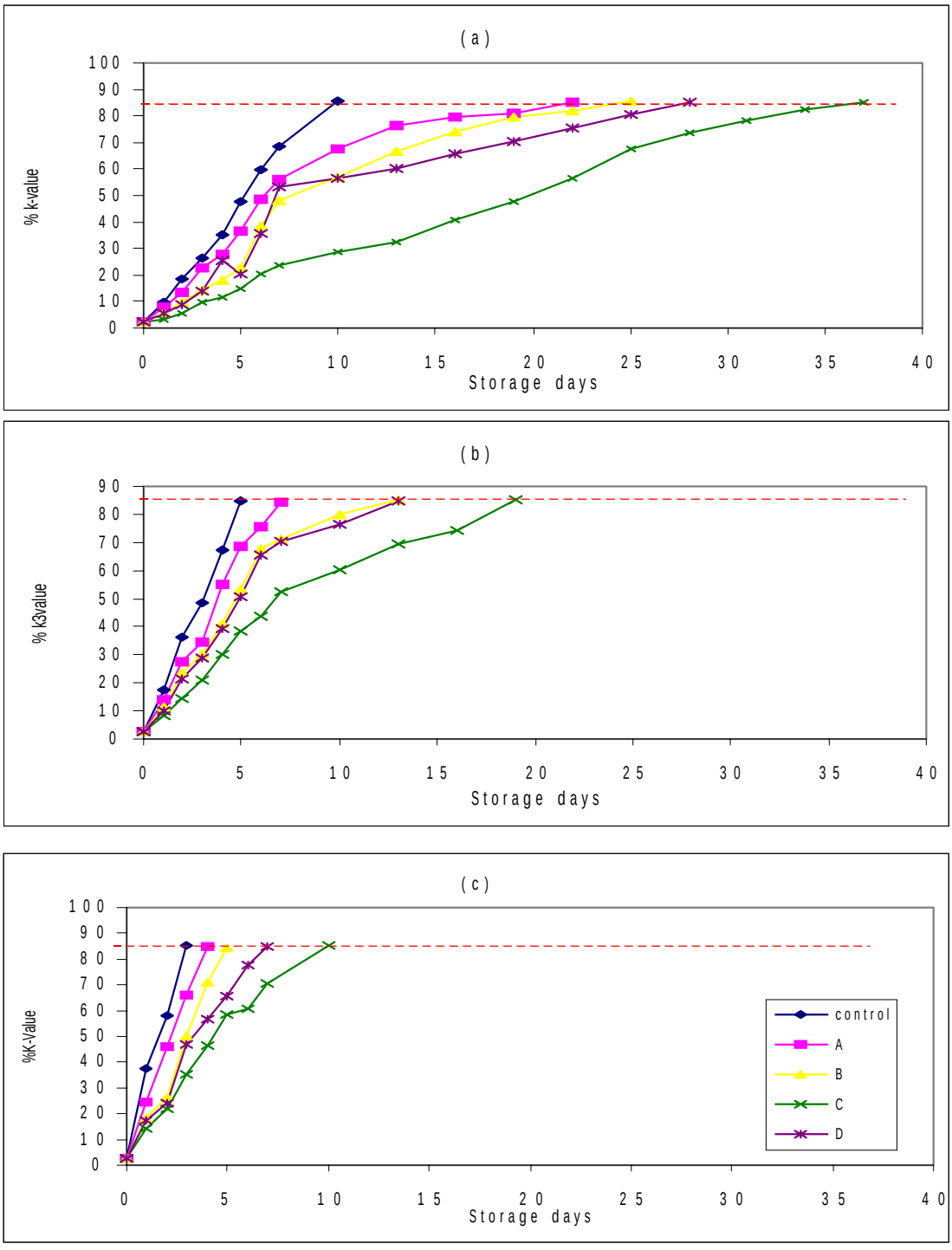
ค่า %K-value นั้นเราจะวัดจากการสลายตัวของสารประกอบ nucleotide คือ เมื่อปลาตายจะเกิดการสลายตัวของ ATP $\longrightarrow$ ADP $\longrightarrow$ AMP $\longrightarrow$ IMP $\longrightarrow$ Ino $\longrightarrow$ Hyp ด้วยเอนไซม์ที่มีอยู่ในเนื้อปลา (endogenes enzyme) และจากกิจกรรมของแบคทีเรีย (bacteria activity) ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยสารที่เกิดขึ้นในแต่ละขั้นตอนจะมีผลต่อกลิ่นรส (flavor) ของเนื้อปลา คือ IMP จะสัมพันธ์กับ รสชาติความหวานสด (sweet flavor) เนื่องจากเป็นสารที่เสริมฤทธิ์ (synergistic substance) กับกรดอะมิโน, น้ำตาลและน้ำตาลฟอสเฟต (sugar phosphate) ดังนั้นถ้าเราสามารถรักษาปริมาณ IMP ให้ได้คงอยู่นานๆ เนื้อปลาก็จะยังคงคุณภาพความสด ในขณะที่ Hyp, Ino ที่ผลิตขึ้นในช่วงหลังของการเก็บรักษา จะสัมพันธ์กับรสขม (bitter flavor) ซึ่งมีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภคและอายุการเก็บรักษา (shelf-life) ของเนื้อปลา ซึ่งปริมาณของ Hyp ที่ยอมให้มีได้สูงสุดคือ 1.5-2 μmol/g (Parry, 1993, Burt, 1997, Church et al., 1995, Fuji et al., 1989)

ภาพที่ 4.5 retention time ของ สารประกอบนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ซึ่งทำการแยกด้วย High Performance Liquid Chromatography : HPLC โดยใช้คอลัมน์ μBondapak RP-C18 stainless-steel

จากการทดลองพบว่าเนื้อปลาสดยังคงมีค่า %K-value ที่ต่ำอยู่คือ 2.54% แสดงว่าปลายังคงมีความสดอยู่มากและมี IMP ในปริมาณสูงคือ 5 μmol/g, Hyp = 0.11 μmol/g และ Ino = 0.17 μmol/g

โดยปกติมาตรฐานคุณภาพของเนื้อปลาสดในต่างประเทศจะกำหนดให้มีค่า %K-value ไม่เกิน 60% แต่เมื่อทำการทดลอง พบว่า ทำการเก็บรักษาปลาไว้ที่ทุกๆ สภาวะจะมี %K-value เพิ่มสูงขึ้นจนถึง 60% อย่างรวดเร็ว ในขณะที่ดัชนีคุณภาพทางเคมี (chemical indicator) อื่นๆและดัชนีคุณภาพทางจุลินทรีย์ (microbial indicator) ยังไม่เกินมาตราฐานที่กำหนด และเนื้อปลานิลยังคงมีลักษณะที่ยังยอมรับได้ การที่ %K value เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วนั้น เนื่องจากค่า K-value เราจะคิดจากสัดส่วนของ Hyp กับ Ino ต่อสารประกอบทั้งหมดที่เกิดขึ้น ซึ่งพบว่า ATP จะถูกเปลี่ยนไปเป็น AMP อย่างรวดเร็วภายใน 12-24 ชั่วโมงและ AMP จะถูกเปลี่ยนเป็น IMP อย่างสมบูรณ์และรวดเร็วภายใน 2-3 วัน เนื่องจากเอนไซม์ที่มีอยู่ในเนื้อปลา (endogenous enzyme) และ เมื่อเก็บรักษาต่อไปเรื่อยๆ จะเกิดการสลายตัวเฉพาะ IMP ไปเป็น Hyp และ Ino จึงทำให้สัดส่วนของ %K-value มีค่าสูงขึ้น ซึ่ง Mazorra et al. (2000) แนะนำว่าไม่ควรใช้ค่า %K-value เป็นอินดิเคเตอร์เพียงค่าเดียวเนื่องจากค่านี้ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับคุณภาพทางประสาทสัมผัสมากนัก แต่ควรมีดัชนีคุณภาพทางเคมี (chemical indicator) ค่าอื่นร่วมพิจารณาคุณภาพของเนื้อปลาด้วย (Surette et al., 1988, Villarreal and Pozo, 1990)

ผลการทดลองการเปลี่ยนแปลง % K-value แสดงในภาพที่ 4.6 พบว่า สภาวะการปรับบรรยากาศและอุณหภูมิการเก็บรักษามีผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่า K-value อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) กล่าวคือ เนื้อปลาสดเริ่มต้นมี %K-value เท่ากับ 2.54% จากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงระดับสูงสุดที่ยอมรับได้ (rejection limit) ที่ 85.0% ภายใน 3, 5 และ 10 วัน ที่บรรยากาศปกติและอุณหภูมิ 10,4 และ 0 °C ตามลำดับ ในขณะที่ ตัวอย่าง MAP นั้น เราสามารถยืดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษาโดยพิจารณาจากค่า % K-value ออกไปได้มากกว่าบรรยากาศปกติ ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบระยะเวลาการเก็บรักษาเฉลี่ยด้วย Duncan Multiple Range Test พบว่า ที่สภาวะ 75% CO_2 : 25% N_2 สามารถยืดระยะเวลาการเพิ่มขึ้นของ %K-value จนถึงระดับสูงสุดที่ยอมรับได้ภายใน 37,19 และ10 วัน ที่อุณหภูมิ 0,4,10°C ตามลำดับ รองลงมาคือ 100% CO_2 25,13 และ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 0,4,10°C ตามลำดับ และที่ 50% CO_2 : 50% N_2 คือ 21,10 และ 5 วัน ที่อุณหภูมิ 0,4,10°C และที่ 25% CO_2 : 75% N_2 14, 9 และ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 0,4,10°C ตามลำดับ การที่บรรจุภายใต้สภาวะการปรับบรรยากาศ (MAP) มีผลในการยืด/ชะลอการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบนิวคลีโอไทด์นั้นเพราะ สามารถยับยั้งเอนไซม์ในจุลินทรีย์มีหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงสารประกอบดังกล่าวโดยเฉพาะ IMP dehydrogenaes ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการเปลี่ยน IMP ให้เป็น Ino เอนไซม์



ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลง %K-Value ในเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้สภาวะต่างๆ คือ (A) 25%N_2:75%CO_2 (B) 50%CO_2:50%N_2 (C) 75%CO_2:25%N_2 (D) 100%CO_2 โดยทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ (a) 0 °C, (b) 4 °C และ (c) 10 °C ตามลำดับ, ------- = ปริมาณสูงสุดที่ยอมรับได้ (rejection limit) = 85.0%

ชนิดนี้เป็นเอนไซม์ที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH (pH sensitive enzyme)โดยมี pH ที่เหมาะสม (optimum pH)ในการทำงานที่ 7.5-8 ดังนั้นในช่วงแรกของการเก็บรักษาที่มีการลดต่ำลงของ pH ประมาณ 6 - 6.5 เนื่องจากคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ จึงสามารถชะลอการเพิ่มขึ้นของ %K-value ได้ และสามารถรักษาปริมาณ IMP ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดรสหวานในเนื้อปลาไว้ได้นานเพิ่มขึ้น อีกทั้งเมื่อชะลอกิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ดังกล่าวได้ จะทำให้ปริมาณแอมโมเนียซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของ IMP ไปเป็น Ino จึงส่งผลให้การเพิ่มขึ้นของปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB-N) ถูกชะลอลงด้วย (Parkin et al., 1981, Manzano-mazorra et al., 2000, Sureette et al., 1988, Ryder, 1885)

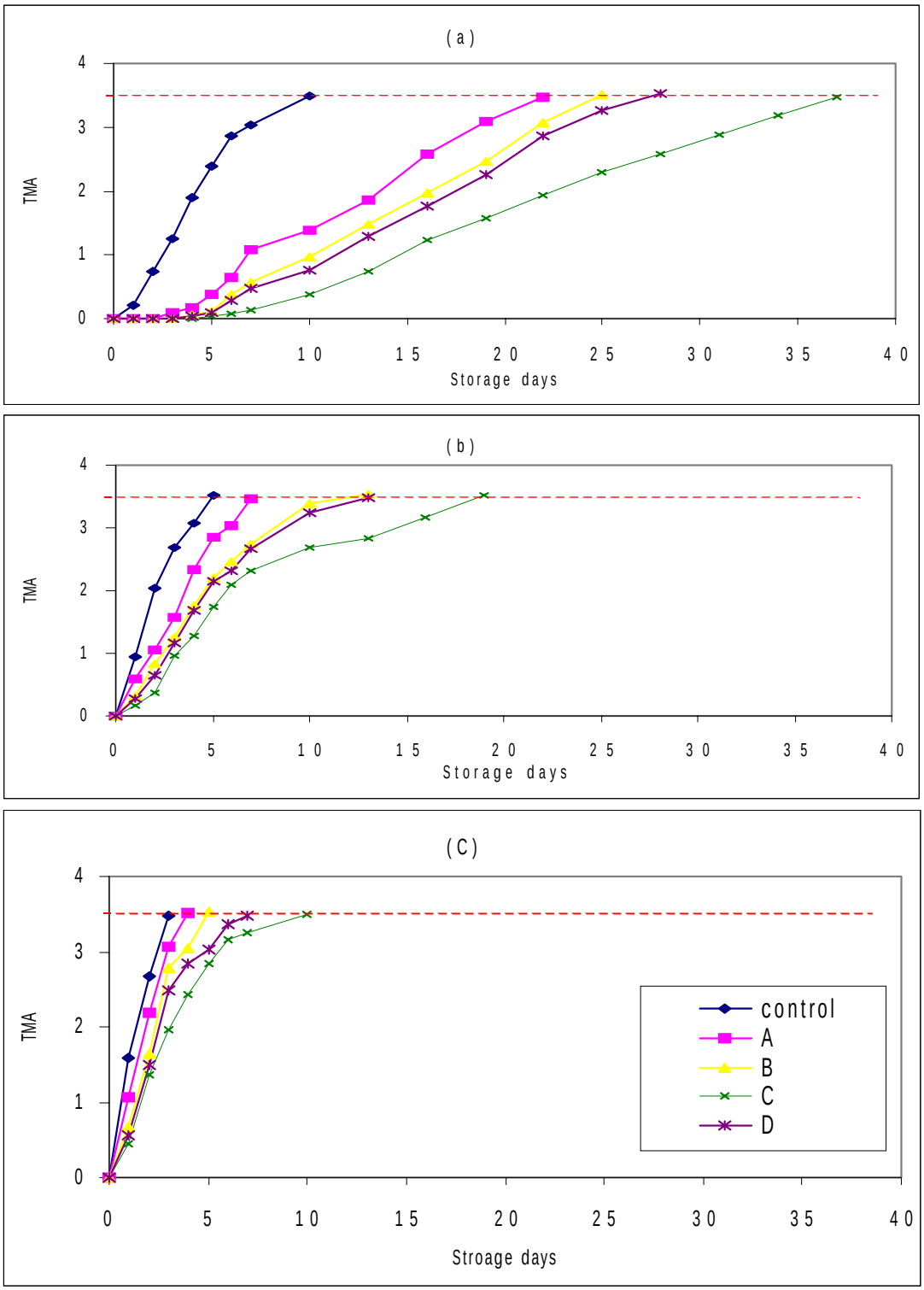
4.3.3 ปริมาณไตรเมทิลเอมีน (Trimethyamine :TMA)

โดยปกติปลาจะมีไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ (trimethylamine oxide : TMAO) เป็นองค์ประกอบเพื่อทำหน้าที่เป็น osmoregulant เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำออกจากตัวปลา (water logout) ปริมาณ TMAO ที่มีอยู่ในเนื้อปลาจะขึ้นอยู่กับ ชนิด ขนาด อายุและฤดูการจับปลา และเมื่อปลาตายจะเริ่มมีการเจริญของจุลินทรีย์ทำให้เกิดการรีดิวซ์ TMAO เกิดเป็น TMA ด้วย เอนไซม์ในตัวปลาและเอนไซม์จากแบคทีเรีย (bacterial enzyme) ที่เรียกว่า trimethyamine oxidase ซึ่ง TMA ที่ผลิตขึ้นก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นเน่า และกลิ่นคาวอย่างรุนแรง ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่ต้องการของผู้บริโภค และมีความสัมพันธ์กับจำนวนแบคทีเรีย การไม่ยอมรับจากคุณภาพทางประสาทสัมผัส (sensory rejection) พบว่าปริมาณ TMA จะเพิ่มขึ้น และเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระยะเวลาการเก็บรักษา ดังนั้นจึงนิยมใช้ TMA เป็นดัชนี (chemical indicator) เพื่อใช้พิจารณาคุณภาพของปลาและอาหารทะเลเพื่อใช้ในการกำหนดอายุการเก็บรักษา (Villarreal and Pozo, 1990, Wang and Brown, 1983, Barnett et al., 1991)

การวิเคราะห์หาปริมาณ TMA ด้วยวิธีการวัดการดูดกลืนแสงนั้น (Colorimetric method) (AOAC, 1995) มีหลักการคือ เราจะนำเนื้อปลามาสกัดด้วย TCA เพื่อตกตะกอนโปรตีน ดังนั้นเราจะได้สารสกัดที่ไม่มีโปรตีน (free-protein extract solution) จากนั้นเติม ฟอร์มาลิน (formalin) จะเกิดปฏิกิริยาได้ hexamethylene-tetramine เพื่อที่จะกำจัดแอมโมเนียออกจากสารสกัดแล้วจึงเติมด่าง (K_2CO_3) และ โทลูอีน (toluene) ลงไป โดยส่วนของไตรเมทิลเอมีนที่ไม่มีเบสอื่นๆ อยู่ (TMA-free base) จะละลายในชั้นของโทลูอีน (toluene) แล้วจึงดูดชั้น toluene ออกมา จากนั้นเติม picric acid ลงไปเพื่อจับกับ TMA ที่มีอยู่ในตัวอย่าง วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

พบว่า ในเนื้อปลานิลสดเริ่มต้นจะมีปริมาณ TMA ที่ต่ำมากคือ 0.02 mg TMA/100 g sample ในสภาวะปกติ (control) ปริมาณของ TMA จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงระดับมาตรฐานที่กำหนด (ภายใน 3 วัน ที่อุณหภูมิ 10°C ซึ่งเราจะสังเกตเห็นว่าตัวอย่างจะมีกลิ่นเหม็นเน่าอย่างรุนแรงจนไม่เป็นที่ยอมรับ เมื่อทำการบรรจุตัวอย่างไว้ที่บรรยากาศแตกต่างกันร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ พบว่าสามารถชะลอ การผลิต TMA ได้ ดังแสดงในภาพที่ 4.7 กล่าวคือ ปริมาณ TMA จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษาซึ่งเมื่อทดสอบความแตกต่างทางสถิติพบว่า ทั้งอุณหภูมิและสภาวะของการปรับบรรยากาศมีผลต่อการชะลอการผลิต TMA อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) โดยที่สภาวะ 75%CO_2 : 25% N_2 สามารถยืดระยะเวลาการเพิ่มขึ้นของ TMA จนถึงระดับสูงสุดที่ยอมรับได้ 37,19 และ 10 วัน ที่อุณหภูมิ 0,4,10°C ตามลำดับ และที่100% CO_2 คือ 25,13 และ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 0,4,10°C ตามลำดับ จากนั้นคือที่ระดับ 50% CO_2 : 50% N_2 สามารถเก็บรักษาได้นานคือ 21,10 และ 5 วันที่อุณหภูมิ 0,4,10°C และที่ 25% CO_2 : 75% N_2 สามารถเก็บรักษาได้นาน 14, 7 และ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 0,4,10°C ตามลำดับ

สาเหตุที่เราสามารถชะลอการผลิต TMA ได้เนื่องจากการใช้ CO_2 และอุณหภูมิต่ำมีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ต้องอากาศในการเจริญ (aerobic bacteria) และ ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (facultative anaerobic bacteria) คือ *Pseudomonas spp., Acinetobacter, Moraxella, Flavobacterium* ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถรีดิวซ์ TMAO ไปเป็น TMA ได้ (Ray, 1996, Conye, 1932, Dalgaard, et al., 1998, Debevere and Boskou, 1996) โดยอัตราการชะลอการผลิต นั้นจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีเราเพิ่มปริมาณ CO_2 และลดอุณหภูมิให้ต่ำลงและจากการทดลองจะเห็นได้ว่า เราไม่สามารถที่จะยับยั้งการผลิต TMA ได้ เนื่องจากยังมีแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่สามารถเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำและมีความสามารถในการผลิต TMA นั่นก็คือ *Shewanella putrefaciens* และ *Photobacterium* ซึ่งแบคทีเรีย 2 ชนิดนี้จะใช้ TMAO เป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้าย (terminal electron acceptor) ในการหายใจโดยไม่ใช้ออกซิเจน แล้วผลิต TMA ขึ้นมา (Boskou and Debevere, 1997) แต่แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ ก็สามารถถูกชะลอการเจริญและลดกิจกรรมได้ ภายใต้ CO_2 >50% และนอกจากนี้ CO_2 ยังส่งผลทางอ้อมต่อ เอนไซม์ TMA reductase คือ TMA reductase จะมีสภาวะที่เหมาะสม (optimum activity) ที่ pHประมาณ 6.8 แต่เมื่อเราใส่ CO_2 ลงไปจะทำให้ pH ของเนื้อปลาลดลงต่ำกว่า 6.8 (ประมาณ 6.1-6.4) จึงสามารถที่จะชะลอกิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ ทำให้อัตราการผลิต TMA ถูกชะลอลงด้วย (Debever and Boskou, 1996, Parry, 1993)



ภาพที่ 4.7 ปริมาณไตรเมทิลเอมีนในเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้สภาวะต่างๆ คือ (A) 25%N_2:75%CO_2 (B) 50%CO_2:50%N_2 (C) 75%CO_2:25%N_2 (D) 100%CO_2 โดยทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ (a) 0 °C, (b) 4 °C และ (c) 10 °C ตามลำดับ, ------- = ปริมาณสูงสุดที่ยอมรับได้ (rejection limit) = 3.5 mg TMA-N / ตัวอย่าง 100 กรัม

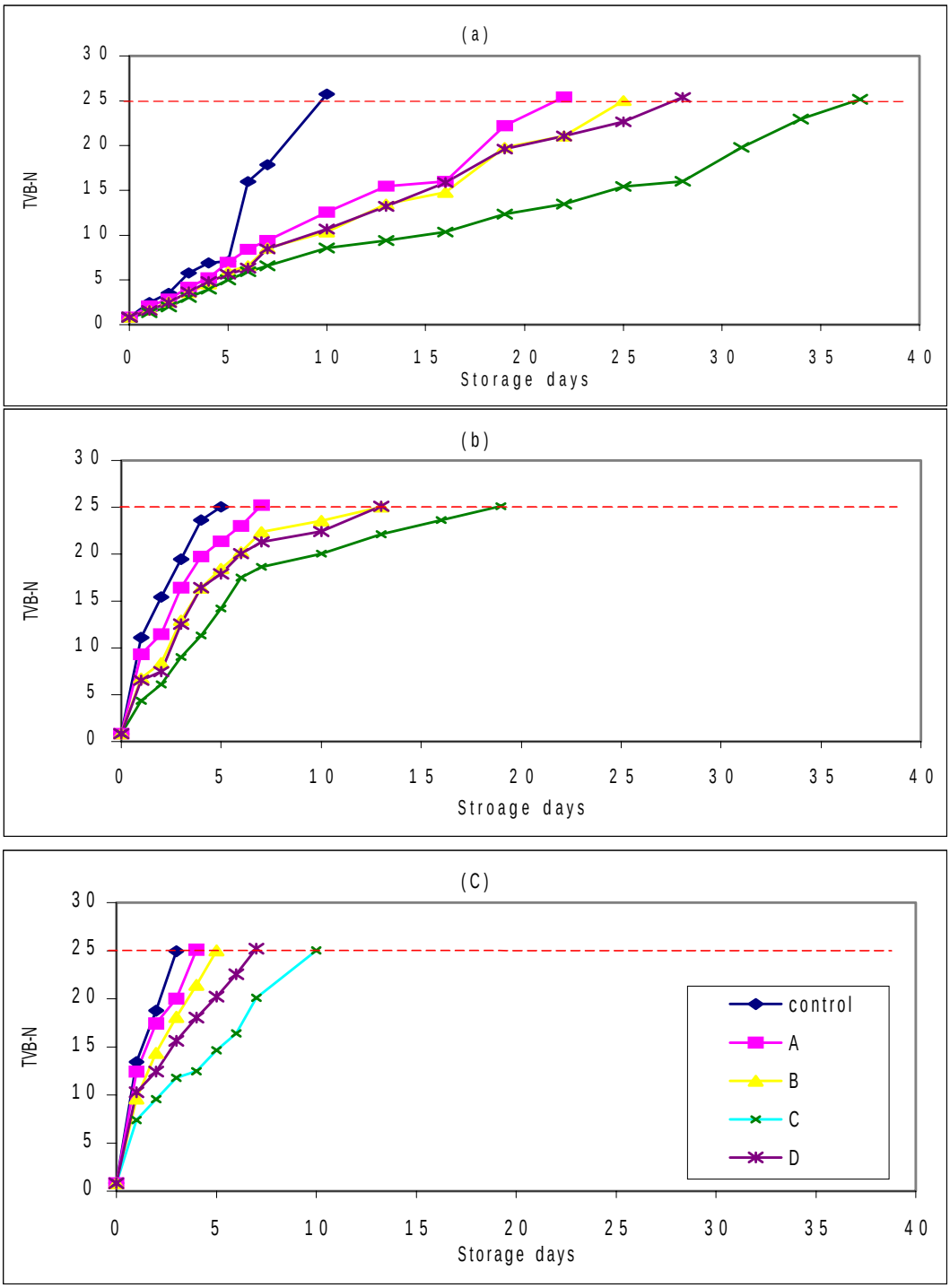
4.3.4 ปริมาณสารประกอบไนโตรทั้งหมดที่ระเหยได้ (Total Volatile Basic Nitrogen : TVB-N)

Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N) ได้แก่ แอมโมเนีย ไตรเมทิลเอมีน(TMA) ไดเมทิลเอมีน (DMA) เมทิลเอมีน (methylamine) และสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของโปรตีนและองค์ประกอบอื่นๆ ก่อให้เกิดกลิ่นและรสที่ผิดปกติแก่ปลา เนื่องจากแบคทีเรียและเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวปลา ซึ่งปริมาณของ TVNB-N จะมีความสัมพันธ์กับคุณภาพของปลา คือ ปลาสด จะมีปริมาณ TVB-N น้อยกว่า 12 mg TVB-N/100 g ตัวอย่าง, 12-20 mg TVB-N/100 g ตัวอย่าง เนื้อปลายังสามารถรับประทานได้ และเกิดการสลายตัว (decomposition) ขององค์ประกอบภายในตัวปลาเล็กน้อย, 20-25 mg TVB-N/100 g ตัวอย่างเนื้อปลายังรับประทานได้และมีกลิ่นเหม็นเล็กน้อย, >25 mg TVB-N/100 g ตัวอย่าง ไม่สามารถรับประทานได้ (Regenstein, 1991) ซึ่งจากการทดลองเนื้อปลานิลเน่าจะมีค่า TVB-N เท่ากับ 25.10 mg / 100 g ตัวอย่าง

หลักการในการวัดปริมาณ TVB-N ด้วยการกลั่น (distillation) ตามวิธีของ Malle (1989) คือ สกัดเนื้อปลาด้วย TCA แล้วนำมาเติมด่าง จากนั้นทำการกลั่นเพื่อให้สารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ ระเหยขึ้นมาทำปฏิกิริยากับกรดบอริค (boric acid) แล้วนำมาไทเทรตกับกรดที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน จากนั้นคำนวณปริมาณ TVB-N ที่มีในเนื้อปลา

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า ปริมาณ TVB-N จะมีความสัมพันธ์กับระยะเวลา, สภาวะในการเก็บรักษา และการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่าในเนื้อปลานิลสดจะมี TVB-N เริ่มต้นเท่ากับ 0.84 mg TVB-N/100 g ตัวอย่าง จากนั้นทำการเก็บรักษาไว้ที่สภาพบรรยากาศและอุณหภูมิแตกต่างกัน เมื่อทดสอบความแตกต่างทางสถิติพบว่า ทั้งอุณหภูมิและสภาวะของการปรับบรรยากาศมีผลต่อการชะลอการผลิต TVB-N อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) โดยที่สภาวะ 75% CO_2 : 25% N_2 สามารถเก็บรักษาได้นานที่สุดคือ 37,19 และ 10 วัน ที่อุณหภูมิ 0,4,10°C ตามลำดับและ ที่ 100 % CO_2 คือ 28,13 และ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 0,4,10°C ตามลำดับ, และที่ 50% CO_2 : 50% N_2 สามารถเก็บรักษาได้นานคือ 25,13 และ 5 วัน ที่อุณหภูมิ 0,4,10°C และสุดท้าย ที่ 25% CO_2 : 75% N_2 สามารถเก็บรักษาได้นานคือ 22, 7 และ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 0,4,10° ในขณะที่ถ้าเราเก็บรักษาไว้ภายในบรรยากาศปกติจะเก็บปลานิลไว้ได้นานเพียง 13, 7 และ 3 วัน ที่อุณหภูมิ 0,4,10°C ซึ่งผลที่ได้เหมือนกับการเปลี่ยนแปลง TMA ดังแสดงในภาพที่ 4.8

เหตุผลที่สามารถชะลอการเพิ่มขึ้นของปริมาณ TVB-N ในตัวอย่างเนื้อปลาที่บรรจุภายใต้สภาวะที่มี CO_2 คือ 1. CO_2 มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย 2. ในการผลิตแอมโมเนีย (NH_3) เกิดจากกระบวนการออกซิเดชั่น ของโปรตีนและสาร



ภาพที่ 4.8 ปริมาณไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมดในเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้สภาวะต่างๆ คือ (A) 25%N_2:75%CO_2 (B) 50%CO_2:50%N_2 (C) 75%CO_2:25%N_2 (D) 100%CO_2 โดยทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ (a) 0 °C, (b) 4 °C และ (c) 10 °C ตามลำดับ, ------- = ปริมาณสูงสุดที่ยอมรับได้ (rejection limit) = 25.10 mg TVB-N/ ตัวอย่าง 100 กรัม

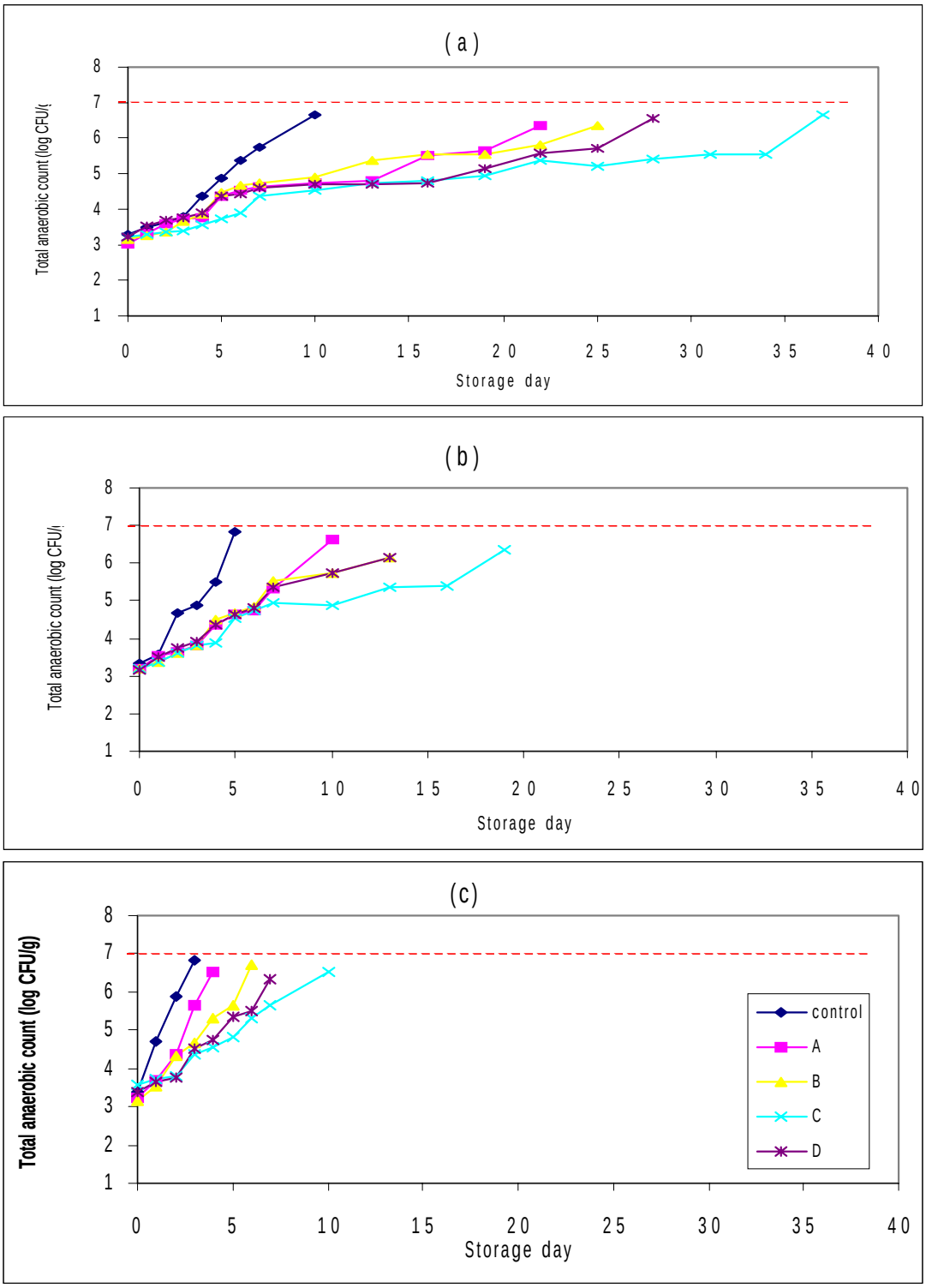
ประกอบไนโตรเจนที่มีอยู่ในเนื้อปลาจะต้องมีการใช้ O_2 แต่ในสภาวะการทดลองไม่มี O_2 จึงทำให้ NH_3 มีปริมาณน้อย ทำให้ TVB-N ที่วัดได้น้อยลงด้วย 3. สามารถชะลอการเพิ่มขึ้นของ TMA และการผลิตแอมโนเนียจากกระบวนการกำจัดแอมโมเนียในระหว่างการเปลี่ยนแปลง IMP เป็น Ino (Ray, 1996, Dixon and Kell, 1989, Douglas and Nagel, 1967 Krzymien and Elias, 1990.)

4.4 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลินทรีย์

จากการทดลองวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นของเนื้อปลานิลสดพบว่ามีจำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศทั้งหมด (total aerobic count), จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic count) และ lactic acid bacteria เท่ากับ 2.52 x 10^3, 1.79 x 10^2 และ 1.79 X 10^3 CFU/g ตามลำดับ และเมื่อทำการเก็บรักษาไว้ที่สภาวะการปรับเปลี่ยนบรรยากาศและที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่ามีจำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ดังแสดงในภาพที่ 4.9 โดยที่เนื้อปลานิลที่เก็บภายใต้บรรยากาศปกติจะมีอัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนจุลินทรีย์มากที่สุด รองลงมาได้แก่ 25% CO_2 : 75% N_2, 50% CO_2 : 50% N_2 , 100%CO_2และ 75% CO_2 : 25% N_2 ตามลำดับ และอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา ก็มีผลต่ออัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนจุลินทรีย์ อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) โดยที่ 0°C สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้มากที่สุด รองลงมาคือ 4 และ 10 °C ตามลำดับ

ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมของเนื้อปลาสดแช่แข็ง กำหนดไว้ว่า เนื้อปลาสดที่ยังยอมรับได้ควรมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน 10^7 CFU/g จากผลการทดลองจะเห็นว่าเมื่อใช้เกณฑ์มาตรฐานข้างต้นเป็นตัวกำหนดอายุการเก็บรักษาพบว่า ภายใต้บรรยากาศปกติหรือตัวอย่างควบคุม มีอายุการเก็บเพียง 10,5 และ 3 วัน ที่อุณหภูมิ 0,4,10°C ตามลำดับ ในขณะที่เก็บรักษาภายใต้สภาวะ MAP สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้เพิ่มขึ้น 2-3 เท่า เมื่อทำการเปรียบเทียบอายุการเก็บรักษาโดยใช้จำนวนจุลินทรีย์เป็นเกณฑ์ ด้วย Duncan Multiple Range Test พบว่า ที่สภาวะ 75% CO_2: 25% N_2 สามารถเก็บรักษาได้นานที่สุดคือ 37,19 และ10 วัน ที่อุณหภูมิ 0,4,10°C ตามลำดับ และที่ 100% CO_2 สามารถเก็บรักษาได้นานคือ 28,13 และ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 0,4,10°C และที่ 50% CO_2 : 50% N_2 สามารถเก็บรักษาได้นานคือ 25,13 และ 6 วัน ที่อุณหภูมิ 0,4,10°C และที่ 25% CO_2 : 75% N_2 เก็บรักษาได้นานคือ 18,10 และ4 วัน ที่อุณหภูมิ 0,4,10°C ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นที่สภาวะการเก็บรักษาภายใต้สภาวะปกติและการปรับบรรยากาศ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) แต่ ตัวอย่างที่เก็บรักษาภายใต้ 50% CO_2 : 50% N_2 และ 100% CO_2 100% CO_2 มีจำนวนจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ashie et al. (1996) ได้ทำการทดลองศึกษาผลของก๊าซ



ภาพที่ 4.9 จำนวนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศทั้งหมด (Total anaerobic count) ในเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้สภาวะต่างๆ คือ (A) 25%N_2:75%CO_2 (B) 50%CO_2:50%N_2 (C) 75%CO_2:25%N_2 (D) 100%CO_2 โดยทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ (a) 0 °C, (b) 4 °C และ (c) 10 °C ตามลำดับ, ------ = จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงสุดที่ยอมให้มีได้ เท่ากับ 10^7CFU/g

CO_2 เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาปลาทะเล พบว่า CO_2 ตั้งแต่ 25% สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้ 2-3 เท่า แต่เมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของ CO_2 เกินกว่า 75% ความสามารถในการยืดอายุการเก็บรักษาก็ไม่ได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Church, 1994)

เหตุผลที่การเก็บรักษาภายใต้สภาวะปรับบรรยากาศด้วย CO_2 ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำสามารถที่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการเน่าเสีย ส่งผลให้ยืดอายุการเก็บรักษาได้นั้น ถูกอธิบายโดย Farber et al. (1991), Gould et al. (1996), Sear and Eisenberg (1981) โดยสามารถสรุปได้ดังนี้

1. CO_2 จะมีผลในการยืดระยะเวลาในช่วงระยะปรับตัว (lag phase) และลดอัตราการเจริญ (growth rate) ของแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นสาเหตุหลักในการทำให้อาหารพวกปลาเน่าเสีย คือ *Acromobacter*, *Flavobactrium, Micrococcus, Bacillus* และ *Pseudomonas* (Daniels et al, 1985)

2. ลด pH ทั้งภายในและภายนอกเซลล์จุลินทรีย์ ส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่าการเปลี่ยนแปลง pHภายในเซลล์ของแบคทีเรียนั้นมีอิทธิพลต่อการเจริญมากกว่า pH ภายนอกเซลล์ เนื่องจาก pH ภายในเซลล์มีผลต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์หลายชนิดที่มีสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จากการศึกษาการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่า CO_2 ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยทำให้ pH ภายในเซลล์แบคทีเรียลดลง (King, 1967)

3. จากการศึกษาของ Sear and Eisenberg (1961) พบว่า HCO_3^- มีผลต่อเมมเบรน โดย HCO_3^- จะลดแรงตึงผิวของเมมเบรนและทำให้เกิดการสูญเสียน้ำ HCO_3^- ทำให้ช่องว่างระหว่างโมเลกุลเพิ่มขึ้น เป็นเหตุให้สูญเสียสารอิออนซึ่งสำคัญต่อกระบวนการเมทาบอลิซึม (metabolism) ของจุลินทรีย์ และมีผลยับยั้งการสร้างเมมเบรนของจุลินทรีย์ด้วย พบว่า CO_2 เพียงร้อยละ 0.26 ในสารละลายแล้วเกิดการแตกตัวเป็น H_2CO_3 และ HCO_3^- ก็มีผลต่อการเปลี่ยนปลงระบบชีวเคมีของเซลล์ (Gould, 1996)

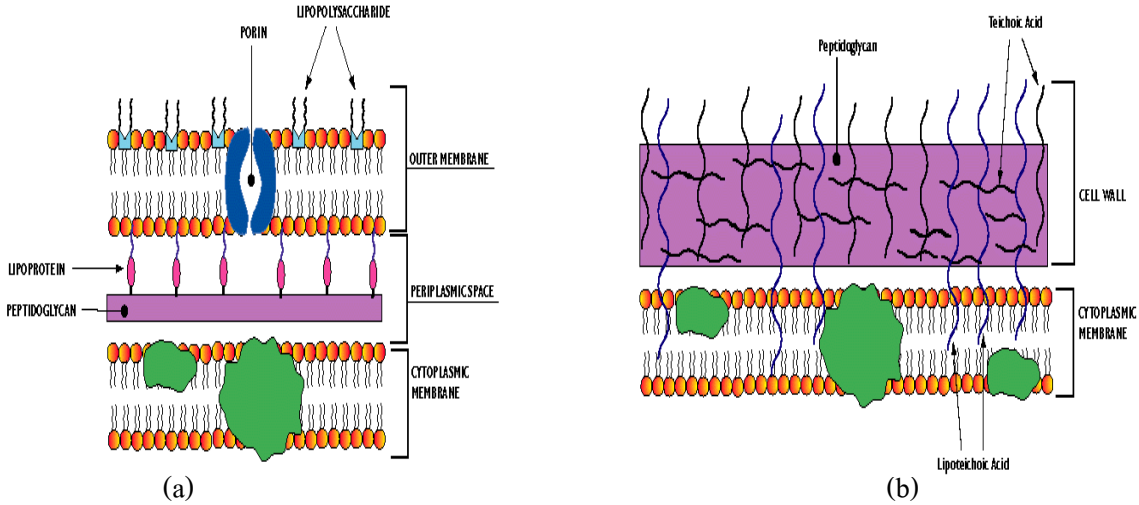
4. CO_2 มีผลในการยับยั้งกระบวนการเมทาบอลิซึม พบว่าเมื่อมีการใช้ CO_2 ที่ความเข้มข้นสูง จะส่งผลกระทบต่อการแบ่งเซลล์ของยีสต์ การจำลองตัวของ DNA (DNA replication) กระบวนการไกลโคไลซีส (glycolysis) และ ยับยั้ง pathway ต่างๆ โดย CO_2 จะไปยับยั้งกระบวนการหายใจ โดยจะขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ dehydrogenaes โดยเฉพาะอย่างยิ่ง succinate dehydrogenaes มีรายงานว่า CO_2 สามารถลดจำนวนของเชื้อราได้เนื่องจาก ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ใน TCA cycle

5. CO_2 มีผลต่อความต่างศักย์ของเมมเบรน (membrane potential) ของจุลินทรีย์ ในสภาวะที่มี CO_2 จะทำให้เนื้อเยื่อมี pH ภายในลดลง ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อ,สมบัติการซึมผ่านของเมม

เบรน, ระดับความเข้มข้นของ CO_2 และปริมาณ HCO_3^- ในสภาวะนั้น ต่อจากนั้นจะพบว่า pH ภายในจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเพื่อกลับคืนสู่ pH เริ่มต้น ซึ่งค่อนข้างเป็นด่างมากกว่าเริ่มต้น จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลง pH ภายในเนื้อเยื่อของเนื้อปลาในสภาพที่มี CO_2 พบว่า เมื่อนำเนื้อเยื่อใส่สารละลายที่ใส่ CO_2 100% นอกจากจะทำให้ pH ภายในลดลงแล้ว ค่าความต่างศักย์ของเมมเบรนลดลงอีกด้วย และเมื่อนำออกจากสภาพนั้นสู่สภาวะเดิมที่ไม่มี CO_2 พบว่า ค่าความต่างศักย์ของเมมเบรนกลับสู่สภาพเดิม ในขณะที่ pH ภายนอกเนื้อเยื่อยังมีค่าคงที่ จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า ค่าความต่างศักย์ของเซลล์เมมเบรนขึ้นอยู่กับ pH ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ และความเข้มข้นของ CO_2 เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง pH ภายในเซลล์จะกระตุ้นระบบการขนส่ง H^+/K^+ โดย glycolyzing cell จะช่วยให้ระดับ pH ภายในเซลล์ลดลงกลับสู่สภาพเดิม โดยอาศัยพลังงานจากการขนส่งโปรตอนเหล่านี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ของเมมเบรน ซึ่งส่งผลต่อกระบวนการ เมทาบอลิซึม

พบว่าการใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณสูงจะมีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแกรมบวก เนื่องจากคุณสมบัติและโครงสร้างพื้นฐานของแบคทีเรียทั้งสอง โดยผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะมีความหนามากกว่าแกรมลบ คือหนาประมาณ 25-30 มิลลิไมโครเมตร แต่แกรมลบหนาเพียง 15-20 มิลลิไมโครเมตร และยังมีชั้นของ peptidoglycan ที่หนามากกว่า ดังแสดงในภาพที่ 4.10

ส่วนโครงสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบนั้นจะมีเมมเบรนชั้นนอกที่เรียกว่า outer membrane ล้อมรอบ peptidoglycan ไว้ ซึ่งเมมเบรนชั้นนอกนี้จะมีไขมันมากถึง 11-22% ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ ซึ่งปริมาณไขมันในส่วนนี้เองจะเป็นส่วนที่คาร์บอนไดออกไซด์สามารถละลายเข้าไปได้ จึงเกิดผลกระทบต่อแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแกรมบวก ตามกลไกที่



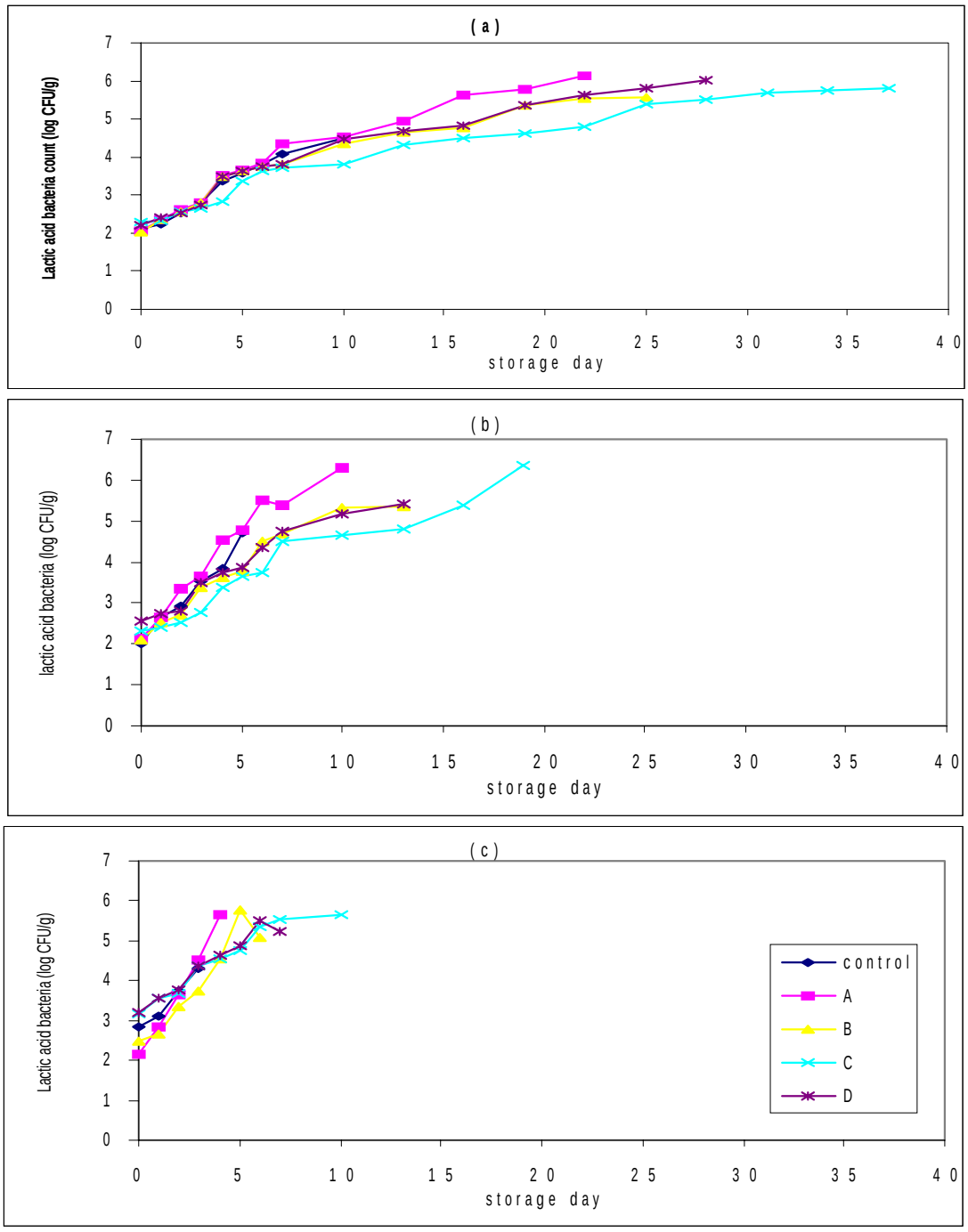
ภาพที่ 4.10 ความแตกต่างของโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (a) และ แกรมบวก (b) จาก Ray, 1996

ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

Pedosa and Regenstein (1990) พบว่า สภาพปรับบรรยากาศ สามารถยืดอายุการเก็บรักษาสัตว์น้ำได้หลายชนิด นอกจากนี้การเก็บรักษาอาหารที่อุณภูมิตู้เย็นจะช่วยจำกัดการเน่าเสียอันเนื่องมาจากการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบที่ต้องการอากาศในการเจริญ (Grill, 1988) แต่อย่างไรก็ตามการยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร โดยวิธการปรับสภาพบรรยากาศ ยังขึ้นอยู่กับ จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น, ความเข้มข้นของก๊าซ CO_2, และคุณสมบัติของฟิล์มพลาสติกในการป้องกันการซึมออกของก๊าซ CO_2 ในระว่างการเก็บรักษา (Hendricks and Hotchkiss, 1989)

จากการทดลองเมื่อทำการเก็บตัวอย่างไว้ที่สภาวะการปรับบรรยากาศเป็นสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ (anaerobic condition) จุลินทรีย์ที่ตรวจพบเปลี่ยนแปลงจากกลุ่มที่ต้องการอากาศ (aerobic count) เป็นกลุ่มที่ไม่ต้องการอากาศหรือต้องการเพียงเล็กน้อย เห็นได้จากจำนวน lactic acid bacteria ที่เพิ่มขึ้น ตลอดช่วงเวลาการเก็บรักษา ดังแสดงในภาพที่ 4.11 ซึ่ง lactic acid bacteria จะเป็นสาเหตุหลักของการเน่าเสีย มีการสร้างกรดแลกติกและ bacteriocin ที่สามารถจำกัดการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ (Bank et al., 1980) สอดคล้องกับการทดลองของ Molin et al. (1984) คือ ในการเก็บรักษาปลาภายใต้ สภาพบรรยากาศปกติ จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียจะอยู่ในกลุ่ม *Alteromonas* และ *Pseudomonas* ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญภายใต้การปรับเปลี่ยนบรรยากาศ นั้นเป็นจุลินทรีย์พวกที่ไม่ต้องการอากาศ เช่น Lactic Acid Bacteria สายพันธ์ *Lactobacillus spp*.

จะเห็นได้ว่าการใช้ MAP ในการบรรจุปลา สามารถที่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียได้ดี แต่เรายังคงต้องระมัดระวังการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและสร้างสารพิษอย่างเคร่งครัด เนื่องจากจุลินทรีย์ก่อโรคนี้มักจะเจริญได้ในสภาพที่มี CO_2 สูงๆ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเลือกใช้อัตราส่วนของก๊าซที่สามารถควบคุมจุลินทรีย์ทั้งชนิดที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียและที่ก่อให้เกิดโรคเจริญเติบโตได้ช้าที่สุด และควรที่จะเก็บรักษาอาหารไว้ที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ CO_2 และอาหารที่บรรจุภายใต้ MAP ควรจะต้องแสดงอาการเน่าเสียให้สังเกตได้ก่อนตรวจพบสารพิษในระดับที่เป็นอันตราย (งามทิพย์ ภู่วโรดม, 2538, Hintlian et al.,1986; Farber, 1991) ซึ่งจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบอาจจะมีอยู่ภายในตัวปลาอยู่แล้วหรือปนเปื้อน (contamination) ในระหว่างการขนส่ง แบคทีเรียก่อโรคที่มักตรวจพบในปลา ได้แก่ *Escherichia coli, Staphylcoccus aureus, Salmonella, Vibrio, C. perfringens* และ *C. botulinum type E* ซึ่งจุลินทรีย์ที่เราทำการตรวจวัดคือ E.coli, *Vibrio spp., Staphylococcus aureus, Salmonella, C. botulinum* และ *C. perfringens* ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้ เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคที่จำเป็นต้องตรวจสอบ โดยมาตรฐานการส่งออกกำหนดไว้ว่า จะต้องไม่ตรวจพบจุลินทรีย์เหล่านี้เลย ผลที่ได้ดังแสดงในตาราง จะเห็นได้ว่าทุกๆ สภาวะของ MAP จะแสดงการเน่าเสียซึ่งพิจารณาจากดัชนีคุณภาพทางเคมี



ภาพที่ 4.11 จำนวนแลคติกแอซิด แบคทีเรีย (Lactic acid bacteria) ในเนื้อปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้สภาวะต่างๆ คือ (A) 25%N_2:75%CO_2 (B) 50%CO_2:50%N_2 (C) 75%CO_2:25%N_2 (D) 100%CO_2 โดยทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ (a) 0 $^{\circ}$C, (b) 4 $^{\circ}$C และ (c) 10 $^{\circ}$C ตามลำดับ

<u>หมายเหตุ</u> ในตัวอย่างควบคุมตรวจพบ Staphylococcus aureus เท่ากับ 7 X 10^2 และ 2.3 X 10^2 CFU/g ซึ่งเก็บภายใต้อุณหภูมิ 10 และ 4 $^{\circ}$C ส่วนสภาวะ (A), (B), (C) และ(D) ทุกอุณหภูมิ ตรวจไม่พบจุลินทรีย์ก่อโรคทุกชนิด

(chemical indicator) และลักษณะทางกายภาพ ก่อนที่จะตรวจพบจุลินทรีย์ก่อโรค ดังนั้นจึงมีความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค

จากผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Daniel et al. (1986) คือ การใช้ CO_2 ที่ความเข้มข้นมากกว่า 50%ร่วมกับการเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 °C สามารถที่จะสามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio spp., S. aureus* และ *Salmonella* ได้อย่างสมบูรณ์ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นสาเหตุหลักในการทำให้อาหารพวกปลาเน่าเสีย คือ *Acromobacter*, *Flavobactrium, Micrococcus, Bacillus* และ *Pseudomonas*

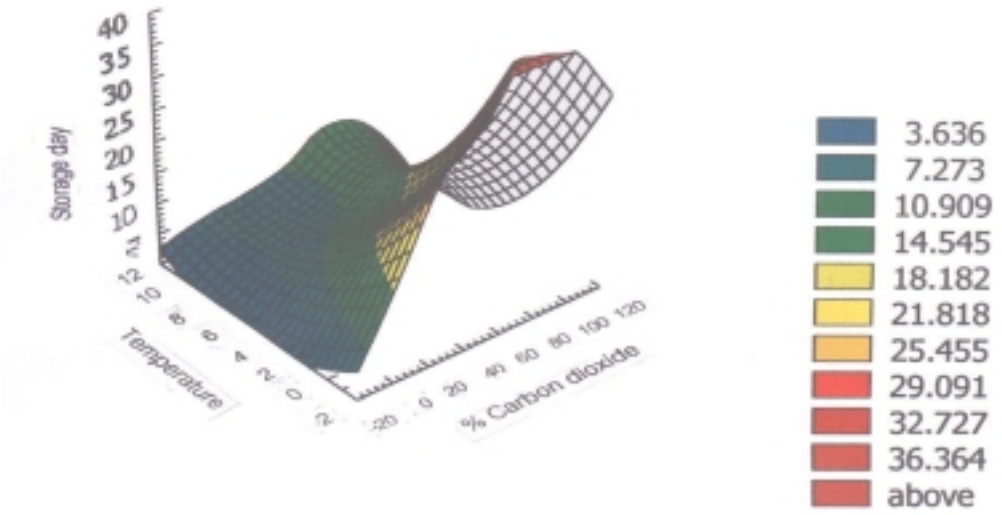
โดยทั่วไปการเก็บรักษาอาหารภายใต้สภาพปรับบรรยากาศ ควรเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิต่ำกว่า 5°C เนื่องจากจุลินทรีย์สร้างสารพิษ หรือทำให้เกิดโรคส่วนใหญ่ เช่น *Aeromonas hydrophylla, Salmonella* spp., *Bacillus cerus* และ *Staphylococcus* spp. จะมีอัตราการเจริญช้าลงเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5°C (Cann, 1988,Cai et al., 1997, Conye, 1932, Farber, 1991, Silliker, 1980)

C. botulinum และ *C. perfringens* เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคที่เราจะต้องคำนึงอย่างมาก เพราะสามารถสร้างสารพิษที่มีอันตรายต่อระบบประสาท เนื่องจากสภาวะที่มีการเติม CO_2 ในปริมาณสูง ๆ จะสนับสนุนการเจริญ แต่ถ้าเราทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำก็สามารถที่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ กล่าวคือ *C. perfringens* และ *C. botulinum* ยกเว้น สายพันธุ์ E ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 °C และ *C. botulinum* สายพันธุ์ E ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 3.3 °C ดังนั้นเราจึงต้องทำการตรวจสอบการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดนี้ตลอดช่วงการเก็บรักษา จากการทดลองจะพบว่า ปลานิลที่เก็บรักษาไว้ทุกสภาวะจะเน่าเสียและไม่ยอมรับก่อนที่จะมีการเจริญของ *C. botulinum* และ *C. perfringens* ดังนั้นเราจึงแน่ใจได้ว่าปลาที่บรรจุภายใต้สภาวะนี้มีความปลอดภัยจากการเจริญและการสร้างสารพิษจาก *Clostridium* Post et al. (1985) แนะนำว่า ตัวอย่างปลาที่บรรจุด้วย MAP ควรที่จะแสดงการเน่าเสียจนไม่เป็นที่ยอมรับก่อนที่จะมีการเจริญและการสร้างสารพิษของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น มีสีและกลิ่นเปลี่ยนแปลงไปจนไม่เป็นที่ยอมรับ และ Reddy, 1996 กล่าวว่า การเก็บรักษาปลาทะเลไว้ภายใต้ CO_2 >50% จะมีการผลิตสารพิษจาก *C. botulinum* สายพันธุ์ E ที่ >20 วัน และ 45 วัน ที่ 4 และ 10 °C ตามลำดับ ซึ่งระยะเวลานี้เราจะไม่ยอมรับตัวอย่างนั้นแล้ว

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การบรรจุแบบปรับเปลี่ยนบรรยากาศ ที่สภาวะ 75% CO_2 : 25% N_2 ภายใต้อุณหภูมิ 0 °C เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะ 100% CO_2 , 50% CO_2 : 50% N_2 ,25% CO_2 : 75% N_2 และบรรยากาศปกติ ซึ่งสามารถยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อปลานิลสดได้นานถึง 37 วัน ในขณะที่ตัวอย่างควบคุม (ที่บรรยากาศปกติ) เก็บได้เพียง 10 วัน โดยที่เนื้อปลานั้นยังคงมีคุณภาพตามที่มาตรฐานกำหนดตลอดช่วงอายุการเก็บรักษา จะเห็นได้ว่าจากการทดลองนี้ไม่ได้ทำการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส (sensory test) และลักษณะปรากฏจากผู้ชิม (panelist) ดังนั้นอายุการเก็บรักษาที่ถูกกำหนดขึ้นจากการใช้เกณฑ์คุณภาพด้านต่างๆ จึงมีค่าที่สูง ซึ่งอายุการเก็บรักษานี้อาจจะลดลงได้ เมื่อมีการทำการประเมินคุณภาพทางผู้บริโภคควบคู่ไปด้วย ดังนั้นจึงควรทำการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสควบคู่ไปด้วย

เมื่อทำการพลอตกราฟ 3 มิติ เพื่อศึกษาแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นของอายุการเก็บรักษาที่เกิดจากผลของก๊าซ CO_2 และอุณหภูมิการเก็บรักษา ดังแสดงในภาพที่ 5.1



ภาพที่ 5.1 กราฟ 3 มิติ แสดงแนวโน้มของอายุการเก็บรักษาที่เกิดจากการเก็บรักษาภายใต้สัดส่วนของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และอุณหภูมิต่างๆ

จากภาพที่ 5.1 พบว่า อายุการเก็บรักษาจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซ CO_2 และลดอุณหภูมิ แต่ CO_2 ในระดับที่สูงเกินว่า 75% ไม่ได้ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของอายุการเก็บรักษา อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากปริมาณน้ำที่มีอยู่ในเนื้อปลา ซึ่งเป็นส่วนที่ CO_2 สามารถละลายและก่อให้เกิดผลกระทบต่างๆ ต่อแบคทีเรีย มีปริมาณที่จำกัดโดย CO_2 ที่ใช้ในการบรรจุมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย ซึ่งมีความสัมพันธ์ในการผลิตเมทาบอไลต์ต่างๆ ที่เป็นสาเหตุของเกิดกลิ่น-รส และลักษณะที่แสดงถึงการเน่าเสียขึ้น สังเกตได้จากการชะลอการผลิต TMA TVB-N %K-value และ pH เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CO_2 และลดอุณหภูมิ ประสิทธิภาพในการยืดอายุการเก็บรักษาจะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ตัวอย่างปลายังมีความปลอดภัยจากการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคทั้ง *E.coli*, *Vibrio spp.*, *Staphylococcus aureus, Salmonella, C. botulinum* และ *C. perfringens* เนื่องจากมีการเจริญของ lactic acid bacteria เป็นแบคทีเรียแข่งขัน (competitive bacteria) และเป็นสาเหตุหลักของการเน่าเสีย

การบรรจุแบบปรับเปลี่ยนบรรยากาศในเนื้อปลานั้น ควรคำนึงถึงสัดส่วนของก๊าซ อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา ชนิดของฟิล์มที่ใช้ทำภาชนะบรรจุ ชนิดของปลา และสุขลักษณะในการจับและแล่

จากผลการทดลองที่ได้สามารถประยุกต์ใช้สภาวะที่เหมาะสม ในปลาน้ำจืดที่มีไขมันต่ำและมีองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกับปลานิล เช่น ปลาทับทิม และผลิตภัณฑ์จากปลาอื่นๆ เช่น ปลาส้ม เพื่อเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการยืดอายุการเก็บรักษา และควรทำการศึกษาลักษณะการจัดส่งสินค้า และพัฒนารูปแบบของภาชนะบรรจุให้มีความหลายหลาย เพื่อเป็นแนวทางในการส่งเป็นสินค้าออกในต่างประเทศต่อไป

รายการอ้างอิง

กนกอร อินทราพิเชฐ. (2538). **เอกสารประกอบคำสอน วิชา 305 271 การเปลี่ยนแปลงของวัสดุชีวภาพหลังการเก็บเกี่ยว**. สาขาเทคโนโลยีอาหาร: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

กรมประมง. (2542). **สถิติการประมงแห่งประเทศไทย ปี พ.ศ. 2539.** ฝ่ายสถิติและสารสนเทศประมง: กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

งามทิพย์ ภู่วโรดม. (2538). **ก๊าซกับการบรรจุผลิตภัณฑ์อาหาร**. กรุงเทพ: ลินคอร์นโปรโมชั่น.

พูลทรัพย์ วิรุฬหกุล. (2543). รายงานการประชุมสัมมนาวิชาการ โครงการสมองไหลกลับ สาขาอุตสาหกรรมเกษตร ครั้งที่ 2. ใน มยุรี จัยวัฒน์ (บรรณาธิการ). **แนวคิดในการพัฒนางานวิจัยกลุ่มผลิตภัณฑ์ประมง.** (หน้า 3-11). ขอนแก่น: คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ปิยะวรรณ กาสลัก. (2540). **เอกสารประกอบการสอน วิชา 305 312 Food Microbiology Laboratory.** สาขาเทคโนโลยีอาหาร: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

มัทนา แสงจินดาวงษ์. (2538). **จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ประมง**. ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มนต์ชัย ตวงจินดา. (2537). **การใช้โปรแกรม SAS เพื่อวิเคราะห์งานวิจัยทางสัตว์.** ขอนแก่น: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มยุรี จัยวัฒน์. (2542). โครงการเพื่อบรรเทาผลกระทบทางสังคมเนื่องจากวิกฤตการณ์เศรษฐกิจ.ใน สมพงษ์ โยธิน (บรรณาธิการ). **เทคโนโลยีการดูแลรักษาสัตว์น้ำหลังการจับ**. (หน้า 13-15). นครปฐม: คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

สุมาลี เหลืองสกุล. (2527). **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** กรุงเทพ: พิมพ์ ชัยเจริญ.

วิทย์ ธารชลานุกิจ. (2538). **การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย.** กรุงเทพ: คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิไลภรณ์ สุทธานุลักษณ์. (2537). **การส่งเสริมการประมง.** นครราชสีมา: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี วิทยาลัยครูนครราชสีมา.

AOAC. (1995). Official Methods of Analysis. **Association of official analytical Chemists.** 35: 7.

Ashie, A., Smith, P., and Simpson, K. (1996). Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and

shellfish. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 36 (2): 87-121.

Baker, D.A., and Genigeorgis, C. (1990). Predicting the safe of fresh fish under modified atmospheres with respect to *Clostridium botulinum* toxigenesis by modeling length of the lag phase of growth. **J Food Prot.** 53 (17): 131-140.

Bank, H., Nickelson, R., and Finne, G. (1980). Shelf-life on carbon dioxide packaged finfish from the gulf of Mexico. **J. Food Sci.** 45 (6): 157-162.

Barnett, H.J., Conrad, J.W. and Nelson, R.W., (1981) Use of laminated high and low density polyethylene flexible package to store Trout (Salmo Gairdneri) in a modified atmosphere **J. Food Sci.** 50 (12): 645-651.

Boskou, G. and Debevere, J. (1997). Reduction of trimethylamine oxide by *Shewanella spp.* under modified atmospheres *in vitro*. **Food Microbiol**. 14 (6): 543-553.

Burns, B.G. and Ke, P.J. (1985). Decomposition in foods. **J. Assoc. Off. Ana. Chem.** 68 (3): 444-447.

Burt, J.R. (1977). Hypoxanthine : a biochemical index of fish quality. **Process Biochemistry.** 13 (4): 32-35.

Cai, P., Herrison, M.A., and Silva, J.L. (1997). Toxin production by *Clostridium botulinum* type E in packaged channel catfish. **J. Food. Prot.** 60 (19): 1358-1363.

Church, N. (1994). Developments in modified-atmosphere packaging and related technologies. **Trend. Food. Sci. Technol.** 5 (2): 345-352.

Church, I. and Parsons, A. (1995). Modified atmosphere packaging technology: a review. **J. Sci. Food. Agric.** 67 (11): 143-152.

Conye, F.P., (1932). The effect of carbon dioxide on bacteria growth with special reference to the preservation of fish. Part I. **J. Soc. Chem. Ind.** 51 (6): 119-121.

Daifas, P.H., Smith, J.P., and Austin, J.W. (1999). Effect of pH and CO_2 on growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in English-style crumpets packaged under modified atmosphere. **J. Food.Prot.** 62 (11): 1157-1161.

Dalgaard, P., Gram, L., and Huss, H.H. (1993). Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmosphere. **Int. J. Food Microbiol.** 28 (4): 21-29.

Dalgaard, P., Munoz, L.G. and Mejlhom, O. (1998). Specific inhibition of *Photobacterium phosphoreum* extends the shelf life. **J. Food. Sci.** 48 (10): 456-462.

Daniels., J.A., Krishnamurthl R. and Rizvi, H. (1986). Effect of carbonic acid dips and packaging films on the shelf life of fresh fish fillets. **J. Food. Sci.** 51 (5): 929-931.

Debevere, J. and Boskou, G. (1996). Effect of modified atmosphere packaging on the TVB/TMA-producing microflora of cod fillets. **Int. J. Food Microbiol.** 31(9): 221-229.

Dixon, N.M., and Kell, D.B. (1989). The inhibition by CO_2 of the growth and metabolism of microorganism. **J. Appl. Bacteriol.** 67 (12): 109-136.

Douglas, J.R., and Nagel C.W. (1967). Growth inhibition of a Pseudomonas by carbon dioxide. **J. Food Sci.** 32 (8): 575-579.

Eliot, S.C., and Emond, J.P. (1998). Stability of shredded mozzarella cheese under modified atmosphere. **J. Food. Sci.** 63 (14): 1075-1080.

EPA Method 3C. (1991). Determination of carbon dioxide, methane, nitrogen, and oxygen from stationary source. **CFR.** 56 (24): 522-524.

Farber, J.M., Warburton, D.W., Gour, L. and Milling, M. (1990). Microbiology quality of foods packaged under modified atmospheres. **Food. Microbiol.** 7 (4): 327-334.

Farber, J.M. (1991). Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology-review. **J. Food. Prot.** 54 (3), 58-70.

Fraser, O.P., and Sumar S. (1998). Compositon changes and spoilage fish (part II) microbiological induced deterioration. **Nutr. Food Sci.** 6 (3): 325-329.

Fuji, T.M. Hirayama, M., Okuzumi, M., Yasuda, M., and Yokoyama, M. (1989). Shelf life studies sardine packed under a CO_2/N_2 gas mixture. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 55 (7): 1971-1975.

Galli, A., Franzetti, L., Carelli, S., Pieriovanni, L., and Fava, P. (1993). Microbiological quality and shelf life of chilled cod fillets in vacuum-skin and modified atmosphere packaging. **Pack. Technol. Sci.** 6 (3): 147-157.

Galvez, D.L., Hoz, L., and Ordonez, J.A. (1995). Effect of carbon dioxide and oxygen enrich atmosphere on micorbiology and chemical change in refrigerated tuna. **J. Agric. Food. Chem.** 43 (7): 483-490.

Garcia, G.W., Genigeorgis, C., and Lindroth, S.P. (1987). Risk of growth and toxin production by *Clostridium botulinum* nonproteolytic type B, E and F in salmon fillets stored under modified atmosphere at low and abuse temperatures. **J. Food. Prot.** 50 (8): 330-336.

Gould, G.W. (1989). **Mechanism of action of food preservation procedures.** Elsevier applied

science: London.

Gould, W.G. 1995. **New Methods of Food Preservation.** Glasgow: Blackie.

Gould, W.G. 1996. Methods for preservation and extension of shelf life. **Int. J. Food Microbiol.** 33 (2): 51-64.

Gram, L., and Huss, H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. **Int. J. Food Microbiol.** 33 (3): 121-137.

Gray, R.J.H., Hoover, D.G. and Mur, A.M. (1983). Attenuation of microbial growth on modified atmosphere-packaged fish. **J. Food. Prot.** 46 (9): 600-613.

Hall, G.M. 1997. **Fish Processing technology.** London: Blackie academic & processional.

Handumrongkul, C. and Silva. (1994). Aerobic counts, color and adenine nucleotide change in CO_2 packed refrigerated striped bass strips. **J. Food. Sci.** 59 (1): 67-69.

Hendricks, M.T. and Hotchkiss, J.H. (1997). Effect of carbon dioxide on the growth of *Pseudomonas fluoresces* and *Listeria monocytogenes* in aerobic atmosphere. **J. Food. Prot.** 60 (14): 1548-1552.

Hintlian, C.B., and Hotchkiss, J.H. (1986). The safety of modified atmosphere packaging: A review. **Food Technol.** 5 (1): 70-76.

Holley, R.A., Gariepy, C. and Gagnon, J. (1994). Static controlled (CO_2) atmosphere packaging of retail ready pork. **J. Food Sci.** 59 (12): 1296-1300.

Huang, Y.M., Lovell, R.T. and Dunham, R.A. (1994). Carcass characteristics of channel and hybrid catfish and quality changes during refrigerated storage. **J. Food. Sci.** 59 (1): 64-66.

Jeffery, P.G. (1995). **Gas Analysis by Gas Chromatography.** Oxford: Pergamon press.

Krzymien, M.E., and Elias. (1990). Feasibility study on the determination of fish freshness by trimethylamine headspace analysis. **J. Food Sci.** 55 (13): 1228-1232.

Lindroth, S.E. and Genigeorgis, C.A. (1986). Probability of growth and toxin production by non-proteolytic Clostridium botulinum in rockfish stored under modified atmosphere. **Int. J. Food Microbiol.** 3 (2): 167-174.

Lundstrom R.C. and Racicot, L.D. (1983). Gas chromatographic determination of dimethylamine and trimethylamine in seafoods. **J. Assoc. Off. Anal.Chem.** 66 (15): 1158-1164.

Malle, P., and Poumeyrol M. (1989). A new chemical criterion for the quality control of fish:

trimethylamine/total volatile basic nitrogen (%). **J. Food. Prot.** 52 (8): 419-423.

Manzano-mazorra, M.A., Aguilar, R.P., Rojas, E.I., and Sanchez, M.E. (2000). Postmortem changes in black skipjack muscle during storage in ice. **J. Food. Sci.** 65 (5):774-779.

Molin, G., Stenstrom, M.I., Ternstrom A. (1983). The microbial flora of herring fillets after storage in carbon dioxide, nitrogen or air at 2 °C. **J. Appl. Bacteriol.** 55 (1): 49-56.

Obermiller, E.L., and Freedman, R.W. (1965). Single-stage determination of argon, oxygen and nitrogen in air. **J. of G.C.** 11 (2): 242-243.

Parkin, K.L., Wells, M.J., and Brown, W.D. (1981). Modified atmosphere storage of rockfish fillets. **J. Food Sci.** 47 (1): 181-184.

Parry, R.T. (1993). **Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Foods.** Glasgow: Blackie.

Pastoriza, L., Sampedro, G. and Cabo, L. (1998). Influence of sodium chloride and modified atmosphere packaging on microbiological, chemical and sensorial properties in ice storage of slice of hake (*Merluccius merluccius)*. **Food chem.** 61 (1): 23-28.

Petran, R.L. Sperber, W.H. and Davis, A.B. 1995. *Clostridium botulinum* toxin formation in romaine lettuce and shredded cabbage: effect of storage and packaging conditions. **J. Food. Prot.** 58 (3): 624-627.

Post, L.S., Lee, D.A., and Solberg, M. (1985). Development of botulinal toxin and sensory deterioration during storage of vacuum and modified atmosphere packaged of fish fillets. **J. Food. Sci.** 50 (3): 990-996.

Potter, N.N., and Hotchkis, J.H. (1995). **Food Science.** New York: Chapman & Hall.

Ray, B. (1996). **Fundamental Food Microbiology.** New York: CRC Press.

Reddy, N.R., Roman., M.G., Villanueva, M. and Rhodehamel. (1997). Shlfe life and *Clostridium botulinum* toxin development during storage of modified atmosphere-packaged fresh catfish fillets. **J. Food. Sci.** 62 (8): 878-883.

Richter, E.R. and Banwart, G.J. (1983). Microbiology and sensory evaluation of fresh fish packaged in carbon dioxide for retail outlets in the midwest. **J. Food Prot.** 46 (3): 245-247.

Ryder, J.M. (1985). Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high performance liquid chromatography. **J. Agric. Food. Chem.** 33 (3): 678-

680.

Sleat, R. and Robinson, J.P. (1984). A Review The bacteriology of anaerobic degradation of aromatic compounds. **J. Applied. Bacteriol.** 57 (2): 381-394.

Sorheim, O. Nissen, H. and Nesbakken T. (1999). The storage life of beef and pork packed in an atmosphere with low carbon monoxide and high carbon dioxide. **Meat Sci.** 52 (2): 157-164.

Statham, J.A., Bremner, H.A., and Quarmby, A.R. (1985). Storage of morworwong (Namadactylus marcropterus) in combinations of potassium sorbate, polyphosphate, and carbon dioxide at 4°C. **J. Food. Sci.** 50 (14): 1580-1585.

Stier, R.F., Bell, L., Ito, K.A., and Brown, L.A. (1981). Effect of modified atmosphere storage on *C. botulinum* toxigenesis and the spoilage microflora of salmon fillets. **J. Food Sci.** 46 (15): 1639-1642.

Surette, M.E., Gill, T.A. and leBlanc, P.J. (1988). Biochemical basis of postmortem nucleotide catabolism in cod (*Gadus morhua*) and its relationship to spoilage. **J. Agric Food Chem.** 36 (1): 19-22

Tortora, J.G., Funke, B.R. and Case, C.L. (1989). **Microbiology.** New York: The benjamin /cummings publishing company.

Vandersont, C. and Splittstoesse, D.F. (1992). **Compendium of methods for the microbilogical examination of foods.** New york: American Public Health Association, Inc.

Vermeiren, L., Develieghere, F., and Debevere, J. (1999). Developments in the active packaging of foods. **Trends in Food Sci and Technol.** 10 (1): 77-86.

Villarreal, B, and Pozo, R. (1990). Chemical composition and ice spoilage of albacore (*Thunnus alalunge*). **J. Food Sci.** 55 (4): 678-682.

Villemure, G., Simard, R.E., and Picard, G. (1986). Bulk storage of cod fillets and gutted cod (*Gadus morhua)* under carbon dioxide atmosphere. **J. Food. Sci.** 51 (2): 317-320.

Wang, M.Y. and Brown, W.D. (1983). Effect of elevated CO_2 atmosphere on storage of freshwater crayfish (*Pacifastacus ieniusculus*). **J Food Sci.** 48 (1): 158-162.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

Plate Count Agar (PCA) (อาหารสำเร็จรูปจาก Merck)

Tryptone	5	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Dextrose	1	กรัม
Agar	15	กรัม

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 22.5 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ละลายส่วนผสมและให้ความร้อนจนเดือด ถ่ายใส่ขวด นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที ก่อนเปิดหม้อนึ่งต้องรอให้อุณหภูมิต่ำกว่า 75 °C ปรับ pH ครั้งสุดท้าย 7.0 ±0.2 เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร

Brilliant Green Lactose Bile Broth, 2%

Peptone	10	กรัม
Lactose	10	กรัม
Oxgall	20	กรัม
Brilliant green	0.0133	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อนปานกลาง ถ่ายใส่หลอดทดลองขนาด 20 x 150 มิลลิเมตร หลอดละประมาณ 10 มิลลิลิตร บรรจุหลอดดักก๊าซให้คว่ำอยู่ข้างในหลอดทดลอง นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที ก่อนเปิดหม้อนึ่งต้องรอให้อุณหภูมิต่ำกว่า 75 °C ปรับ pH ครั้งสุดท้าย 7.0 ±0.2

Eosin Methylene-Blue Lactose Sucrose Agar (EMB) (อาหารสำเร็จรูปจาก Merck)

Peptone	10	กรัม
Lactose	5	กร

Sucrose	5	กรัม
Dipotassium Phosphate	2	กรัม
Agar	13	กรัม
Eosin Y	0.4	กรัม
Methylene Blue	0.065	กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อนจนเดือดเพื่อละลาย agar ใส่ขวดนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที ปรับ pH ครั้งสุดท้าย 7.1 ±0.1

Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) (อาหารสำเร็จรูปจาก Difco)

Bacto Yeast Extract	3	กรัม
L-lysine	5	กรัม
Bacto Xylose	3.75	กรัม
Bacto Lactose	7.5	กรัม
Bacto Saccharose	7.5	กรัม
Sodium Deoxycholate	2.5	กรัม
Ferric Ammonium Citrate	0.8	กรัม
Sodium thiosulfate	6.8	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Bacto Agar	15	กรัม
Bacto Phenol Red	0.08	กรัม

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 57 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร ให้ความร้อนจนเดือดเพื่อละลาย agar ปรับ pH ครั้งสุดท้าย 7.5 ±0.2 ไม่ต้องทำการนึ่งฆ่าเชื้อ เทใส่จานเพาะเชื้อจานละ 15 มิลลิลิตร

Thiosulfate-Citrate-Bile-Salts-Sucrose (TCBS) Agar (อาหารสำเร็จรูปจาก Hi media)

Yeast Extract	5	กรัม
Peptone	10	กรัม
Sucrose	20	กรัม

Sodium thiosulfate . $5H_20$	10	กรัม
Sodium Citrate . $2H_20$	10	กรัม
Sodium Cholate	3	กรัม
Oxgall	5	กรัม
NaCl	10	กรัม
Ferric Citrate	1	กรัม
Bromthymol blue	0.04	กรัม
Thymol blue	0.04	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 89 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร ให้ความร้อนจนเดือดเพื่อละลาย agar ปรับ pH ครั้งสุดท้าย 7.5 $\pm$0.2 ไม่ต้องทำการนึ่งฆ่าเชื้อ เทใส่จานเพาะเชื้อจานละ 15 มิลลิลิตร

Baird Parker Medium (อาหารสำเร็จรูปจาก Hi media)

Casein enzymic hydrolysate	10	กรัม
Beef extract	5	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Sodium pyruvate	10	กรัม
Glycine	12	กรัม
Lithiumchloride .$6H_2O$	5	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ละลายส่วนผสม 63 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อนจนเดือดเพื่อละลาย agar ใส่ขวดนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที ปรับ pH ครั้งสุดท้าย 7.1 $\pm$0.1 ทิ้งให้อุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงประมาณ 48-50 $^{\circ}$C เติม EY tellurite enrichment 5 มิลลิลิตร

Tryptone-Sulfite Cycloserine (TSC) Agar (อาหารสำเร็จรูปจาก Merck)

Tryptose	15	กรัม

Soytone	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium bisulfite (meta)	1	กรัม
Ferric ammonium citrate	1	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ละลายส่วนผสม 42 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อนจนเดือดเพื่อละลาย agar ใส่ขวด นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที ปรับ pH ครั้งสุดท้าย 7.6 ±0.2 ทิ้งให้อุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงประมาณ 48-50 °C เติมสารละลาย cycloserine ซึ่งผ่านการกรองฆ่าเชื้อแล้ว (filter sterilized solution) 0.4 กรัมต่อลิตร

Trypticase Peptone Glucose Yeast Extract (TPGY) medium (อาหารสำเร็จรูปจาก Merck)

Pancreatic digest of casein	5	กรัม
Yeast extract	2	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	4	กรัม
Sodium thioglycolate	1	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ละลายส่วนผสม 38 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อนจนเดือด เพื่อละลาย agar ใส่ขวด นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที ปรับ pH ครั้งสุดท้าย 7.6 ±0.2

Peptone Water Diluent, 0.1%

Peptone	1	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ละลาย peptone ในน้ำกลั่น ปรับ pH 7.0 ±0.1 ถ่ายใส่ขวดหรือหลอดทดลองที่จะทำการเจือจาง นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข

ตาราง ภาคผนวก ข.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไนโตรเจน และออกซิเจน ภายในภาชนะบรรจุ เนื้อปลานิลในสภาพการปรับเปลี่ยนบรรยากาศที่สภาวะต่างๆ ที่อุณหภูมิ 0^0C

วันที่สุ่มตรวจ	สภาวะการเก็บรักษา	ความเข้มข้นก๊าซ (%)		
		$C0_2$	N_2	O_2
0	Control	0.02	77.96	20.02
	25% CO_2 : 75% N_2	23.78	74.06	1.69
	50% CO_2 : 50% N_2	48.93	49.08	1.54
	75% CO_2 : 25 % N_2	74.67	23.44	1.66
	100 % CO_2	96.44	1.03	1.45
1	Control	1.76	77.59	18.49
	25% CO_2 : 75% N_2	21.74	73.96	1.98
	50% CO_2 : 50% N_2	46.75	48.78	1.73
	75% CO_2 : 25 % N_2	70.06	24.71	1.57
	100 % CO_2	93.17	1.96	1.84
2	Control	1.98	77.43	17.36
	25% CO_2 : 75% N_2	20.88	73.54	2.03
	50% CO_2 : 50% N_2	44.86	49.03	2.02
	75% CO_2 : 25 % N_2	69.11	24.58	1.94
	100 % CO_2	92.43	2.47	2.02
3	Control	2.31	77.56	17.02
	25% CO_2 : 75% N_2	19.58	72.17	2. 12
	50% CO_2 : 50% N_2	43.71	54.11	2.07
	75% CO_2 : 25 % N_2	67.49	27.43	2.04
	100 % CO_2	91.17	3.06	2.11

ตาราง ภาคผนวก ข.1 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไนโตรเจน และ ออกซิเจน ภายในภาชนะบรรจุ เนื้อปลานิลในสภาพการปรับเปลี่ยนบรรยากาศที่สภาวะต่างๆ ที่อุณหภูมิ 0^0C

วันที่สุ่มตรวจ	สภาวะการเก็บรักษา	ความเข้มข้นก๊าซ (%)		
		$C0_2$	**N_2**	**O_2**
4	Control	2.79	77.32	16.78
	25% CO_2 : 75% N_2	18.06	73.04	2.34
	50% CO_2 : 50% N_2	42.18	55.98	2.1
	75% CO_2 : 25 % N_2	66.76	27.77	2.05
	100 % CO_2	90.09	3.48	2.11
5	Control	3.43	77.54	15.96
	25% CO_2 : 75% N_2	20.15	72.87	2.41
	50% CO_2 : 50% N_2	40.39	57.04	2.16
	75% CO_2 : 25 % N_2	65.43	28.46	2.08
	100 % CO_2	89.98	3.67	2.18
6	Control	3.87	77.43	14.06
	25% CO_2 : 75% N_2	21.34	72.91	2.4
	50% CO_2 : 50% N_2	39.86	57.11	2.17
	75% CO_2 : 25 % N_2	64.11	28.34	2.11
	100 % CO_2	89.06	3.95	2.18
7	Control	4.15	77.46	13.77
	25% CO_2 : 75% N_2	21.46	72.85	2.39
	50% CO_2 : 50% N_2	38.57	57.43	2.21
	75% CO_2 : 25 % N_2	64.07	30.11	2.18
	100 % CO_2	85.76	5.03	2.22
10	Control	5.99	77.21	10.59
	25% CO_2 : 75% N_2	20.02	73.43	2.56
	50% CO_2 : 50% N_2	41.13	57.32	2.35

ตาราง ภาคผนวก ข.1 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไนโตรเจน และ ออกซิเจน ภายในภาชนะบรรจุ เนื้อปลานิลในสภาพการปรับเปลี่ยนบรรยากาศที่สภาวะต่างๆ ที่อุณหภูมิ 0^0C

วันที่สุ่มตรวจ	สภาวะการเก็บรักษา	ความเข้มข้นก๊าซ (%)		
		$C0_2$	**N_2**	**O_2**
10	75% CO_2 : 25 % N_2	63.02	31.48	2.24
	100 % CO_2	83.39	5.57	2.31
13	Control	-	-	-
	25% CO_2 : 75% N_2	22.39	72.89	2.67
	50% CO_2 : 50% N_2	43.56	57.3	2.45
	75% CO_2 : 25 % N_2	62.47	30.43	2.3
	100 % CO_2	80.54	5.47	2.47
19	Control	-	-	-
	25% CO_2 : 75% N_2	21.78	72.87	2.89
	50% CO_2 : 50% N_2	46.55	57.22	2.67
	75% CO_2 : 25 % N_2	67.45	31.47	2.56
	100 % CO_2	93.06	5.23	2.69
22	Control	-	-	-
	25% CO_2 : 75% N_2	-	-	-
	50% CO_2 : 50% N_2	45.39	57.19	2.67
	75% CO_2 : 25 % N_2	69.03	31.57	2.54
	100 % CO_2	96.15	5.03	2.71
25	Control	-	-	-
	25% CO_2 : 75% N_2	-	-	-
	50% CO_2 : 50% N_2	46.77	57.21	2.71
	75% CO_2 : 25 % N_2	70.21	32.01	2.57
	100 % CO_2	97.14	5.34	2.69

- = ไม่ได้ทำการตรวจวัด เนื่องจากตัวอย่างเน่าเสียและไม่เป็นที่ยอมรับแล้ว

ตาราง ภาคผนวก ข.1 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไนโตรเจน และ ออกซิเจน ภายในภาชนะบรรจุ เนื้อปลานิลในสภาพการปรับเปลี่ยนบรรยากาศที่สภาวะต่างๆ ที่อุณหภูมิ 0^0C

วันที่สุ่มตรวจ	สภาวะการเก็บรักษา	ความเข้มข้นก๊าซ (%)		
		$C0_2$	N_2	O_2
28	Control	-	-	-
	25% CO_2 : 75% N_2	-	-	-
	50% CO_2 : 50% N_2	-	-	-
	75% CO_2 : 25 % N_2	71.89	33.27	2.54
	100 % CO_2	97.06	5.43	2.65
31	Control	-	-	-
	25% CO_2 : 75% N_2	-	-	-
	50% CO_2 : 50% N_2	-	-	-
	75% CO_2 : 25 % N_2	72.38	33.29	2.5
	100 % CO_2	-	-	-
34	Control	-	-	-
	25% CO_2 : 75% N_2	-	-	-
	50% CO_2 : 50% N_2	-	-	-
	75% CO_2 : 25 % N_2	72.31	33.2	2.53
	100 % CO_2	-	-	-
37	Control	-	-	-
	25% CO_2 : 75% N_2	-	-	-
	50% CO_2 : 50% N_2	-	-	-
	75% CO_2 : 25 % N_2	73.31	32.2	2.63
	100 % CO_2	-	-	-

- = ไม่ได้ทำการตรวจวัด เนื่องจากตัวอย่างเน่าเสียและไม่เป็นที่ยอมรับแล้ว

ตาราง ภาคผนวก ข.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไนโตรเจน และออกซิเจน ภายในภาชนะบรรจุ เนื้อปลานิลในสภาพการปรับเปลี่ยนบรรยากาศที่สภาวะต่างๆ ที่อุณหภูมิ 4^0C

วันที่สุ่มตรวจ	สภาวะการเก็บรักษา	ความเข้มข้นก๊าซ (%)		
		$C0_2$	**N_2**	**O_2**
0	Control	0.02	77.96	20.02
	25% CO_2 : 75% N_2	23.78	74.06	1.69
	50% CO_2 : 50% N_2	48.93	49.08	1.54
	75% CO_2 : 25 % N_2	74.67	23.44	1.66
	100 % CO_2	94.44	1.03	1.45
1	Control	0.4	76.13	16.49
	25% CO_2 : 75% N_2	22.89	73.57	1.87
	50% CO_2 : 50% N_2	47.41	48.48	1.76
	75% CO_2 : 25 % N_2	71.77	23.45	1.69
	100 % CO_2	94.57	1.55	1.74
2	Control	1.35	76.07	15.07
	25% CO_2 : 75% N_2	21.77	73.3	2
	50% CO_2 : 50% N_2	47.06	48.77	2.01
	75% CO_2 : 25 % N_2	71.35	24.35	1.87
	100 % CO_2	93.41	1.76	2.03
3	Control	1.78	75.43	14.59
	25% CO_2 : 75% N_2	21.53	72.35	2.08
	50% CO_2 : 50% N_2	46.53	54.3	2.05
	75% CO_2 : 25 % N_2	70.16	27.65	2.02
	100 % CO_2	91.65	2.57	2.07
4	Control	2.17	76.16	14.01
	25% CO_2 : 75% N_2	22.87	72.59	2.27
	50% CO_2 : 50% N_2	46.65	55.46	2.16

ตาราง ภาคผนวก ข.2 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไนโตรเจน และ ออกซิเจน ภายในภาชนะบรรจุ เนื้อปลานิลในสภาพการปรับเปลี่ยนบรรยากาศที่สภาวะต่างๆ ที่อุณหภูมิ 4^0C

วันที่สุ่มตรวจ	สภาวะการเก็บรักษา	ความเข้มข้นก๊าซ (%)		
		$C0_2$	N_2	O_2
4	75% CO_2 : 25 % N_2	66.76	27.77	2.05
	100 % CO_2	90.09	3.48	2.11
5	Control	2.5	75.46	13.25
	25% CO_2 : 75% N_2	23.03	72.36	2.38
	50% CO_2 : 50% N_2	47.01	56.45	2.25
	75% CO_2 : 25 % N_2	67.36	27.89	2.17
	100 % CO_2	93.73	3.57	2.04
6	Control	-	-	-
	25% CO_2 : 75% N_2	23.41	72.44	2.39
	50% CO_2 : 50% N_2	47.04	57.78	2.21
	75% CO_2 : 25 % N_2	72.35	28.56	2.17
	100 % CO_2	93.54	3.36	2.2
7	Control	-	-	-
	25% CO_2 : 75% N_2	23.26	71.43	2.35
	50% CO_2 : 50% N_2	47.06	56.61	2.21
	75% CO_2 : 25 % N_2	73.11	31.58	2.16
	100 % CO_2	93.56	3.87	2.24
10	Control	-	-	-
	25% CO_2 : 75% N_2	-	-	-
	50% CO_2 : 50% N_2	47.31	56.67	2.37
	75% CO_2 : 25 % N_2	73.42	32.03	2.31
	100 % CO_2	93.96	4.16	2.36

- = ไม่ได้ทำการตรวจวัด เนื่องจากตัวอย่างเน่าเสียและไม่เป็นที่ยอมรับแล้ว

ตาราง ภาคผนวก ข.2 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไนโตรเจน และ ออกซิเจน ภายในภาชนะบรรจุ เนื้อปลานิลในสภาพการปรับเปลี่ยนบรรยากาศที่สภาวะต่างๆ ที่อุณหภูมิ 4^0C

วันที่สุ่มตรวจ	สภาวะการเก็บรักษา	ความเข้มข้นก๊าซ (%)		
		$C0_2$	**N_2**	**O_2**
13	Control	-	-	-
	25% CO_2 : 75% N_2	-	-	-
	50% CO_2 : 50% N_2	47.19	55.67	2.46
	75% CO_2 : 25 % N_2	73.43	30.59	2.34
	100 % CO_2	93.5	4.3	2.37
16	Control	-	-	-
	25% CO_2 : 75% N_2	-	-	-
	50% CO_2 : 50% N_2	-	-	-
	75% CO_2 : 25 % N_2	73.08	30.87	2.38
	100 % CO_2	-	-	-
19	Control	-	-	-
	25% CO_2 : 75% N_2	-	-	-
	50% CO_2 : 50% N_2	-	-	-
	75% CO_2 : 25 % N_2	73.11	31.32	2.47
	100 % CO_2	-	-	-

- = ไม่ได้ทำการตรวจวัด เนื่องจากตัวอย่างเน่าเสียและไม่เป็นที่ยอมรับแล้ว

ตาราง ภาคผนวก ข.3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไนโตรเจน และออกซิเจน ภายในภาชนะบรรจุ เนื้อปลานิลในสภาพการปรับเปลี่ยนบรรยากาศที่สภาวะต่างๆ ที่อุณหภูมิ 10 ^{0}C

วันที่สุ่มตรวจ	สภาวะการเก็บรักษา	ความเข้มข้นก๊าซ (%)		
		$C0_2$	N_2	O_2
0	Control	0.02	77.96	20.02
	25% CO_2 : 75% N_2	23.78	74.06	1.69
	50% CO_2 : 50% N_2	48.93	49.08	1.54
	75% CO_2 : 25 % N_2	74.67	23.44	1.66
	100 % CO_2	96.44	1.03	1.45
1	control	0.67	75.46	15.43
	25% CO_2 : 75% N_2	22.56	74.03	1.74
	50% CO_2 : 50% N_2	48.71	48.34	1.69
	75% CO_2 : 25 % N_2	72.36	23.1	1.54
	100 % CO_2	95.61	1.65	1.66
2	control	1.96	75.43	13.56
	25% CO_2 : 75% N_2	23.05	72.43	2.04
	50% CO_2 : 50% N_2	47.01	47.23	2.13
	75% CO_2 : 25 % N_2	71.59	24.3	1.94
	100 % CO_2	94.07	1.87	2.05
3	control	2.23	74.53	11.45
	25% CO_2 : 75% N_2	23.12	71.25	2.09
	50% CO_2 : 50% N_2	47.86	53.65	2.1
	75% CO_2 : 25 % N_2	73.78	27.3	2.01
	100 % CO_2	94.67	2.34	2.11
4	control	-	-	-
	25% CO_2 : 75% N_2	23.32	71.23	2.16
	50% CO_2 : 50% N_2	48.76	55.3	2.17

- = ไม่ได้ทำการตรวจวัด เนื่องจากตัวอย่างเน่าเสียและไม่เป็นที่ยอมรับแล้ว

ตาราง ภาคผนวก ข.3 (ต่อ) ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไนโตรเจน และ ออกซิเจน ภายในภาชนะบรรจุ เนื้อปลานิลในสภาพการปรับเปลี่ยนบรรยากาศที่สภาวะต่างๆ ที่อุณหภูมิ 10 ^{0}C

วันที่สุ่มตรวจ	สภาวะการเก็บรักษา	ความเข้มข้นก๊าซ (%)		
		$C0_2$	N_2	O_2
4	75% CO_2 : 25 % N_2	74.01	26.98	2.05
	100 % CO_2	95.63	2.54	2.16
5	control	-	-	-
	25% CO_2 : 75% N_2	-	-	-
	50% CO_2 : 50% N_2	48.81	55.87	2.43
	75% CO_2 : 25 % N_2	74.15	26.45	2.26
	100 % CO_2	95.78	3.42	2.27
6	control	-	-	-
	25% CO_2 : 75% N_2	-	-	-
	50% CO_2 : 50% N_2	48.87	57.32	2.32
	75% CO_2 : 25 % N_2	74.1	27.96	2.21
	100 % CO_2	95.41	3.45	2.26
7	control	-	-	-
	25% CO_2 : 75% N_2	-	-	-
	50% CO_2 : 50% N_2	-	-	-
	75% CO_2 : 25 % N_2	74.07	32.11	2.34
	100 % CO_2	95.26	4.01	2.53
10	control	-	-	-
	25% CO_2 : 75% N_2	-	-	-
	50% CO_2 : 50% N_2	-	-	-
	75% CO_2 : 25 % N_2	74.23	32.43	2.27
	100 % CO_2	-	-	-

- = ไม่ได้ทำการตรวจวัด เนื่องจากตัวอย่างเน่าเสียและไม่เป็นที่ยอมรับแล้ว

ภาคผนวก ค

ตัวอย่างการเขียนโปรแกรม SAS เพื่อทำการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of Variance: ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอายุการเก็บรักษา Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

```
DO FACT_CRD;
   DO REP  = 1 TO 3;
      DO GAS = 'A1','A2','A3','A4','A5';
         DO TEMP; = 'TEMP1','TEMP2','TEMP3';
            INPUT DAYS @@;
              OUTPUT;
         END;
       END;
      END;
  CARD;
         10  5  3  19  11  4  26  12  6  37  19  10  28  13  7
         9    4  3  21  9  4  24  11  4  38  20  8  26  11  7
         10  5  3  18  10  4  25  13  5  36  18  9  27  12  7
;
PROC ANOVA;
         CLASS GAS TEMP;
            MODEL DAYS = GAS TEMP GAS*TEMP;
               MEANS    GAS TEMP GAS*TEMP /DUNCAN;
RUN;
```

<u>หมายเหตุ</u> อายุการเก็บรักษาที่ใช้ พิจารณาจาก จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

ตารางวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of Variance: ANOVA) ของอายุการเก็บรักษา โดยใช้การสูญเสียน้ำหนัก (% Weight loss) เป็นเกณฑ์ ด้วยโปรแกรม SAS และวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลใน CRD

Class	Level	Values
Gas	5	A1, A2, A3, A4, A5
Temp	3	Temp1, Temp2, Temp3

เมื่อ A1 คือ Normal air

A2 คือ 25% CO_2 : 75% N_2

A3 คือ 50% CO_2 : 50% N_2

A4 คือ 75% CO_2 : 25% N_2

A5 คือ 100% CO_2

และ Temp 1 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 0 $^{\circ}C$

Temp 2 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 4 $^{\circ}C$

Temp 3 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 10 $^{\circ}C$

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F-Value	Pr > F
Model	14	174.58	12.47	18.70	0.0001**
Error	30	20.00	0.67		
Total	44	194.58			

R-Square	C.V.	Root MSE
0.90	14.52%	0.82

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F-Value	Pr > F
Gas	4	35.24	8.81	13.22	0.0001**
Temp	2	116.31	58.15	87.23	0.0001**
Gas * Temp	8	23.02	2.87	4.32	0.0015**

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$)

การเปรียบเทียบอายุการเก็บรักษาเฉลี่ยโดยใช้การสูญเสียน้ำหนัก (%Weight loss) เป็นเกณฑ์ด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

Grouping *		**Mean ± S.D.**	**สภาวะ**
	A	10.3 ± 0.58	A4 และ Temp 1
	A	9	A5 และ Temp 1
	B	6.33 ± 0.58	A4 และ Temp 2
	B	6.3 ± 0.58	A3 และ Temp 1
	B	6 ± 1	A2 และ Temp 2
	B	6 ± 1	A3 และ Temp 2
	B	6 ± 1	A2 และ Temp 1
	B	6 ± 1	A1 และ Temp 1
C	B	5.33 ± 0.58	A5 และ Temp 2
C	B	5	A1 และ Temp 2
C	B	4.67 ± 0.58	A4 และ Temp 3
	D	4 ± 1	A5 และ Temp 3
	D	3.3 ± 0.58	A3 และ Temp 3
	D	3 ± 1	A2 และ Temp 3
	D	3 ± 1	A1 และ Temp 3

* = ตัวอักษรที่เหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of Variance: ANOVA) ของอายุการเก็บรักษาโดยใช้ปริมาณไตรเมทิลเอมีน (Trimethylamine : TMA) เป็นเกณฑ์ ด้วยโปรแกรม SASและวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลใน CRD

Class	Level	Values
Gas	5	A1, A2, A3, A4, A5
Temp	3	Temp1, Temp2, Temp3

เมื่อ A1 คือ Normal air

A2 คือ 25% CO_2 : 75% N_2

A3 คือ 50% CO_2 : 50% N_2

A4 คือ 75% CO_2 : 25% N_2

A5 คือ 100% CO_2

และ Temp 1 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 0 $^{\circ}$C

Temp 2 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 4 $^{\circ}$C

Temp 3 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 10 $^{\circ}$C

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F-Value	Pr > F
Model	14	3300.31	235.74	235.74	0.0001**
Error	30	30.0			
Total	44	3330.31			

R-Square	C.V.	Root MSE
0.99	8.59%	1.00

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F-Value	Pr > F
Gas	4	896.76	224.18	224.19	0.0001**
Temp	2	1856.24	927.62	927.62	0.0001**
Gas * Temp	8	548.31	68.53	68.54	0.0001**

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$)

การเปรียบเทียบอายุการเก็บรักษาเฉลี่ยโดยใช้ปริมาณไตรเมทิลเอมีน (Trimethylamine : TMA) เป็นเกณฑ์ ด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

Grouping *		**Mean ± S.D.**	**สภาวะ**
	A	34 ± 1	A4 และ Temp 1
	B	23.33 ± 1.52	A5 และ Temp 1
	B	21.67 ± 1.15	A3 และ Temp 1
	C	16.33 ± 0.58	A2 และ Temp 1
	D	12.67 ± 0.58	A5 และ Temp 2
	D	12.33 ± 0.58	A4 และ Temp 3
	D	11.67 ± 1.53	A3 และ Temp 2
	E	7.67 ± 1.53	A1 และ Temp 1
	E	7.67 ± 1.53	A4 และ Temp 2
	F	5 ± 1.00	A1 และ Temp 2
	F	5.67 ± 0.58	A5 และ Temp 3
	F	5.33 ± 0.58	A2 และ Temp 2
	F	5	A3 และ Temp 3
G	F	3.67 ± 0.58	A2 และ Temp 3
	H	2.67 ± 0.58	A1 และ Temp 3

* = ตัวอักษรที่เหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of Variance: ANOVA) ของอายุการเก็บรักษา โดยใช้ปริมาณไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total Volatile Basic Nitrogen :TVB-N) เป็นเกณฑ์ ด้วยโปรแกรม SAS และวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลใน CRD

Class	Level	Values
Gas	5	A1, A2, A3, A4, A5
Temp	3	Temp1, Temp2, Temp3

เมื่อ A1 คือ Normal air

A2 คือ 25% CO_2 : 75% N_2

A3 คือ 50% CO_2 : 50% N_2

A4 คือ 75% CO_2 : 25% N_2

A5 คือ 100% CO_2

และ Temp 1 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 0 $^{\circ}C$

Temp 2 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 4 $^{\circ}C$

Temp 3 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 10 $^{\circ}C$

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F-Value	Pr > F
Model	14	3745.87	267.56	602.01	0.0001**
Error	30	13.33	0.44		
Total	44	3759.20			

R-Square	C.V.	Root MSE
0.99	4.69%	0.67

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F-Value	Pr > F
Gas	4	940.76	235.19	529.17	0.0001**
Temp	2	2604.93	1302.47	2930.55	0.0001**
Gas * Temp	8	900.18	25.02	56.30	0.0001**

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$)

การเปรียบเทียบอายุการเก็บรักษาเฉลี่ยโดยใช้ปริมาณไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total Volatile Basic Nitrogen :TVB-N) เป็นเกณฑ์ ด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

Grouping *		**Mean ± S.D.**	**สภาวะ**
	A	34.33 ± 1.15	A4 และ Temp 1
	B	27.67 ± 0.58	A5 และ Temp 1
B	C	24.67 ± 0.58	A3 และ Temp 1
	D	22.33 ± 0.58	A2 และ Temp 1
	E	18.33 ± 0.58	A5 และ Temp 2
	F	17.67 ± 0.58	A2 และ Temp 2
	G	14.67 ± 0.58	A4 และ Temp 2
	G	13.33 ± 0.58	A3 และ Temp 2
	G	13.0 ± 1	A1 และ Temp 1
H	G	11.33 ± 0.58	A5 และ Temp 3
	I	6.33 ± 0.58	A1 และ Temp 2
	I	5.67 ± 0.58	A3 และ Temp 3
	I	5.66 ± 0.58	A4 และ Temp 3
	I	4.33 ± 0.58	A2 และ Temp 3
J	I	3.67 ± 0.58	A1 และ Temp 3

* = ตัวอักษรที่เหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of Variance: ANOVA) ของอายุการเก็บรักษา โดยใช้ % K-Value เป็นเกณฑ์ ด้วยโปรแกรม SAS และวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล ใน CRD

Class	Level	Values
Gas	5	A1, A2, A3, A4, A5
Temp	3	Temp1, Temp2, Temp3

เมื่อ A1 คือ Normal air

A2 คือ 25% CO_2 : 75% N_2

A3 คือ 50% CO_2 : 50% N_2

A4 คือ 75% CO_2 : 25% N_2

A5 คือ 100% CO_2

และ Temp 1 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 0 $^{\circ}C$

Temp 2 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 4 $^{\circ}C$

Temp 3 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 10 $^{\circ}C$

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F-Value	Pr > F
Model	14	3324.8	237.49	197.90	0.0001**
Error	30	36.0	1.2		
Total	44	3360.8			

R-Square	C.V.	Root MSE
0.98	8.38%	1.09

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F-Value	Pr > F
Gas	4	1269.91	317.48	264.56	0.0001**
Temp	2	1750.93	875.47	729.59	0.0001**
Gas * Temp	8	303.95	37.99	31.66	0.0001**

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$)

การเปรียบเทียบอายุการเก็บรักษาเฉลี่ยโดยใช้ % K-Value เป็นเกณฑ์ ด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

Grouping *		**Mean ± S.D.**	**สภาวะ**
	A	35.0 ± 2	A4 และ Temp 1
	B	26.0 ± 1	A5 และ Temp 1
	C	20.67 ± 1.53	A3 และ Temp 1
	C	18.33 ± 0.58	A5 และ Temp 2
D	C	16.67 ± 2.31	A2 และ Temp 1
	E	13.67 ± 0.58	A4 และ Temp 2
	E	11.33 ± 0.58	A3 และ Temp 2
G	F	10.0	A5 และ Temp 3
	F	9.0 ± 1	A1 และ Temp 1
	F	8.67 ± 0.58	A4 และ Temp 3
	F	7.0 ± 1	A2 และ Temp 2
	F	6.67 ± 0.58	A3 และ Temp 3
	F	5.67 ± 0.58	A1 และ Temp 2
	F	5.0 ± 1	A2 และ Temp 3
	H	2.33 ± 0.58	A1 และ Temp 3

* = ตัวอักษรที่เหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of Variance: ANOVA) ของอายุการเก็บรักษา โดยใช้ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) เป็นเกณฑ์ ด้วยโปรแกรม SAS และวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลใน CRD

Class	Level	Values
Gas	5	A1, A2, A3, A4, A5
Temp	3	Temp1, Temp2, Temp3

เมื่อ A1 คือ Normal air

A2 คือ 25% CO_2 : 75% N_2

A3 คือ 50% CO_2 : 50% N_2

A4 คือ 75% CO_2 : 25% N_2

A5 คือ 100% CO_2

และ Temp 1 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 0 $^{\circ}$C

Temp 2 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 4 $^{\circ}$C

Temp 3 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 10 $^{\circ}$C

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F-Value	Pr > F
Model	14	3695.91	263.99	304.61	0.0001**
Error	30	26.0	0.87		
Total	44	3721.91			

R-Square	C.V.	Root MSE
0.99	7.16%	0.94

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F-Value	Pr > F
Gas	4	1386.13	346.53	399.85	0.0001**
Temp	2	1808.84	904.42	1043.56	0.0001**
Gas * Temp	8	500.93	62.62	72.25	0.0001**

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$)

การเปรียบเทียบอายุการเก็บรักษาเฉลี่ยโดยใช้การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด – ด่าง (pH) เป็นเกณฑ์ด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

Grouping *		**Mean ± S.D.**	**สภาวะ**
	A	37.67 ± 1.15	A4 และ Temp 1
	B	27.67 ± 1.53	A5 และ Temp 1
	C	19.0 ± 1	A4 และ Temp 2
	D	16.33 ± 1.52	A3 และ Temp 1
E	F	14.67 ± 0.58	A2 และ Temp 1
	F	12.67 ± 0.58	A3 และ Temp 2
	F	11.3 ± 1.53	A5 และ Temp 2
	F	10.33 ± 0.58	A4 และ Temp 3
	F	10.33 ± 0.58	A1 และ Temp 1
	G	9	A2 และ Temp 2
	G	7	A5 และ Temp 3
	H	5.67 ± 1.15	A3 และ Temp 3
	H	5.67 ± 0.58	A1 และ Temp 2
	H	4.33 ± 0.58	A2 และ Temp 3
	I	2.67 ± 0.58	A1 และ Temp 3

* = ตัวอักษรที่เหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of Variance: ANOVA) ของอายุการเก็บรักษา โดยใช้ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total variable count) เป็นเกณฑ์ ด้วยโปรแกรม SAS และวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลใน CRD

Class	Level	Values
Gas	5	A1, A2, A3, A4, A5
Temp	3	Temp1, Temp2, Temp3

เมื่อ A1 คือ Normal air

A2 คือ 25% CO_2 : 75% N_2

A3 คือ 50% CO_2 : 50% N_2

A4 คือ 75% CO_2 : 25% N_2

A5 คือ 100% CO_2

และ Temp 1 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 0 °C

Temp 2 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 4 °C

Temp 3 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 10 °C

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F-Value	Pr > F
Model	14	4126.98	294.78	368.48	0.0001**
Error	30	24	0.8		
Total	44	4150.98			

R-Square	C.V.	Root MSE
0.99	6.59%	0.89

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F-Value	Pr > F
Gas	4	1220.53	305.13	381.42	0.0001**
Temp	2	2524.04	1262.02	1577.53	0.0001**
Gas * Temp	8	382.4	47.8	59.75	0.0001**

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$)

การเปรียบเทียบอายุการเก็บรักษาเฉลี่ยโดยใช้จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total variable count) เป็นเกณฑ์ ด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

Grouping *		**Mean ± S.D.**	**สภาวะ**
	A	37.0 ± 1	A4 และ Temp 1
	B	27.0 ± 1	A5 และ Temp 1
C	B	25.0 ± 1	A3 และ Temp 1
	D	19.3 ± 1.52	A2 และ Temp 1
	D	19.0 ± 1	A4 และ Temp 2
	F	12.0 ± 1	A3 และ Temp 2
	F	12.0 ± 1	A5 และ Temp 2
	G	10.0 ± 1	A2 และ Temp 2
	G	9.67 ± 0.58	A1 และ Temp 1
	G	9.0 ± 1	A4 และ Temp 3
H	G	7.0	A5 และ Temp 3
	I	5.0 ± 1	A3 และ Temp 3
	I	4.67 ± 0.58	A1 และ Temp 2
	I	4.0	A2 และ Temp 3
	J	3.0	A1 และ Temp 3

* = ตัวอักษรที่เหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of Variance: ANOVA) ของการเปลี่ยนแปลงปริมาณก๊าซไนโตรเจน (N_2) ในภาชนะบรรจุ ด้วยโปรแกรม SAS และวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลใน CRD

Class	Level	Values
Gas	5	A1, A2, A3, A4, A5
Temp	3	Temp1, Temp2, Temp3

เมื่อ A1 คือ Normal air

A2 คือ 25% CO_2 : 75% N_2

A3 คือ 50% CO_2 : 50% N_2

A4 คือ 75% CO_2 : 25% N_2

A5 คือ 100% CO_2

และ Temp 1 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 0 $^{\circ}$C

Temp 2 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 4 $^{\circ}$C

Temp 3 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 10 $^{\circ}$C

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F-Value	Pr > F
Model	14	33584.07	2398.86	4767.08	0.7143 ^{ns}
Error	30	14	0.5		
Total	44	33598.07			

R-Square	C.V.	Root MSE
0.92	11.59%	0.89

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F-Value	Pr > F
Gas	4	33578.54	8394.64	7435.64	0.5436 ^{ns}
Temp	2	62.32	31.16	48.12	0.6547 ^{ns}
Gas * Temp	8	2854.04	4563.47	3976.53	0.6123 ^{ns}

^{ns} = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P > 0.05)

ตารางวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of Variance: ANOVA) ของการเปลี่ยนแปลงปริมาณก๊าซออกซิเจน (O_2) ในภาชนะบรรจุ ด้วยโปรแกรม SAS และวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลใน CRD

Class	Level	Values
Gas	5	A1, A2, A3, A4, A5
Temp	3	Temp1, Temp2, Temp3

เมื่อ A1 คือ Normal air

A2 คือ 25% CO_2 : 75% N_2

A3 คือ 50% CO_2 : 50% N_2

A4 คือ 75% CO_2 : 25% N_2

A5 คือ 100% CO_2

และ Temp 1 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 0 $^{\circ}$C

Temp 2 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 4 $^{\circ}$C

Temp 3 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 10 $^{\circ}$C

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F-Value	Pr > F
Model	14	25412.21	1815.16	1974.53	0.015 *
Error	30	35.87	759		
Total	44	25448.08			

R-Square	C.V.	Root MSE
0.96	6.59%	0.91

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F-Value	Pr > F
Gas	4	25414.1	6351.33	25685.67	0.5312 ns
Temp	2	4.16	2.09	1.74	0.0451 *
Gas * Temp	8	3.93	0.49	0.41	0.6125 ns

* = มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$), ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตารางวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of Variance: ANOVA) ของการเปลี่ยนแปลงปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ในภาชนะบรรจุ ด้วยโปรแกรม SAS และวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลใน CRD

Class	Level	Values
Gas	5	A1, A2, A3, A4, A5
Temp	3	Temp1, Temp2, Temp3

เมื่อ A1 คือ Normal air

A2 คือ 25% CO_2 : 75% N_2

A3 คือ 50% CO_2 : 50% N_2

A4 คือ 75% CO_2 : 25% N_2

A5 คือ 100% CO_2

และ Temp 1 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 0 $^{\circ}$C

Temp 2 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 4 $^{\circ}$C

Temp 3 คือ อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ 10 $^{\circ}$C

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F-Value	Pr > F
Model	14	50824.41	3630.32	4.51	0.015 *
Error	30	71.74	1518		
Total	44	50896.15			

R-Square	C.V.	Root MSE
0.95	7.59%	0.95

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F-Value	Pr > F
Gas	4	50808.2	12702.05	5311.29	0.3491 ^{ns}
Temp	2	8.33	4.17		0.0019 **
Gas * Temp	8	7.86	0.98		0.951 ^{ns}

** มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$),

^{ns} = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$)

การเปรียบเทียบ ปริมาณก๊าซออกซิเจน (O_2) ด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

Grouping *	**ปริมาณก๊าซ ± S.D.**	**สภาวะ**
A	9.78 ± 2.13	Temp 1
B	4.56 ± 1.42	Temp 2
C	1.54 ± 1.12	Temp 3

* = ตัวอักษรที่เหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

การเปรียบเทียบ ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

Grouping *	**ปริมาณก๊าซ ± S.D.**	**สภาวะ**
A	43.56 ± 0.58	Temp 3
B	37.18 ± 2.05	Temp 2
C	33.23 ± 3.12	Temp 1

* = ตัวอักษรที่เหมือนกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ประวัติผู้เขียน

ข้าพเจ้านางสาวเนตรนรินทร์ ขุนสูงเนิน เกิดเมื่อวันที่ 24 ธันวาคม พ.ศ. 2521 ที่จังหวัดนครราชสีมา จบการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เมื่อปี พ.ศ. 2542 จากนั้นศึกษาต่อในระดับปริญญาโทสาขาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีเดียวกัน ระหว่างเดือนกันยายน 2545 - กุมภาพันธ์ 2546 ได้รับทุนจากรัฐบาลฝรั่งเศส เพื่อทำการวิจัยและเรียนรู้เทคนิคเกี่ยวกับการตรวจวัดสารพิษที่ผลิตจากเชื้อราในผลิตภัณฑ์จากข้าวสาลี ที่เมืองตูลูส ประเทศฝรั่งเศส